

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA UFRGS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Novas cepas de levedura geradas por hibridização interespecífica entre *Saccharomyces cerevisiae* de origem belga e *Saccharomyces kudriavzevii* e sua potencial aplicação na indústria cervejeira**

Dissertação de Mestrado

**Bianca de Paula Telini**

Porto Alegre, dezembro de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA UFRGS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

**Novas cepas de levedura geradas por hibridização interespecífica entre  
*Saccharomyces cerevisiae* de origem belga e *Saccharomyces kudriavzevii* e  
sua potencial aplicação na indústria cervejeira**

Dissertação de Mestrado

Bianca de Paula Telini

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Diego Bonatto

Porto Alegre, dezembro de 2019.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi realizado no Grupo de Estudos de Leveduras Cervejeiras (GELC) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“Though my soul may set in darkness, it will rise in perfect light;  
I have loved the stars too fondly to be fearful of the night.”*

– **Sarah Williams, *Twilight Hours: A Legacy of Verse***

## **AGRADECIMENTOS**

À todas as pessoas que, de alguma forma, me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela estrutura laboratorial e científica;

Ao Prof. Dr. Diego Bonatto que me aceitou em seu laboratório e me orientou durante esse trabalho;

Às agências de fomento Capes e CNPq que me concederam a bolsa de estudos, essencial para o desenvolvimento dessa pesquisa científica;

À Cervejaria Tupiniquim que me permitiu utilizar sua estrutura e matérias-primas para realização de testes importantes para a conclusão dessa pesquisa;

Ao Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC) que, em parceria com o nosso laboratório, realizou as análises de compostos voláteis;

À minha família pelo apoio constante.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1. Breve história da cerveja.....	12
1.2. Cerveja, processos e matérias-primas.....	16
1.3. A fermentação cervejeira e estresses associados à fermentação.....	21
1.4. Leveduras utilizadas na fabricação cervejeira.....	25
1.5. Cepas híbridas: surgimento e aplicações.....	27
1.6. Leveduras selecionadas para hibridização .....	29
1.6.1. Wallonian Farmhouse Ales (WLN I, II e III).....	29
1.6.2. <i>Saccharomyces Kudriavzevii</i> (NCYC 2889).....	30
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
<b>3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
3.1. Artigo em fase inicial de redação.....	32
<b>4. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS ADICIONAIS.....</b>	<b>51</b>
4.1. Adaptabilidade das leveduras Wallonian Farmhouse Ale (WLN) aos estresses fermentativos.....	51
4.1.1. Teste em gotas.....	51
4.1.2. Teste de envelhecimento cronológico (CLS).....	53
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>60</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

**AEC** - Antes da Era Comum

**°P** - Unidade de medida de densidade em graus Plato

**4-VG** - 4-vinilguaiaicol

**ATF1** – Gene codificante para a enzima alcohol acetyltransferase 1

**ATF2** - Gene codificante para a enzima alcohol acetyltransferase 2

**CLS** - *chronological lifespan* (ciclo de vida cronológico)

**COX2** – gene codificante para a enzima citocromo oxidase

**EC** - Era Comum

**FDC1** - Gene codificante para a enzima ferulic acid decarboxylase

**FLO1, FLO5, FLO8, FLO9, FLO10 e FLO11** - Genes codificante para as floculinas

**GC-FID** - Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama

**IBU** - *International Bitter Units* (Unidade de amargor internacional)

**ITS1** - Região ITS1 (*Internal Transcribed Spacer*)

**ITS2** - Região ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*)

**KCl** - Cloreto de potássio

**Kg/cm<sup>3</sup>** - Unidade de medida de densidade em quilogramas por centímetro cúbico

**KKH1** - Híbrido 1 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Voss *Kveik* e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

**KKH2** - Híbrido 2 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Voss *Kveik* e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

**KKH3** - Híbrido 3 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Voss *Kveik* e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

**KWH1** - Híbrido 1 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Wallonian III e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

**KWH2** - Híbrido 2 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Wallonian III e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

**KWH3** - Híbrido 3 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Wallonian III e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

**Lis/Lys-** - Mutantes auxotróficos para lisina

**MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**NCYC** - *National Collection of Yeast Cultures* (Coleção nacional de cultura de leveduras)

**NCYC 2889** - Cepa tipo de *S. kudriavzevii*

**PAD1** - Gene codificante para a enzima phenylacrylic acid decarboxylase

**RLS** - *replicative lifespan* (ciclo de vida replicativo)

**RS** - Rio Grande do Sul

**STA1** - Gene codificante para a enzima glicoamilase

**Ura/Ura-** - Mutantes auxotróficos para uracila

**WLNIII** - Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Wallonian III

**YPM** - Meio composto com extrato de levedura, peptona e extrato de malte



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Obra “Mulher preparando cerveja”, século XXIV AEC.....	13
<b>Figura 2.</b> Crescimento do número de registros de cervejarias no Brasil.....	16
<b>Figura 3.</b> Processo de fabricação de cerveja.....	19
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática dos potenciais estresses encontrados pela levedura durante a fermentação cervejeira.....	23
<b>Figura 5.</b> Perfil fermentativo típico para a produção de cervejas <i>ale</i> .....	26
<b>Figura 6.</b> Mapa da Bélgica. Em destaque, região da Valônia, onde são encontradas as leveduras WLN I, II e III.....	29
<b>Figura 7.</b> Viabilidade celular determinada pelo teste em gotas. Crescimento das cepas US-05, W34/70, BY4741, CAT-1, WLN I, II e III e KVEIK em placas de ágar YPD contendo 10%, 15% e 20% (v / v) de etanol, 1.0M e 2.0M de KCl e 50mM e 100mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	52
<b>Figura 8.</b> Curvas de envelhecimento cronológico (CLS) durante 21 dias de cultivo.....	54

## RESUMO

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas no mundo. O Brasil é o terceiro maior produtor da bebida e, em 2019, o setor microcervejeiro alcançou a marca de mil estabelecimentos registrados. A crescente busca do consumidor por novos produtos é uma oportunidade para o desenvolvimento de cervejas com características singulares. Leveduras não-convencionais e cepas híbridas que apresentem atributos únicos de interesse para a indústria estão sendo usadas como modo de inovação. Neste trabalho, geramos híbridos interespecíficos entre uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de origem belga que apresenta alta atenuação e produção de ésteres e uma cepa de *Saccharomyces kudriavzevii* que apresenta crescimento a baixas temperaturas, alta produção de glicerol e compostos fenólicos. Os híbridos foram caracterizados em relação às cepas parentais em fermentação de mosto cervejeiro a temperaturas de 17 °C, 25 °C e 35 °C. As cervejas resultantes foram analisadas quanto a composição de compostos voláteis, pH e teor alcoólico. Os híbridos apresentaram propriedades benéficas de ambas as linhagens parentais, como a capacidade de fermentar em diferentes temperaturas e a produção de compostos voláteis de interesse cervejeiro. Os resultados sugerem que a hibridização interespecífica é adequada para a produção de novas cepas de leveduras não-OGM com propriedades únicas e as cepas híbridas geradas neste trabalho apresentam potencial de utilização na indústria cervejeira.

Palavras-chave: Leveduras cervejeiras. Hibridização. Fermentação.

Microcervejaria. Cepas Híbridas

## ABSTRACT

Beer is one of the most consumed beverages in the world. Brazil is the third largest beer producer and, in 2019, the microbrewer sector reached the milestone of a thousand registered establishments. The growing consumer search for new products is an opportunity for the development of beers with unique characteristics. Non-conventional yeasts and hybrid strains that have unique attributes of interest to the industry are being used as innovation. In this work, we generated interspecific hybrids between a Belgian *Saccharomyces cerevisiae* strain that has high attenuation and ester production and a *Saccharomyces kudriavzevii* strain that has low temperature growth, high glycerol production and phenolic compounds. The hybrids were characterized in relation to the parental strains in fermentation of beer wort at temperatures of 17 °C, 25 °C and 35 °C. The resulting beers were analyzed for volatile compounds composition, pH and alcohol content. The hybrids showed beneficial properties of both parental strains, such as the ability to ferment at different temperatures and the production of volatile compounds of brewing interest. The results suggest that interspecific hybridization is suitable for the production of new strains of non-GMO yeasts with unique properties and the hybrid strains generated in this work have potential for use in the brewing industry

Keywords: Brewer's yeast. Hybridization. Fermentation. Microbrewery. Hybrid strains.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 . Breve história da cerveja

A cerveja é uma das bebidas mais antigas produzidas pela humanidade. Historicamente, a cerveja já era conhecida pelos antigos sumérios, egípcios e mesopotâmios, com registros de produção datados de 6.000 AEC (Antes da Era Comum) (YOUNG, W. THOMAS, 2019). Pesquisas arqueológicas apontam para a presença da cerveja na alimentação de populações humanas até dez mil anos atrás (FAGAN, 1996; HORNESEY, 2003). Há evidências de que a prática se originou na região da Mesopotâmia onde a cevada cresce em estado selvagem. Inicialmente, as civilizações humanas eram nômades e migravam conforme a disponibilidade de recursos nos locais. O desenvolvimento das atividades de domesticação de animais e cultivo de plantas pelas proto-sociedades humanas iniciou uma fase de sedentarização humana, levando ao desenvolvimento da agricultura, da prática pastoral e a formação das primeiras civilizações. Acredita-se que a evolução destas práticas agropastoris também está relacionada à produção de vinhos e cervejas devido à vontade dessas proto-sociedades em cultivar os insumos utilizados na fabricação destas bebidas (WHITE & ZAINASCHEFF, 2010).

De modo geral e nas regiões mais diversas do mundo, a cerveja era vista desde sua criação como um alimento – uma parte do cardápio que, logo, era também parte das ditas “tarefas domésticas” reservadas às mulheres. Mais do que uma criação feminina, o preparo da cerveja foi por séculos tarefa exclusiva das mulheres. O que inicialmente era visto como um afazer da casa rapidamente se tornou uma especialidade muito apreciada. Na Mesopotâmia e na Suméria, há pelo menos sete mil anos, os conhecimentos especiais e exclusivos faziam da cerveja uma invenção exclusivamente das mulheres, que também tinham o monopólio da administração das tabernas. Não é por acaso que, de modo geral, nas sociedades antigas a cerveja era considerada o presente de uma deusa. As

mulheres também foram as primeiras cervejeiras no Egito. A egiptóloga Helen Strudwick descreve que tanto a fabricação de cerveja quanto a panificação eram atividades realizadas por mulheres e numerosas estatuetas encontradas em tumbas mostram mulheres moendo grãos em moinhos ou peneirando a farinha resultante (STRUDWICK, 2016). A cerveja foi produzida pela primeira vez em casa por mulheres e só mais tarde se tornou uma indústria financiada pelo Estado, liderada por homens. A influência feminina inicial na fabricação de cerveja talvez seja indicada pela divindade que governa essa habilidade e é conhecida como Tenenet (também Tenenit, Tjenenet), considerada a deusa da cerveja (GRAVES-BROWN, 2010).

Como a deusa Ninkasi dos sumérios, Tenenet vigiava os cervejeiros e certificava-se de que a receita fosse observada para produzir a cerveja de melhor qualidade. Os sumérios tinham o Hino à Ninkasi, que era basicamente a receita da cerveja cantada/declamada pelos cervejeiros para que eles a memorizassem, mas nenhuma evidência de uma declamação parecida foi encontrada no Egito (ROBERTS A., 1997; PINCH G., 2004).



**Figura 1.** Obra “Mulher preparando cerveja”, século XXIV AEC. Museu do Egito, Cairo. Fonte: <https://egypt-museum.com/post/172830718336/beer-in-ancient-egypt>.

A cerveja das sociedades Vikings era feita por mulheres em torno do século VIII AEC, e da mesma forma em todas as sociedades do norte da Europa. Na Inglaterra, as mulheres faziam a bebida em casa e a vendiam como um meio de incrementar o orçamento familiar – eram conhecidas como “*Alewives*”, ou esposas-Ale (BENNETT, 1996). A Inglaterra foi um dos mais importantes lugares para a popularização total da bebida (LOCKIN, N., 2007). Apesar da identificação da cerveja com as mulheres que prevalecia de forma cultural em grande parte do mundo no século XV, estima-se que foi nessa época que o desenvolvimento e a fabricação da bebida começaram a ser ressignificados como um elemento masculino (PINCHBECK, I., 1930). Tal processo de apropriação se deu desde o século XV e mais fortemente em meados do século XVIII. Quando começou a Primeira Revolução Industrial, as novas tecnologias e métodos de fabricação diminuíram de modo geral a necessidade da participação feminina na produção da cerveja (SHARPE, P., 1995). A fabricação em larga escala passou a ser possível em uma época em que o trabalho fora de casa era quase que exclusivamente masculino. No final do século XVIII, não só a produção havia se tornado um trabalho totalmente masculino, como os bares e o próprio imaginário ao redor da cerveja (PEYTON, J., 2013).

No Brasil, as primeiras cervejas chegaram somente no século XVII, com a colonização holandesa de Maurício de Nassau, no Recife, pela Companhia das Índias Ocidentais (SANTOS, 2004). Acredita-se que o hábito de beber cerveja tenha sido trazido com a chegada da família real ao Brasil e a abertura dos portos às nações amigas de Portugal em 1808 (VENTURINI, 2000). A cerveja consumida era importada da Europa, trazida em barris principalmente pelos comerciantes ingleses. Uma vez instalada a cultura cervejeira no Brasil, a alta taxação dos produtos estrangeiros privilegiou o mercado das primeiras cervejas artesanais, hábito trazido pelos imigrantes alemães, que inicialmente produziam para consumo próprio (SANTOS, 2004). Em 1888 foi fundada, na cidade do Rio de Janeiro, a “Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia”. Em 1889, a Antártica inicia-se no ramo das cervejas e, em 1891, oficializa-se como “Companhia

Antártica Paulista”, sociedade anônima fundada em São Paulo (VENTURINI, 2000). Por anos estas duas grandes empresas competiram no mercado nacional até que, em 1999, a fusão de ambas deu origem à Companhia de Bebidas das Américas (AmBev). Atualmente, a produção de cerveja compõe uma significativa parcela na economia mundial e geração de empregos, com a produção de 1,95 bilhões de hectolitros registrados no ano de 2017 (CONWAY, J., 2018). Além disso, é a terceira bebida mais consumida do mundo, ficando atrás apenas de água e chá, e, entre as alcoólicas, a que apresenta maior consumo (JOFFE, 1998).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial da bebida e, no ano de 2017, foram produzidos 14,1 bilhões de litros de cerveja e mais de 2,7 milhões de empregos diretos e indiretos foram gerados no país (CERVBRASIL, 2019). A indústria cervejeira brasileira possui uma estrutura de oferta que é caracterizada por um oligopólio altamente concentrado (FERRARI, V., 2008). Em contrapartida, no início dos anos 2000, microcervejarias com serviço de bar, restaurante e pista de dança começaram a proliferar em várias regiões do Brasil (VENTURINI, 2000), sendo a Dado Bier de Porto Alegre a primeira microcervejaria do país - fundada nestes moldes, no ano de 1995, em Porto Alegre (REVISTA DA CERVEJA, 2014). Atualmente, o setor microcervejeiro do país alcança a marca de mil cervejarias registradas no ano de 2019 (ABRACERVA, 2019). Apesar destes números, a possibilidade de crescimento do mercado ainda é muito grande, visto que quando se trata do consumo per capita, o Brasil aparece em 31ª posição, com consumo médio de 60 litros por pessoa/ano contra um consumo médio de 144 litros por pessoa/ano da República Tcheca, líder do ranking do consumo per capita (KIRIN HOLDINGS COMPANY, 2017). A partir do ano de 2010, o mercado realmente começou a crescer com a entrada de novas empresas no mercado como, por exemplo, a cervejaria Lagom e a cervejaria Tupiniquim, ambas localizadas na cidade de Porto Alegre (SEBRAE, 2017). Com a expansão da cerveja artesanal, o Brasil fechou o ano de 2018 com 889 cervejarias em operação. Nessa soma estão apenas as que têm fabricação própria, portanto se somadas as

cervejarias ciganas (que usam instalações de terceiros), a quantidade é maior (MAPA, 2019). Ao trazer os dados atualizados, o MAPA destaca que, com o novo regramento sobre o registro de estabelecimentos e produtos, instituído pela Instrução Normativa nº 72 de 16 de novembro de 2018, os processos ganharam mais agilidade e houve um avanço do autocontrole por parte dos produtores. Em 2018, foram concedidos aproximadamente 6,8 mil registros de produtos para cerveja/chope, 210 novas fábricas foram abertas, o que equivale a dizer que a cada dois dias uma cervejaria abriu as portas no país. Na classificação dos municípios com mais estabelecimentos, a cidade de Porto Alegre (RS) está em primeiro lugar. São 35 cervejarias registradas na cidade. A Figura 2 demonstra a tendência de expansão do mercado cervejeiro no Brasil.



Fonte: Elaborado a partir dos dados de registro de estabelecimento do MAPA.

**Figura 2.** Crescimento do número de registros de cervejarias no Brasil.

Fonte: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/a-cerveja-no-brasil>.

## 1.2. Cerveja, processos e matérias-primas

Com relação aos insumos, a cerveja caracteriza-se como “uma bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo de malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo,



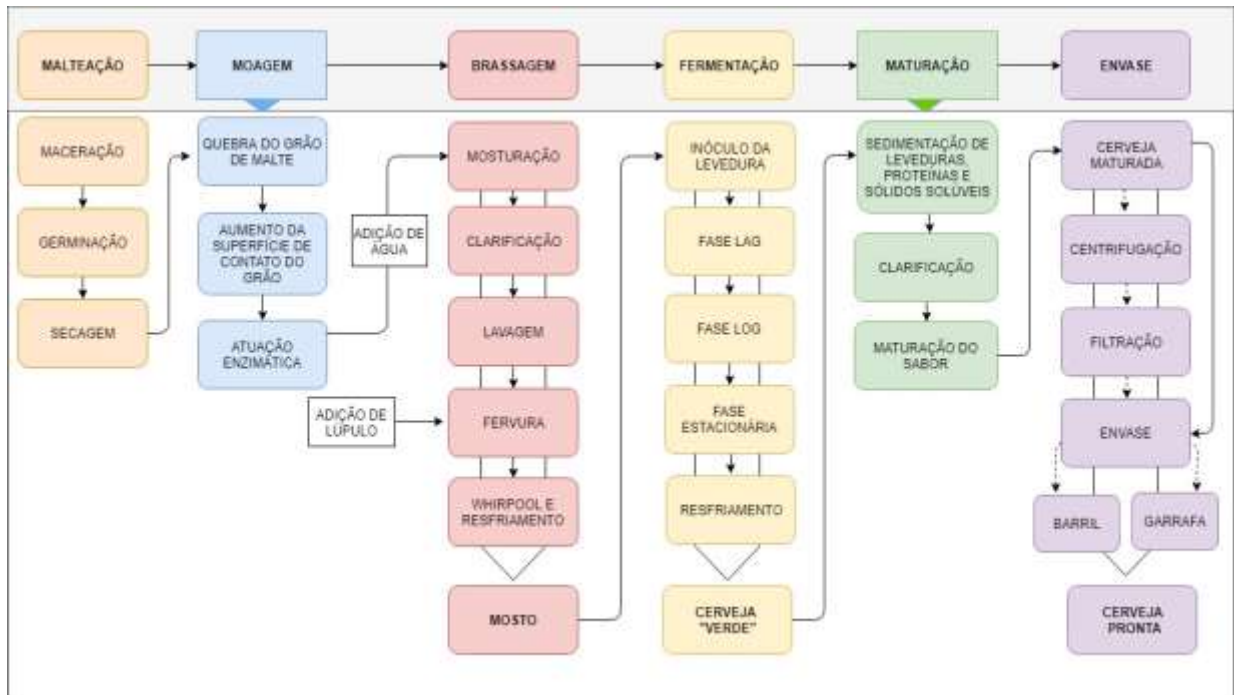
podendo o mesmo ser substituído por seus respectivos extratos” (Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, MAPA). Durante a Alta Idade Média (760 – 1000), a bebida era produzida principalmente em mosteiros. Inicialmente com a Ordem dos Cistercienses, que foi fundada em 1098, quando os monges da abadia beneditina de Molesme partiram para formar seu próprio mosteiro nas proximidades de Cîteaux, na França, com o propósito de restaurar uma literal observância da Regra de São Bento. Em 1152, havia 333 mosteiros cistercienses na Europa. No auge dos anos 1300, eles eram a Ordem religiosa mais poderosa da Europa. Em meados do século XVII, na Abadia de La Trappe, o Abade de Rancé (1626-1700) começa a instituir reformas na Abadia. As reformas, como as reformas iniciais dos cistercienses em 1098, pretendiam retornar a Ordem rebelde para uma forma mais verdadeira de monasticismo beneditino. Aqueles que seguiram os passos dos monges da Abadia de La Trappe ficaram conhecidos como "trapistas" (ou da Ordem dos Cistercienses Reformados), para distingui-los dos monges da Ordem dos Cistercienses da Observância comum (HIERONYMUS, S., 2005; JACKSON, M., 2008). Enquanto os monges levavam uma vida solitária de trabalho e oração, eles também acreditavam em hospitalidade e caridade. Os mosteiros eram conhecidos como locais de refúgio para os viajantes que procuravam um lugar seguro e limpo com comida e bebida decentes (OLIVER, G., 2012). Na maioria dos mosteiros, os monges plantavam seu próprio alimento e faziam sua bebida, assim, cerveja e vinho faziam parte da realidade nos mosteiros e faziam parte da sua dieta (LEROY & GROFF, 2011). Até o século XII era comum a adição de ervas e especiarias, como o gengibre, a canela, o cravo-da-índia, o louro, a sálvia para compor a cerveja (HORNESEY, 2003). A mistura de ervas aromáticas era chamada de *gruit*. Por volta de 1150, Santa Hildegarda de Bingen (1098-1179), a Sibila do Reno, escreveu um tratado sobre botânica que destacava os benefícios do lúpulo para a saúde e da conveniência de seu emprego na fabricação da cerveja. O lúpulo tornou-se popular pelo característico amargor conferido à bebida e também por suas propriedades antimicrobianas (MORADO, 2009). Ainda, foi nesta mesma época que o

mosteiro de Weihenstephan, localizado na região da Baviera, Alemanha, obteve a primeira licença para produção comercial de cerveja, tornando-se a cerveja mais antiga em atividade no mundo (MORADO, 2009).

Em 1516, com a chamada Lei da Pureza (*Reinheitsgebot*), o duque Guilherme IV da Baviera estabeleceu que a bebida somente seria produzida com o uso exclusivo do malte de cevada, do lúpulo e da água. Pelo fato de serem organismos microscópicos, desconhecia-se a existência das leveduras até o final do século XVIII EC, quando foram identificadas como as responsáveis pela fermentação de cereais maltados em cerveja. Inicialmente, acreditava-se que a cerveja passava por um processo de fermentação espontânea. O cientista francês Louis Pasteur (1822-1895) demonstrou pela primeira vez que o fermento consistia em células vivas, responsáveis pelo processo de fermentação (BARNETT, 2000). Na década de 1860, incentivado pela Academia Francesa de Ciências, Pasteur desenvolveu pesquisas acerca das contaminações de vinho e demonstrou que elas eram causadas pela presença de microrganismos. Com o famoso experimento de pescoço de cisne, o cientista prova a teoria da biogênese e desenvolve o método chamado de pasteurização, técnica que consiste no aquecimento dos alimentos até que ele atinja altas temperaturas, seguido do seu rápido resfriamento. Em 1876, Pasteur conduziu uma pesquisa semelhante em relação à cerveja, em sua publicação intitulada "*Etudes sur la Bière*". Na mesma época, o cientista dinamarquês Emil Christian Hansen (1842–1909) estudava os problemas que afetavam a produção de cerveja (MICHEL, 1899). Nos laboratórios Carlsberg, em Copenhague, Hansen isolou a cepa de levedura que era utilizada para a produção de cerveja alemã, a lager. A partir dessas pesquisas, outras cervejarias também puderam começar a produzir cerveja lager, que se popularizou (HORNESEY, 2003; BOULTON & QUAIN, 2001). Estes estudos acerca das leveduras possibilitaram a melhoria do processo fermentativo cervejeiro, sobretudo pela capacidade de isolar culturas puras para inóculo diretamente no mosto e melhorando, conseqüentemente, o produto final (BOULTON & QUAIN, 2001; WHITE & ZAINASHEFF, 2010). As leveduras, então,

tornaram-se alvo de inúmeros estudos e hoje são consideradas como um dos principais modelos de célula eucariótica para estudos bioquímicos (BOULTON & QUAIN, 2001; WHITE & ZAINASHEFF, 2010).

Os processos necessários para a produção de cerveja podem ser divididos da seguinte maneira: malteação, moagem, brassagem, fermentação, maturação e envase, como ilustrado na Figura 3, a seguir.



**Figura 3.** Representação esquemática do processo de fabricação de cerveja. Fonte: própria, 2019.

A etapa de malteação corresponde ao processo de produção de malte. A partir da germinação controlada por um curto período de tempo, o objetivo dessa etapa é o favorecer a modificação do endosperma do grão, ativando e formando enzimas importantes que serão utilizadas durante a brassagem para a degradação do amido em açúcares fermentescíveis (MORADO, 2009). Na malteação há a formação de substâncias corantes e aromatizantes no malte. Após a malteação do grão, é necessário realizar a moagem do malte para o processo de brassagem. Durante a moagem, há o aumento da superfície de contato do grão, possibilitando a quebra do grão de malte e atuação enzimática, bem como a separação das cascas, que

serão utilizadas como material filtrante. Dentre os fatores que influenciam a moagem estão a qualidade e a umidade do malte, o volume de moagem e o tipo de equipamento utilizado.

Inicia-se o processo de brassagem com a mosturação. É necessário misturar o malte com a água e outros adjuntos sólidos ou aditivos (enzimas e sais) em temperaturas controladas e determinado pH para degradação enzimática de componentes do malte (amido, proteínas, hemicelulose e  $\beta$ -glucanos) e para a dissolução de íons como cálcio, magnésio e fosfatos, importantes para a fermentação. A quebra das cadeias de amido é importante para que a levedura, durante o processo de fermentação, tenha acesso à açúcares menores que podem ser consumidos.

Após a mostura, o mosto líquido é separado, fervido com lúpulo, clarificado, depois resfriado e aerado. Durante a fervura o lúpulo é adicionado. Essa planta possui ácidos com propriedades antimicrobianas, dificultando a ação principalmente de bactérias gram-positivas (HAZELWOOD *et al.*, 2010). A oxigenação do mosto é importante para a formação de esteróis e ácidos graxos, essenciais para a síntese da membrana plasmática, reprodução das leveduras e resistência aos diversos estresses fermentativos. A fervura é parte importante do processo, necessária para a evaporação da água excedente, floculação proteica e transferência dos compostos amargos do lúpulo. Também há a inativação das enzimas utilizadas durante o processo de mostura e evaporação de compostos indesejáveis, como sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) e dimetil sulfeto (DMS).

Ao final da fervura, o mosto contém fragmentos suspensos de lúpulo e partículas menores de malte, resíduo conhecido como trub quente (ou *hot break*). Para a separação desse resíduo do mosto que será fermentado, realiza-se o processo de *whirlpool*, onde o mosto é bombeado tangencialmente à parede de uma tina cilíndrica gerando uma correnteza circular. Esse movimento propicia a sedimentação do trub quente, que forma um cone invertido no centro do fundo da tina cilíndrica (KUNZE, W., 2004). O mosto clarificado é então resfriado com um trocador de calor para a

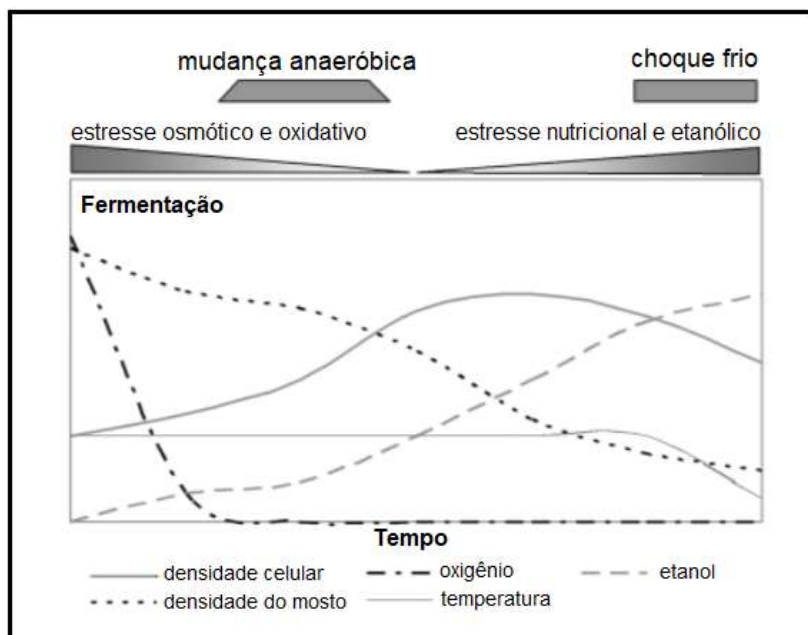
temperatura ideal de inóculo das leveduras. O resfriamento do mosto gera uma segunda sedimentação, chamada de trub frio (ou *cold break*). O trub frio é composto de proteínas, complexos proteína-polifenóis e carboidratos. A presença desse resíduo no mosto pode contribuir para a turbidez da cerveja pronta (SHELLHAMMER, T., 2014). O mosto é oxigenado e transferido para os tanques de fermentação, onde há o inóculo do fermento e o início da fermentação. Quando a fermentação estiver concluída, a cerveja é processada para consumo. A maioria das cervejas está sujeita ao processamento pós-fermentação, que garante um produto embalado que é estável, tanto do ponto de vista microbiológico quanto físico e de sabor. A maturação consiste no armazenamento da cerveja fermentada a baixa temperatura durante um determinado período de tempo, que está diretamente relacionado ao tipo de cerveja produzida. Nessa etapa, há a sedimentação de sólidos solúveis, leveduras e proteínas que estão em suspensão. Os processos seguintes podem envolver a centrifugação, filtração e pasteurização da cerveja (KUNZE, W., 2004).

### 1.3 Fermentação cervejeira e estresses associados à fermentação

A fermentação cervejeira é definida pelo consumo dos açúcares presentes no mosto e metabolização até etanol, dióxido de carbono e compostos aromáticos. Pode ser subdividida em três fases distintas: lag, exponencial e estacionária (LODOLO *et al.*, 2008). Uma vez inoculadas as leveduras ao mosto resfriado, as células passam por um curto período de adaptação ao novo ambiente, que possui diferentes condições de temperatura, pH e uma alta concentração de açúcar. Nessa fase, as células estão bioquimicamente ativas, mas ainda não se dividem (GIBSON, B.R. *et al.*, 2007). Durante a fase lag, as células consomem nutrientes do mosto, bem como disponibilizam as suas reservas intracelulares de glicogênio e trealose para promover a síntese de proteínas, lipídeos de membrana e ergosterol. A fase exponencial ou logarítmica é definida pela forte atividade glicolítica, promovendo o ciclo celular e produção de metabólitos

secundários, como compostos aromáticos. Na fase estacionária, a maioria dos monossacarídeos e dissacarídeos (glicose, frutose, maltose e sacarose) foram consumidos e moléculas aromáticas, como álcoois superiores, ésteres, compostos sulfurados orgânicos e inorgânicos e ácidos orgânicos estão formados. Nessa fase há a reabsorção de diacetila e acetaldeído que, se presentes em altas concentrações, podem contribuir negativamente para as características organolépticas da cerveja (BOULTON & QUAIN, 2001; WHITE & ZAINASHEFF, 2010). Por fim, as leveduras floculam em resposta ao fim da disponibilidade de nutrientes, momento em que a viabilidade celular, bem como a vitalidade, passa a diminuir gradativamente (BOULTON & QUAIN, 2001; WHITE & ZAINASHEFF, 2010). Ao longo do processo fermentativo cervejeiro, as leveduras são expostas a uma ampla variedade de estresses ambientais, como anaerobiose, estresse osmótico devido à alta densidade do mosto, altas concentrações de etanol, limitação de nutrientes essenciais, altas pressões hidrostáticas, choque térmico e longos períodos de estocagem em temperaturas baixas (GIBSON, B.R. *et al.*, 2007). O desempenho da fermentação depende da capacidade de adaptação das células a essas mudanças. A capacidade da levedura em responder de maneira eficaz a estas condições é essencial não só para a produção de cerveja, mas também para manter a aptidão fermentativa dessas células para uso em fermentações subsequentes.

Os principais estresses que ocorrem durante a fermentação cervejeira estão representados esquematicamente na Figura 4.



**Figura 4.** Representação esquemática dos potenciais estresses encontrados pela levedura durante a fermentação cervejeira. Fonte: Adaptado de GIBSON, B.R. *et al.*, 2007.

Durante o processo de fermentação, existem duas fontes principais de estresse osmótico. A primeira envolve a prática de lavagem ácida que é empregada por alguns cervejeiros para remover contaminantes bacterianos (HAMMOND *et al.*, 2001) e/ou para diluir as leveduras de modo que a dispersão seja mais eficiente após a inoculação no fermentador. Lavagens ácidas envolvem a submersão das leveduras em meio ácido para atingir um pH dentro do intervalo de 2,2–2,4, o que pode gerar estresse osmótico devido à abundância de prótons dissociados. A segunda fonte de estresse osmótico envolve a etapa do processo em que a levedura é inoculada no mosto, um meio altamente complexo e concentrado em uma diversidade de açúcares (BRIGGS *et al.*, 2004).

Um produto importante da fermentação cervejeira é também fator estressor para as leveduras. À medida que a fermentação avança, a concentração de etanol no mosto aumenta e as células são expostas a níveis cada vez mais tóxicos do álcool (BRIGGS *et al.*, 2004). Sob condições normais de fermentação, a concentração de etanol fica em um intervalo entre

3-6%, embora sob fermentação de mostos com alta concentração de açúcares, que tem como característica densidades iniciais a partir de 1.060 ou 15 °P, essa concentração pode alcançar 10% (BRIGGS *et al.*, 2004). O estresse etanólico é um dos principais estresses ambientais gerados durante o processo de fermentação. O etanol tem como alvo principal as membranas, aumentando sua fluidez e permeabilidade, afetando o sistema de transporte de compostos essenciais como aminoácidos e glicose. Seu acúmulo compromete uma ampla gama de funções celulares, levando à redução da taxa metabólica celular, crescimento e viabilidade e promovendo uma fermentação mais lenta (ALEXANDRE, H. *et al.*, 2001; GIBSON, B.R. *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo pode ser definido como a resposta a danos celulares gerados por espécies reativas de oxigênio, como ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (GIBSON, B.R. *et al.*, 2007). Esses compostos são gerados como subprodutos durante o metabolismo aeróbico da levedura e podem danificar as macromoléculas celulares, como lipídios, proteínas e DNA. Apesar de sua potencial toxicidade, o oxigênio desempenha um papel essencial no processo de fermentação. Um suprimento de oxigênio adequado é necessário durante os primeiros estágios da fermentação para gerar biomassa e garantir que a levedura esteja em ótimas condições fisiológicas para uma fermentação eficiente (HAMMOND, 2008; HULSE, 2003). O oxigênio é essencial para a síntese lipídica, necessária para manter a integridade e a função da membrana plasmática e para a replicação celular (HAMMOND, 2000; BRIGGS *et al.*, 2004). Ele também é indispensável na biossíntese de esteróis e ácidos graxos insaturados (LORENZ & PARKS, 1991). No entanto, a superexposição das leveduras ao oxigênio nos fermentadores pode favorecer o crescimento celular excessivo em detrimento à produção de etanol (BRIGGS *et al.*, 2004). O dano celular incorrido como consequência da exposição a espécies reativas de oxigênio pode resultar em peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e modificações nas bases do DNA (MARTIN V. *et al.*, 2008).

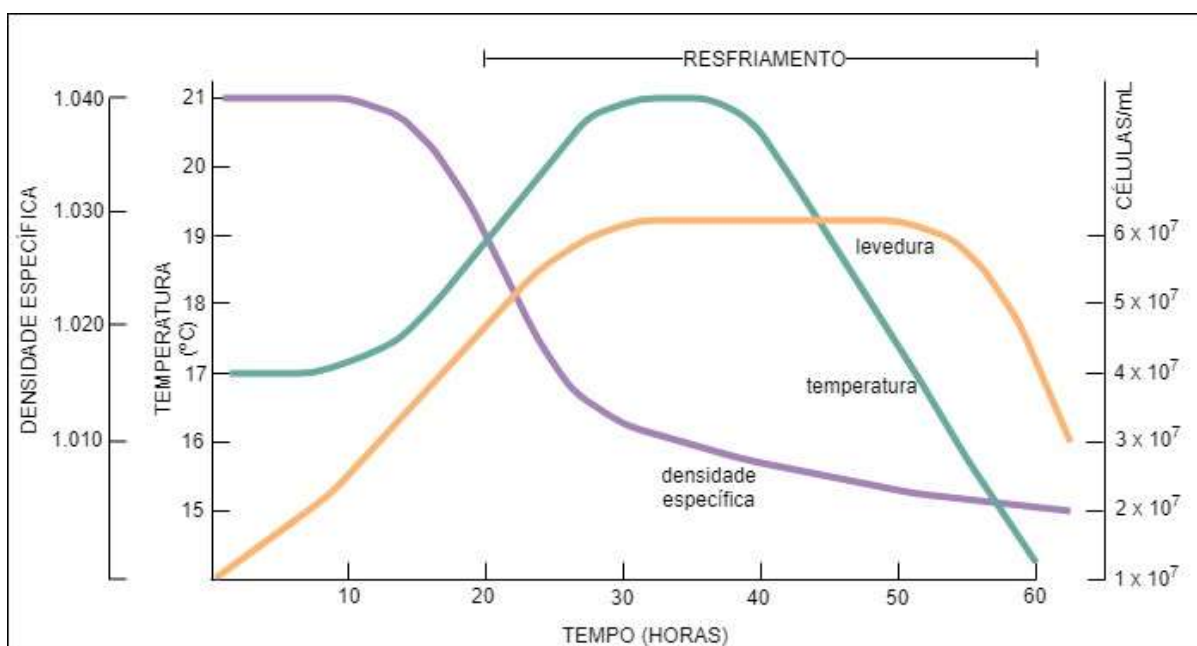


Há também a possibilidade de que uma resposta geral ao estresse seja iniciada em resposta à toxicidade do etanol. O aumento da concentração de etanol durante a fermentação pode estimular a expressão de vários genes, incluindo aqueles envolvidos na proteção contra o estresse osmótico e oxidativo (GIBSON, B.R. *et al.*, 2008).

#### 1.4 Leveduras utilizadas na fabricação cervejeira

As leveduras utilizadas na fermentação cervejeira são tipicamente divididas em dois grupos, leveduras ale e leveduras lager, de acordo com seu uso na produção de cerveja (GIBSON, B.R. & LITI, G., 2015; KODAMA *et al.*, 2006; WENDLAND, 2014). Estes grupos diferem na utilização de açúcar, floculação, produção de compostos e desempenho geral da fermentação (GIBSON, B.R. & LITI, G., 2015; KODAMA *et al.*, 2006; WENDLAND, 2014). As leveduras do tipo ale são chamadas leveduras de alta fermentação devido a sua tendência a se tornarem flutuantes após a floculação e subirem para a superfície do mosto em fermentação, enquanto as leveduras do tipo lager tendem a sedimentar após a floculação, afundam para o fundo do fermentador e são chamadas de leveduras de baixa fermentação. As leveduras lager podem ser divididas em dois grupos genéticos (grupo I, grupo *Saaz/Carlsberg* e grupo II, grupo *Frohberg*) que diferem no desempenho da fermentação, na utilização de açúcar e na adaptação para o crescimento em baixas temperaturas (DUNN, B. & SHERLOCK, G., 2008; GIBSON *et al.*, 2013). *Ales* são cervejas de alta fermentação, produzidas entre 15 °C e 25 °C pela espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizando-se por possuírem propriedades organolépticas mais complexas devido à maior concentração de ésteres e álcoois superiores (SAERENS *et al.*, 2010; AMORIM *et al.*, 2013; BERLOWSKA *et al.*, 2015); *lagers* são cervejas de baixa fermentação, produzidas entre 6 °C e 14 °C pela *Saccharomyces pastorianus*, levedura com perfil fermentativo mais neutro e com maior capacidade de floculação (LIBKIND *et al.*, 2011; BING *et al.*, 2014; HUUSKONEN *et al.*, 2010;

BERLOWSKA *et al.*, 2015). Ainda, as *lambics* são oriundas de fermentações espontâneas com leveduras selvagens geralmente do gênero *Dekkera* (*Brettanomyces*), além de algumas bactérias lácticas e acéticas (BJCP, 2015). O perfil fermentativo típico de produção de cerveja ale está ilustrado na Figura 5.



**Figura 5.** Perfil fermentativo típico para a produção de cervejas ale. Fonte: Adaptado de GIBSON, B.R. *et al.*, 2007.

Atualmente, compõem como principais microrganismos responsáveis pela fermentação cervejeira espécies pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* (LODOLO, KOCK, AXCELL & BROOKS, 2008). *S. cerevisiae* é responsável pela fermentação de cervejas da família ale e abrange o maior número de cepas atualmente disponíveis para uso em cervejarias. *S. pastorianus*, por sua vez, é responsável pela fermentação de cervejas da família lager e, embora apresente menos representantes disponíveis para a indústria, é a espécie mais utilizada mundialmente no setor cervejeiro (GIBSON, B.R. & LITI, G., 2015; WHITE & ZAINASHEFF, 2010). Além dessas espécies, também estão disponíveis leveduras semi-domesticadas, como as espécies do gênero *Brettanomyces*, principal contaminante de

vinhos, porém amplamente utilizada na indústria de cervejas artesanais e crucial para estilos como *Lambic* e *Gueuze*. As cervejas são classificadas de acordo com as leveduras citadas acima. Análises fenotípicas e genotípicas demonstraram que essas espécies apresentam diferenças fundamentais que impactam diretamente nas características das cervejas (WHITE & ZAINASHEFF, 2010). Essas diferenças são o resultado de diferentes pressões seletivas impostas ao longo da história por distintos grupos cervejeiros durante suas fermentações (LEGRAS *et al.*, 2007). Nesse sentido, as escolas cervejeiras alemã, americana, belga e inglesa promoveram a seleção artificial das cepas cervejeiras empregadas em suas indústrias e, dessa forma, favoreceram características fenotípicas distintas (PROTZ, 1995). A diversidade fenotípica encontrada em cepas cervejeiras de *S. cerevisiae* englobam a produção de compostos aromáticos (ésteres, fenólicos, álcoois superiores, diacetila, ácidos orgânicos e compostos sulfurados), floculação, a capacidade de fermentar diferentes carboidratos dissolvidos no mosto, além de apresentarem distintas temperaturas ótimas de fermentação, bem como lidar com condições indutoras de estresse (térmico, osmótico e de pH), características que estão intrinsecamente associadas aos seus genótipos (BOULTON & QUAIN, 2001; WHITE & ZAINASHEFF, 2010).

### 1.5 Leveduras híbridas: surgimento e aplicações

O desenvolvimento de híbridos de leveduras é crucial para a indústria cervejeira, permitindo a elaboração de linhagens com fenótipos fermentativos otimizados. Além das leveduras já amplamente utilizadas na indústria (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*), existe a demanda por microrganismos que apresentem características distintas das presentes nessas variedades, visando o desenvolvimento de novas cervejas (KROGERUS *et al.*, 2015; KROGERUS, 2017). Juntamente à essa busca por novas leveduras, há o aumento do uso de microrganismos selvagens ou semi-domesticados (não-convencionais), como as espécies *Brettanomyces bruxellensis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*,

*Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Pichia kluyveri*, entre outros (MICHEL *et al.*, 2016).

Estudos recentes demonstraram que algumas cepas cervejeiras agrupadas nas espécies *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* são, na verdade, híbridos interespecíficos. Por exemplo, os dois grupos de *S. pastorianus* (Saaz e Froberg) são híbridos compostos por *S. eubayanus* e *S. cerevisiae* (KROGERUS *et al.*, 2015). Além disso, cepas que eram classificadas como sendo da espécie *S. cerevisiae*, como aquelas responsáveis pelas fermentações de cervejas belgas (de abadia ou trapistas) são híbridos naturais de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* (GONZÁLEZ, BARRIO & QUEROL, 2008). O surgimento e estabelecimento de leveduras híbridas no ambiente cervejeiro provavelmente ocorreu devido a vantagens adaptativas dos híbridos quando comparados aos parentais. Nesse sentido, a criotolerância de *S. eubayanus* e a capacidade de metabolizar açúcares complexos como maltotriose de *S. cerevisiae*, possivelmente conferiram a *S. pastorianus* benefícios nos ambientes fermentativos que deram origem às cervejas da família lager (KROGERUS *et al.*, 2015). A descoberta da origem de algumas cepas como sendo híbridas de leveduras gerou subsídios para recriação dessas espécies em laboratório, tornando-se uma importante ferramenta biotecnológica na construção de cepas cervejeiras alternativas que não são geneticamente modificadas (OGM) (KROGERUS *et al.*, 2017). Além disso, auxiliou na compreensão das complexas origens evolutivas de diferentes espécies cervejeiras. A partir desses estudos, foram geradas novas cepas de *S. pastorianus* que tem como características alta atenuação, tolerância aos diferentes estresses fermentativos e melhor performance fermentativa quando comparadas às cepas empregadas na indústria atualmente (MERTENS *et al.*, 2015). Para a construção de cepas híbridas em laboratório existem distintas técnicas moleculares. Dentre elas, a geração de organismos geneticamente modificados (OGMs) (DONALIES *et al.*, 2008). Entretanto, a legislação vigente não permite a utilização de tais organismos na indústria cervejeira e, além disso, há uma baixa aceitação de OGMs por parte da população consumidora (SAERENS, DUONG &

NEVOIGT, 2010). Desta forma, técnicas alternativas para geração de cepas híbridas que não envolvam a engenharia genética para o desenvolvimento de híbridos têm sido valiosas, tanto para a indústria cervejeira quanto para a aceitação do público. Destacam-se os métodos de hibridização interespecífica por formação de esporos e hibridização rara (KROGERUS *et al.*, 2017).

## 1.6 Leveduras selecionadas para hibridização

### 1.6.1 Wallonian Farmhouse Ales (WLN)

Isoladas da região da Valônia, na Bélgica, ilustrado na Figura 6, essas três cepas de levedura (WLN I, WLN II e WLN III) apresentam características únicas e são utilizadas mais comumente na fabricação de cervejas do estilo *Saison* ou *Farmhouse ale*.



**Figura 6.** Mapa da Bélgica. Em destaque, região da Valônia, onde são encontradas as leveduras WLN I, II e III. Fonte: Adaptado de <https://jaysbrewingblog.com/2016/08/10/whats-in-a-style-saison/region/>.

Essas leveduras pertencem a espécie *S. cerevisiae*, e tem como características de fermentação a floculação média, alta produção de ésteres e elevada taxa de atenuação, ou seja, consomem grande parte dos açúcares disponíveis no mosto, gerando uma cerveja de aspecto e final seco. Cervejas

fermentadas com as leveduras WLN possuem um leve caráter *funk*, e também alguns compostos de sabor ligeiramente picantes e levemente defumados. Quando fermentadas a baixas temperaturas, essas leveduras apresentam um perfil limpo, e as características marcantes de fermentação se desenvolvem proporcionalmente ao aumento da temperatura. Devido aos atributos fermentativos e às altas taxas de atenuação, as cepas de *farmhouse ales* são bastante promissoras para o uso em programas de hibridização.

#### 1.6.2 *Saccharomyces kudriavzevii* (NCYC 2889)

A levedura *Saccharomyces kudriavzevii* é uma espécie de levedura pertencente ao complexo *Saccharomyces sensu stricto*. Isolada de ambientes naturais e matéria orgânica, como folhas em decomposição (NAUMOV *et al.*, 2000; GONZÁLEZ *et al.*, 2007; SAMPAIO & GONÇALVES, 2008), essa levedura tem a capacidade de formar compostos fenólicos como o 4-vinil guaiacol, que remete à especiarias, temperos e cravo, crescimento ótimo a baixas temperaturas (criotolerância) e alta produção de glicerol, composto que confere corpo à cerveja (ZHAO, X. *et al.*, 2015). Todas as características anteriormente citadas são muito interessantes sob o ponto de vista industrial, uma vez que vários estilos cervejeiros se beneficiam desses atributos. Apesar de ser uma levedura que apresenta produtos de fermentação valorosos, as cepas de *S. kudriavzevii* não apresentam fermentação tão eficaz, demonstrando baixa taxa de atenuação e grande quantidade de açúcar residual. Uma vez que as linhagens híbridas podem ter qualidades fenotípicas superiores em relação às cepas parentais e que há uma crescente demanda dos clientes por diversidade de produtos, *S. kudriavzevii* pode contribuir de maneira significativa na construção de híbridos de levedura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Gerar novas cepas híbridas de levedura entre *Saccharomyces cerevisiae* oriundas da região da Valônia e *Saccharomyces kudriavzevii*.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a adaptabilidade de três cepas de *farmhouse ale* belga isoladas da região da Valônia (WLN I, II e III) aos estresses oriundos do processo fermentativo em comparação com as cepas de levedura *SafAle*<sup>TM</sup> US-05 (levedura ale), *SafLager*<sup>TM</sup> W34/70 (levedura lager), *farmhouse ale* norueguesa *Voss Kveik* (The Yeast Bay<sup>TM</sup>), CAT-1 (levedura produtora de bioetanol) e BY4741 (levedura de laboratório);
2. Gerar cepas híbridas de *S. cerevisiae* (WLN III) e *S. kudriavzevii* pelos métodos de hibridização rara (formação de híbridos alotriploides e alotetraploides);
3. Avaliar marcadores de hibridização com o uso de ferramentas de biologia molecular;
4. Avaliar a formação de compostos aromáticos e capacidade de atenuação dos híbridos em mosto cervejeiro lupulado de pequena escala.

### 3 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

3.1 Artigo em fase inicial de redação intitulado: “Farmhouse ale yeast strains from Belgium and Norway as chassis for interspecific hybridizations” que será submetido ao periódico *Yeast*. Este manuscrito contém também dados referentes a hibridização com a cepa *S. cerevisiae* Voss *Kveik*, que não são abordados em outras seções da dissertação por fazerem parte da dissertação de mestrado do co-autor Marcelo Menoncin.

#### **Farmhouse ale yeast strains from Belgium and Norway as chassis for interspecific hybridizations**

Bianca de Paula Telini, Marcelo Menoncin and Diego Bonatto\*

Brewing Yeast Research Group, Biotechnology Center of the Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Short title:** Hybrids and Farmhouse ales

**\*Corresponding author:**

Diego Bonatto

Centro de Biotecnologia da UFRGS - Sala 107

Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Avenida Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43421

Caixa Postal 15005

Porto Alegre – Rio Grande do Sul

BRAZIL

91509-900

Phone: (+55 51) 3308-7765

E-mail: diegobonatto@gmail.com

Contract/grant sponsor: CNPq



## Abstract

The utilization of alternative interspecific brewing yeasts is growing in response to new industry demands such as fast fermentation and broad variety of pleasant volatile compounds production. In the present work, we generated six unique hybrids between cold and stress-tolerant wine and beer-associated *S. kudriavzevii* and two strains of heat and stress-tolerant *S. cerevisiae* isolated from farmhouse brewing-related environments, Walloon (Belgium) and Voss (Norway). All hybrids display an accumulation of the parental characteristics like good performance at low and high temperatures, fermenting complex carbohydrates from malt-derived brewing wort and reaching high attenuation apparent degree, sometimes fermenting faster than the parental strains, in an indication of heterosis. Tests in beer wort exhibited final pH values expected for regular beers after fermentation in the temperatures of 17 °C and 25 °C. Further, it was identified in beer fermented with the hybrids, pleasant fruity volatile compounds like the esters ethyl pentanoate (red apple and melon), ethyl hexanoate (apple and aniseed), ethyl cinnamate (fruity) and phenethyl acetate (sweet, honey and floral), compounds that were produced above the threshold exclusively by hybrids at the temperature utilized in the fermentation tests (25 °C) along with other compounds such ethyl butanoate (pineapple, mango, tropical fruit), diethyl succinate (fruity) and ethyl decanoate (brandy, fruity and grape) that was also produced in perceptible levels by the parental strains. The results of this research indicate a possibility for a broad application of KKH1-KKH3 and KWH1-KWH3 hybrids in the industry, including those of bioethanol, wine and beer.

## Introduction

The diversity of fermented beverages currently available reflects the nutritional resources that early humans had (e.g. wheat and barley) along with the indigenous microorganisms that had eventually fermented sugars from these grains (yeasts and bacteria). The domestication process of yeast is strictly associated with the diversity of fermented beverages. In this sense, beer is a beverage with a high variety of yeast associated with its fermentation, and is highly appreciated and consumed worldwide. Two major species are used in brewing industry, *Saccharomyces cerevisiae* (top-fermented, ales) and *Saccharomyces pastorianus* (bottom-fermented, lagers). Two examples of farmhouse-shared yeasts are those responsible for fermentation of Belgian Saison originated in the region of Wallonia, Belgium, and Kveik yeast, which is responsible for the fermentation of the Norwegian farmhouse ales (Markowski, 2004; Preiss, Tyrawa, Krogerus, Garshol, and Van Der Merwe, 2018; Preiss *et al.*, 2017; Rasmussen, 2016). In a recent work, Kveiks were considered a distinct group of domesticated *S. cerevisiae* brewing yeast, and many strains were identified as interspecific hybrids (Gallone *et al.*, 2016; Garshol and Preiss, 2018; Preiss *et al.*, 2018, 2017). The main example is the yeasts responsible for the most worldwide consumed beer style Lite Lager *S. pastorianus* which is a hybrid between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces eubayanus* (B, De Barros Lopes, Bellon, Shirley and Ganter, 2002; Dunn and Sherlock, 2008; Libkind *et al.*, 2011). Moreover, it was found that some of the Belgian Trappist yeast strains are hybrids between *S. cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* (González, Barrio and Querol, 2008). Furthermore, in brewing, it was recently found a Kveik hybrid yeast among *S. cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* (Krogerus, Preiss and Gibson, 2018). It is known that hybrids use to perform better than the parental strains in brewing environment, a condition termed “heterosis” (Krogerus, 2017). In heterosis, hybrids aggregate resources from both parental species, resulting in a strain with more increased adaptability. For example, lager yeast *S. pastorianus* thrive in low temperature fermentations (*S. eubayanus*-linked feature) and, at the same time, has a good capacity in fermenting mono-, di-, and tri-saccharides (*S. cerevisiae*-linked resource). Similarly, some Trappist Belgian yeast strains display cold-tolerance capacity due to effective protein translation and stress-related mechanisms from *S. kudriavzevii* along with fermentation of complex sugars from *S. cerevisiae*. In the present study, we have constructed interspecific hybrids between *S. cerevisiae* strains from farmhouse-associated brewing

(Norwegian farmhouse ale and Belgian Saison) and *S. kudriavzevii* type strain. Looking for relevant traits towards brewing industry, we performed fermentation tests of six chosen hybrids in hopped 12 °P beer wort provided from a local brewery. Parameters such as fermentation capacity (% attenuation rate), temperature range (15-35 °C), generation of main beer-associated volatile compounds (alcohols, vicinal diketone, acetaldehyde and esters) and final pH indicates a promising application of this set of unique hybrids in the brewing industry.

## Material and Methods

### Yeast strains

The *S. cerevisiae* yeast strains used in this work was chosen for its fermentative characteristics (high attenuation degree and biosynthesis of pleasant esters and phenols) and *S. kudriavzevii* for its cryotolerance and biosynthesis of phenols. The yeasts are summarized in Table 1. The cultures are stored in -80 °C freezer in 15% (v/v) liquid medium with glycerol and YPMG (3 g. L-1 yeast extract, 3 g. L-1 malt extract, 5 g. L-1 peptone and 10 g. L-1 glucose).

**Table 1.** Yeast strains used in this work.

Strain <sup>a</sup>	Specie	Source
NCYC 2889 <sup>T</sup>	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	National Collection of Yeast Cultures (NCYC <sup>TM</sup> ), London, UK
Voss Kveik	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	The Yeast Bay <sup>TM</sup> , San Leandro, EUA
Wallonian Farmhouse Ale III	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	The Yeast Bay <sup>TM</sup> , San Leandro, EUA
KKH1, KKH2 and KKH3	<i>S. kudriavzevii</i> x <i>S. cerevisiae</i> (Voss Kveik)	This study
KWH1, KWH2 and KWH3	<i>S. kudriavzevii</i> x <i>S. cerevisiae</i> (Wallonian Farmhouse Ale III)	This study

<sup>a</sup>T = type strain

## **Design of interspecific hybrids by rare hybridization**

Natural auxotrophic mutants (*lys-* and *ura-*) of the parental strains were selected on  $\alpha$ -aminoadipic and 5-fluoroorotic acid agar plates, respectively as described by (Boeke, Trueheart, Natsoulis and Fink, 1987). Auxotrophy was confirmed by the inability to grow on minimal selection agar medium (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 3% glycerol, 3% ethanol and 2% agar). A suspension of vegetative cells from *S. kudriavzevii ura-*, *S. cerevisiae* WLNIII and *S. cerevisiae* Voss Kveik *lys-* was grown overnight at 25 °C by inoculating a single colony into 50 mL of YPM. The culture was centrifuged at 5000×g for 5 min, after which the cells were first washed once and then resuspended in sterile H<sub>2</sub>O to a concentration of 10 g centrifuged wet yeast mass L<sup>-1</sup>. One hundred  $\mu$ l of the resulting suspensions from both parental strains, with complementary auxotrophic markers, were transferred together to 1 ml YPM medium in a sterile 2 ml Eppendorf tube. The tubes were vortexed and incubated statically at 25 °C for 7 days. After incubation, the tubes were centrifuged at 5,000×g for 5 min and the supernatant was removed. 500  $\mu$ l of starvation medium (0.1 % yeast extract and 0.1 % glucose) was added, and tubes were incubated for at least 2 h at room temperature. Tubes were then vortexed and 100  $\mu$ l aliquots were spread onto minimal selection agar (without uracil or lysine). Plates were incubated at 25 °C and prototrophic colonies appeared after 3–7 days.

## **Hybrid analysis by PCR and RFLP**

Genomic DNA was extracted using the YeaStar™ Genomic DNA kit (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. DNA concentrations were measured on a NanoDrop 2000 spectrophotometer (wavelength 260 nm) (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). DNA purification was made using Monarch® Genomic DNA Purification Kit (New England Biolabs Inc, Ipswich, Massachusetts, USA) following the manufacturer's recommendations. The extracted genome was used to confirm the hybridization status by amplification of rDNA-PCR (ITS1 and ITS2) using the primers ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), and digestion of amplicons using the *HaeIII* restriction enzyme (New England BioLabs, USA) as described previously (Pham *et al.*, 2011). The six hybrid strains (from *S. kudriavzevii* X WLNIII and from *S. kudriavzevii* x Voss Kveik) that were chosen for further characterization were named KKH1, KKH2 and KKH3 (*S.*

*kudriavzevii* x Voss Kveik hybrids) and KWH1, KWH2 and KWH3 (*S. kudriavzevii* X WLNIII hybrids), showed in Table 1.

### **ITS sequencing and assembling**

The internally transcribed spacer (ITS) regions of the yeast strains were amplified using ITS1 and ITS4 primers (Pham *et al.*, 2011). Sequencing of samples was performed by ACTGene Análises Moleculares Ltd. (Center for Biotechnology, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using the automatic sequencer AB 3500 Genetic Analyzer equipped with 50 cm capillaries and POP7 polymer (Applied Biosystems). DNA templates were labeled with 2.5 pmol of the specific primer and 0.5 µL of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in a final volume of 10 µL. Labeling reactions were performed in a LGC XP Cycler with an initial denaturing step of 96 °C for 3 min followed by 25 cycles of 96 °C for 10 sec, 55 °C for 5 sec and 60 °C for 4 min. Labeled samples were purified by 75% isopropanol precipitation followed by 60% ethanol rinsing. Precipitated products were suspended in 10 µL Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems), denatured at 95 °C for 5 min, ice-cooled for 5 min and electroinjected in the automatic sequencer. Sequencing data were collected using the software Data Collection 3 (Applied Biosystems) programmed with the following parameters: Dye Set “Z”; Mobility File “KB\_3500\_POP7\_BDTv3.mob”; BioLIMS Project “3500\_Project1”; Run Module 1 “FastSeq50\_POP7\_50cm\_cfv\_100”; and Analysis Module 1 “BC-3500SR\_Seq\_FASTA.saz”. Resulting Data Collection files (.ab1; electropherograms) were converted into FASTA files (.seq; text) by the Sequence Analysis Software v. 6 (Applied Biosystems) with standard parameters. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The optimal tree with the sum of branch length = 3.25464950 is shown (Figure 3). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method (Kimura M, 1980) and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 12 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1102 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamuka K, 2018).

## **Hybrid selection to further characterization**

The hybrid selection criteria was based on a previous fermentation trials in ELISA plates in which 3 mL of 1.044 kg/m<sup>3</sup> malt extract wort with pre-isomerized hop extract Tetrahop (up to 10 IBU) (Barth-Hass) was inoculated with ~10<sup>8</sup> cells/mL of the hybrids KKH1-KKH10 and KWH1-KWH10 (cultivation in 50 mL flasks for 2 days containing YMPG at room temperature of 23 °C). The density was measured daily utilizing a handheld ATC (automatic temperature compensation) portable refractometer. The strains that achieved the higher attenuation level was chosen for further characterization.

## **Wort preparation and Laboratory Scale Wort Fermentations**

The wort used for beer fermentations was obtained from Tupiniquim Brewery (Porto Alegre, RS, Brazil). The 12 IBU hopped wort was made using Brazilian 2-row malt to an original specific gravity of 1.045 kg/m<sup>3</sup>. The wort was boiled for 60 minutes prior to use and cooled to the desired temperature utilizing the brewery heat exchanger. Fermentations were performed in 1000 mL fermenters containing 800 mL of wort. Yeast cells were first grown in 50 mL flasks for 2 days containing YMPG at room temperature. These precultures were used to inoculate fermenters equipped with airlocks to maintain anaerobiosis at a density of ~10<sup>8</sup> cells/mL. The temperature was kept constant during the whole length of the fermentation at either 17°C, 25 °C and 35 °C.

## **Wort and beer analysis**

The specific gravity of samples was determined from the degassed fermentation samples using an Anton Paar Alcohol and Extract Meter Alex 500 (Anton Paar GmbH, Austria). The pH was measured utilizing an AK90 pHmeter (Akso, Sweden). Identification and quantification of volatile yeast-derived flavor compounds were performed on a Perkin Elmer Clarus 680 GC (USA) gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) and Clarus GC software. Chromatographic separation was performed using a ZB-WAXplus column (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) from Zebron (USA) and helium gas as a carrier at a flow rate of 1.0 mL.min<sup>-1</sup>. Temperature programming was performed at an initial oven temperature of 40°C for 5 minutes, increasing by 2 °C per minute to 220 °C. Positive compound identification was performed by comparing the retention time obtained for the sample against the volatile compound standards injected under the same conditions.

Quantification was performed by internal standardization with 3-octanol according to Arcari *et al.* (2017).

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed on the fermentation and metabolite data utilizing one-way ANOVA and Tukey's test employing the "agricolae" package in R (<http://www.r-project.org/>).

## **Results and Discussion**

### **Hybrid construction and confirmation**

The type strain of *S. kudriavzevii* NCYC2889 (Table 1) was successfully hybridized with Wallonian III and Voss Kveik through the rare mating of *lys*- and *ura*-auxotrophic diploid parental cells, respectively. Hitherto, it was generated 100 possible allotetraploid hybrids in which 50 are *S. kudriavzevii* NCYC2889 x Voss Kveik and 50 *S. kudriavzevii* NCYC2889 x *S. cerevisiae* (Wallonian III) (KKH1-KKH50 and KWH1-KWH50). From the 100 candidates, 20 was already confirmed as hybrids. The confirmation of hybridization was performed utilizing (i) growth in minimal medium, (ii) amplification of the polymorphic ITS1/ITS2 region by PCR with further RFLP in which the amplicon (~880 bp) was digested with *HaeIII* restriction enzyme generating a pattern of ~ 320 bp, ~240, bp, ~180 bp and ~140 bp for *S. cerevisiae*, ~484 bp, ~229 bp, ~123 bp and ~5 bp for *S. kudriavzevii* and for the hybrids, a sum of the parental patterns (Figure 1), (iii) sequencing of the ITS1/ITS2 region with further alignment using all the possible hybrids and the parental species. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA X (Figure 3). *Candida glabrata* (*Nakaseomyces/Candida* clade), *Kluyveromyces lactis* (*Kluyveromyces* clade), and *Cryptococcus neoformans* (*Filobasidiella* clade) were tested as outgroup species. The ITS region was used to confirm species identification due to its status as a barcode gene. The analysis of the sequences showed that the hybrids strains have a higher identity with sequences corresponding to *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* species rather than the outgroup species. The KKH1-KKH3 and KWH1-KWH3 strains were identified as *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*-type hybrids based on internally transcribed spacer (ITS) sequencing that differentiates from the original parental ITS sequence.

## Laboratory fermentations

For the fermentation tests, it was chosen three interspecific hybrids (KKH1-KKH3) derived from hybridization between *S. kudriavzevii* NCYC2889 and *S. cerevisiae* (Voss Kveik) and three hybrids (KWH1-KWH3) from *S. kudriavzevii* NCYC2889 and *S. cerevisiae* (Wallonian III). All hybrids have displayed good attenuation performance, reaching values between 86 % (KKH1-KKH3) and 92.8 % (KWH1-KWH3) (Figure 2). Taking in consideration that *S. kudriavzevii* NCYC2889 parental strain does not ferment maltotriose and dextrans, the attenuative capacity comparisons of its hybrids was made with the *S. cerevisiae* parental strains (Voss Kveik and Wallonian III) that are able to ferment complex sugars (maltotriose in the case of Voss Kveik and maltotriose/dextrans in the case of Wallonian III). The tests performed in 12 °P in beer 20 IBU hopped wort at 25 °C (pH  $5.45 \pm 0.2$ ) indicates that KKH1-KKH3 performed significantly better than the Voss Kveik parental species, reaching the final gravity ( $1.006 \text{ kg/m}^3 \pm 0.0003$ ) after 144-168 hours, 24 hours before Voss Kveik ( $P < 0.001$ , one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test). On the other hand, KWH1-KWH3 reached final gravity ( $1.003 \text{ kg/m}^3 \pm 0.001$ ) after 168 hours of fermentation, 24 hours after parental strain Wallonian III being significantly sluggish than parental ( $P < 0.001$ ). Regarding the fermentation test made in 35 °C, a similar pattern, thought, was observed between KKH1-KKH3 and Voss Kveik performances, reaching final gravity ( $1.006 \text{ kg/m}^3 \pm 0.001$ ) in 72-96 hours ( $P < 0.001$ ). Concerning KWH1-KWH3 and Wallonian III in high temperature fermentation, similarly with the behaviour at 25 °C, the parental strain fermented significantly faster ( $P < 0.001$ ) than the hybrids KWH1 and KWH3, although both attenuated to the final gravity of  $1.003 \text{ kg/m}^3 \pm 0.001$  after 120-144 hours. Interestingly, at 17 °C, Voss Kveik, Wallonian III and its hybrids reached low final gravities with similar values than 25 °C and 35 °C ( $1,006 \pm 0.001$  for kveik-derived hybrids and  $1,023 \pm 0.001$  for Wallonian III-derived hybrids) but, for it, it was necessary more 24-96 hours of fermentation (KWH1-KWH3 significantly slower than parental,  $P < 0.001$ ). Usually, the wort initial pH has values near 5.00 while in the end of fermentation the pH has dropped to approximately 4 and this is often left without measurement (Boulton and Quain, 2001). For our tests, the initial pH was a standard beer wort value of  $5.45 \pm 0.2$  for all samples. The final pH values are summarized in the table 2. For the fermentation at 25 °C, the final pH value was, in average,  $4.20 \pm 0,2$  for all strains including the hybrids. On the other hand, for fermentations at 35 °C the yeasts displayed a lower pH (KKH3 showed a pH of 3.71) wherein



KKH1-KKH3 presented a slightly higher pH than the Voss Kveik parental strain (3.70) with the following values 3.79, 3.86 and 3.76, respectively. By its turn, KWH1-KWH2 demonstrated values of 3.79 and 3.77 compared to 3.92 of the parental Wallonian III strain. The final pH of the test in 17 °C indicates that KKH1 got a pH 3.87 in comparison of 4.01 from Voss Kveik and 4.21 and 4.19 for KKH2 and KKH3, respectively. On the other hand, the pH values for KWH1-KWH3 was 3.88, 3.85 and 3.86 versus 3.78 from Wallonian III. It has been recently shown that there is a search for natural-acidifying yeast in order to produce sour beers without the need for mixed fermentation between brewing yeast and acid-producing bacteria (e.g. *Lactobacillus* and *Pediococcus*) as in the case of *Lachancea thermotolerans* (Domizio, House and Joseph, 2016). A slightly tart/sour beer pH reached at 35 °C range indicates a high release of organic acids, being possibly interesting to the application in the sour beer market).

**Table 2.** Final pH values in the different temperature conditions (17 °C, 25 °C and 35 °C). Initial pH for all samples were  $5.45 \pm 0.2$ .

	NCYC2889	VOSS KVEIK	WLN III	KKH1	KKH2	KKH3	KWH1	KWH2	KWH3
17 °C	4.22	4.01	3.78	3.87	4.21	4.19	3.88	3.85	3.86
25 °C	4.20	4.31	4.27	4.27	4.39	4.40	4.21	4.13	4.15
35 °C	4.14	3.70	3.92	3.79	3.86	3.76	3.79	3.77	3.71

## Flavour-active compounds in beers

We performed fermentation trials in a common Pilsner wort aiming the analysis of attenuation performance and production of volatile compounds by-products. From the 42 compounds tested, it was observed a production above the threshold of 12 of them (Table 3). From these 11 compounds, only 5 was identified above the threshold in the samples fermented with the parental strains (ethyl butanoate, isovaleric acid, ethyl decanoate, diethyl succinate and  $\gamma$ -nonalactone), in which 2,3-butanedione and ethyl decanoate was present in the Wallonian III strain, but no in its hybrids. By its turn, ethyl butanoate was detected above the threshold only in NCYC2889 and its hybrids KKH2 and KKH3 in which the hybrids produced significantly more than NCYC2889 ( $P < 0.001$ ). Interestingly, ethyl hexanoate was found only in the hybrids KKH1 and KWH1 and phenylethyl acetate only in KKH3 and KWH1. Furthermore, the following compounds was produced just by KKH1: ethyl acetate, acetaldehyde and ethyl pentanoate along with 2,3-pentanedione that was not produced by its parental strains. Besides that, ethyl decanoate was produced only for KWH3 and not by any of its parental strains. Intriguingly, diethyl succinate was detected above the threshold by all strains tested but KKH2 (KKH3, KWH1 and KWH3 produced significantly more than NCYC2889 and KWH3 produced significantly more than WLNIII,  $P < 0.001$ ). It is interesting to note, however, that diethyl succinate (fruity flavour) is a sign of beer aging (esterification of ethanol with succinic acid). The following compounds was also found above the threshold: isovaleric acid (5/9 of the strains tested) and  $\gamma$ -nonalactone (6/9 of the strains tested) which are probably hop-derived compounds (Meilgaard, 1982; Leffingwell, 1978; Vanderhaegen *et al.*, 2003; Preiss *et al.*, 2018).

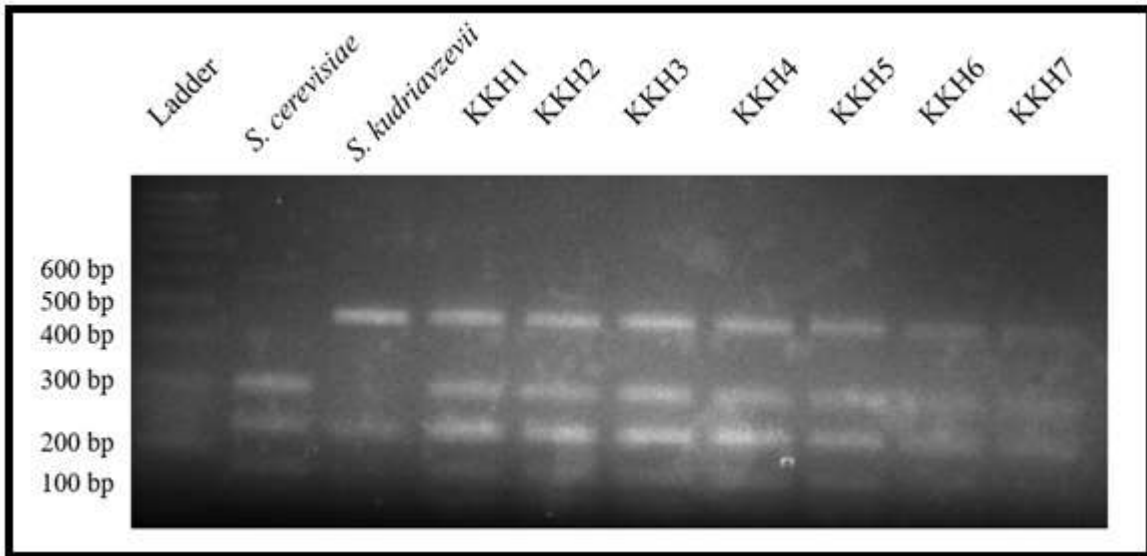
**Table 3.** Triplicate average values in mg/L (ppm) of the volatile compounds quantified by GC-FID in the temperature condition tested (25 °C). Light blue indicates flavour compounds identified above the threshold and dark blue, compounds produced above the threshold and significantly higher than one or both parental species (P < 0.001, one-way ANOVA). x= undetected.

Compound (Threshold)	NCYC2889	VOSS KVEIK	KKH1	KKH2	KKH3
Ethyl acetate (30 ppm)	0,91777	1,87405	113,06717	0,3231667	22,804147
Acetaldehyde (10-20 ppm)	3,75435	1,47499333	31,98429	10,5024	3,82546
2,3-butanedione (0,07 ppm)	x	0,05825	0,0754333	0,06419	0,05522
Ethyl butanoate (0,4 ppm)	0,52662333	0,06753	0,1565267	0,9872	1,17785
Ethyl pentanoate (0,9 ppm)	0,02531333	0,13185	1,4781367	0,6059133	X
Ethyl hexanoate/Ethyl caproate (0,21 ppm)	x	x	0,29266	x	x
Isovaleric acid (0,5 ppm)	x	x	2,0776133	2,17875	0,5619233
Ethyl decanoate (0,2 ppm)	0,02484667	x	0,00335	0,1039367	0,3057733
Diethyl succinate (1,2 ppm)	1,58491	5,6216	2,44248	0,4343333	6,83862
Phenethyl acetate (3,8 ppm)	0,05854	0,11247333	x	x	19,662967
$\gamma$ -nonalactone (0,042 ppm )	0,49202333	x	x	x	0,2807633
Ethyl cinnamate ( $\mu$ g/L) (0,016 ppm)	x	x	0,12451	0,3531633	x
Compound (Threshold)	NCYC2889	WLNIII	KWH1	KWH2	HWH3
Ethyl acetate (30 ppm)	0,91777	1,85869	21,87961	0,20303	0,0376933
Acetaldehyde (10-20 ppm)	3,75435	1,67874333	x	5,02737	x
2,3-butanedione (0,07 ppm)	x	0,06786333	0,0566467	0,0543	x
Ethyl butanoate (0,4 ppm)	0,52662333	0,03925	0,10309	0,03979	0,24708
Ethyl pentanoate (0,9 ppm)	0,02531333	0,14719	x	x	x
Ethyl hexanoate/Ethyl caproate (0,21 ppm)	x	x	0,23175	x	x
Isovaleric acid (0,5 ppm)	x	0,64379	x	x	1,26375
Ethyl decanoate (0,2 ppm)	0,02484667	2,07726333	x	0,0878733	0,0024067
Diethyl succinate (1,2 ppm)	1,58491	5,76641	6,2700733	3,0331	10,166037
Phenethyl acetate (3,8 ppm)	0,05854	0,33985333	21,61878	x	0,0129
$\gamma$ -nonalactone (0,042 ppm )	0,49202333	0,75805	0,71078	0,2913	0,5599933
Ethyl cinnamate ( $\mu$ g/L) (0,016 ppm)	x	x	x	x	x

## Conclusion and perspectives

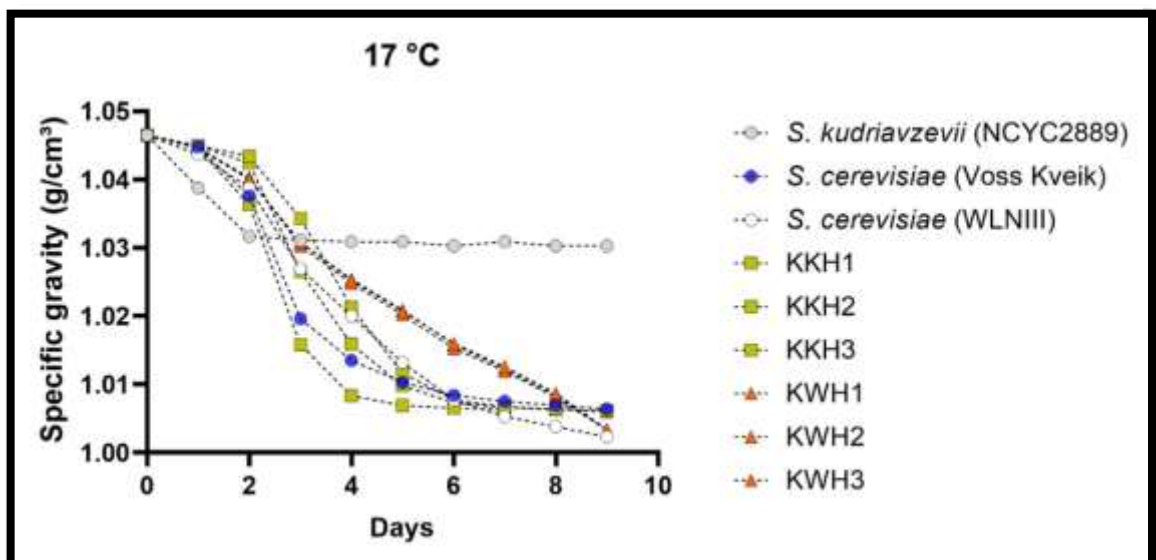
In the current work, we have generated six unique hybrids between *S. kudriavzevii* and two strains *S. cerevisiae* isolated from farmhouse brewing-related environments. From the tests regarding attenuation levels and biosynthesis of aromatic compounds, the hybrids performed in a fashion that aggregate characteristics from the parental strains. Further molecular and phenotypic studies are necessary to elucidate the role of ester-associated genes *ATF1* and *ATF2* for the biosynthesis of the esters above (Meilgaard, 1982; Pires, Teixeira, Brányik, and Vicente, 2014; Verstrepen *et al.*, 2003). Furthermore, it is necessary to investigate *PADI* and *FDC1* functionality by accessing the development of phenolic compounds such as 4-vinylguaiacol (4-VG) during fermentation through the quantification by GC-FID and subsequent sequencing of these genes in order to evaluate the presence or absence of mutations that allows its enzyme functionality or unfunctionally (McMurrough *et al.*, 1996; Mukai, Masaki, Fujii and Iefuji, 2014; Mukai, Masaki, Fujii, Kawamukai and Iefuji, 2010). Besides that, the flocculation capacity, which is related mainly to *FLO1*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10* and *FLO11* needs to be explored as well as the consumption of glucose, fructose, sucrose, maltose, maltotriose and dextrans by utilization of HPLC technique and sequencing of dextrin fermentation related gene *STA1* which encodes to a glucoamylase enzyme (Krogerus, Magalhães, Kuivanen and Gibson, 2019; Vidgren, Londesborough and Brew, 2011). On the other hand, the characteristics studied in the present research gathered together indicates a possibility for a broad range of application of KKH1-KKH3 and KWH1-KWH3 in the fermentative industry, including those of bioethanol, wine and, specially, the brewery sector.

**Figures**

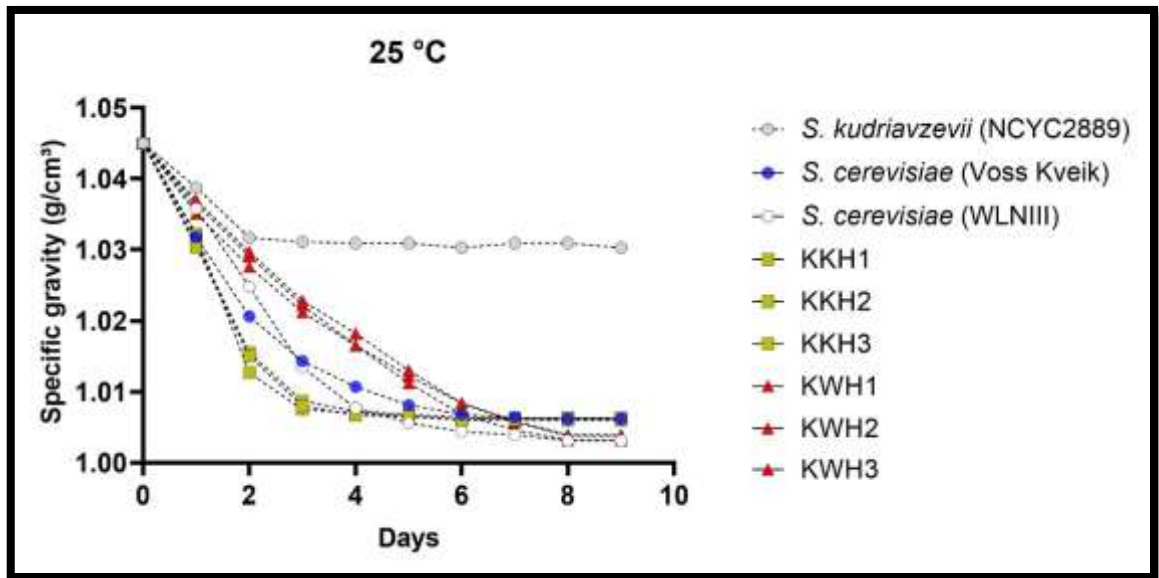


**Figure 1.** Hybridization confirmation of the the *S. kudriavzevii* and *S. cerevisiae* (Voss Kveik) possible hybrids KKH1-KKH3 via ITS1/ITS4 PCR-RFLP analysis.

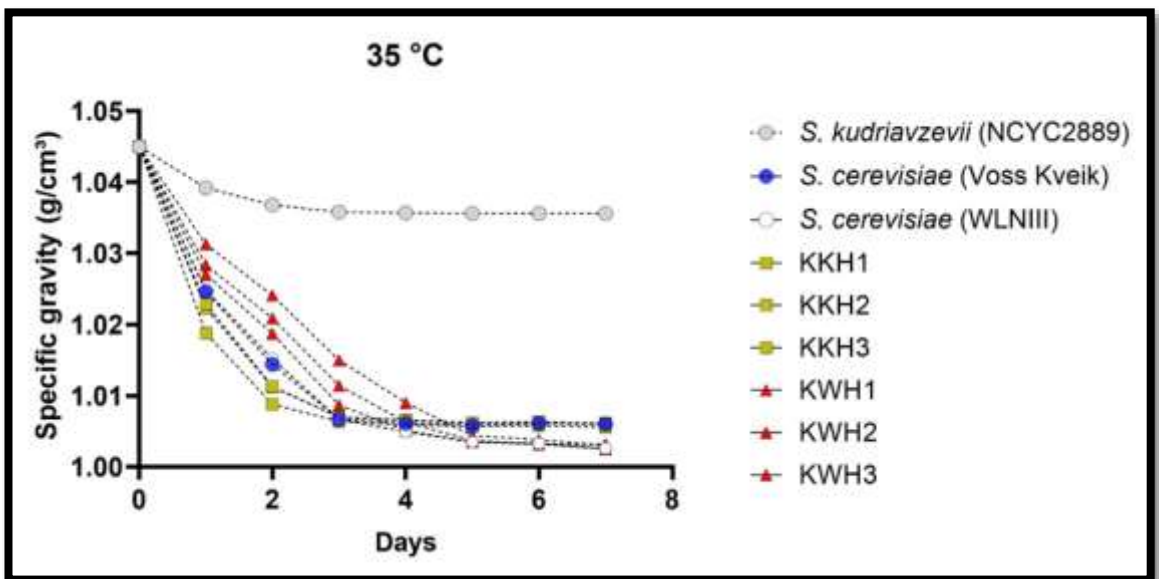
A



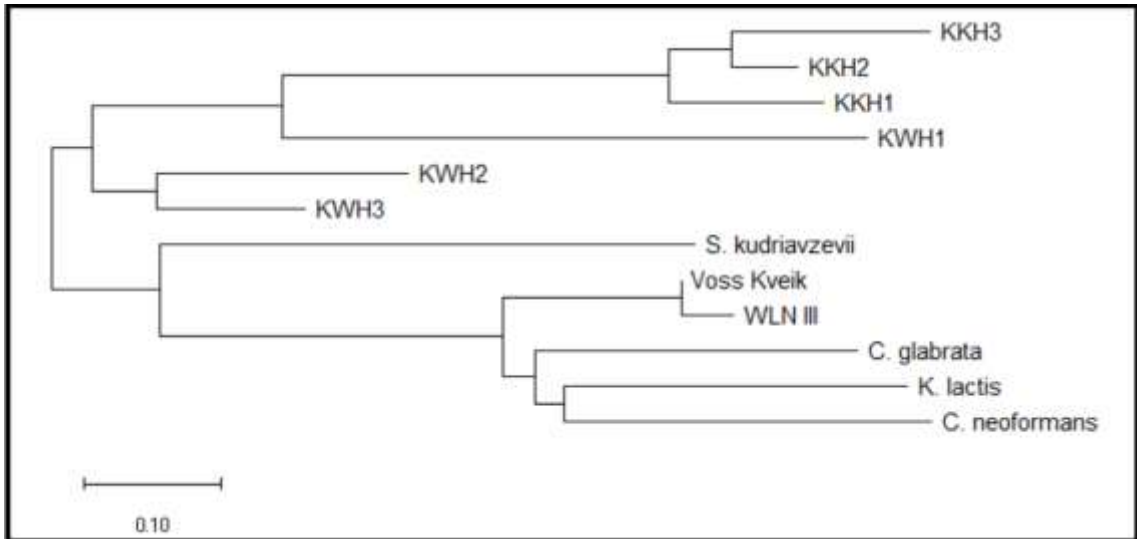
B.



C.



**Figure 2.** Fermentative performances of KKH1-KKH3 and KWH1 and KWH3 in brewing wort. Duplicate average values plotted, SD for all samples are less than SD =  $\pm 0.001$ . Fermentation tests in A. 17 °C, B. 25 °C and C. 35 °C.



**Figure 3.** Phylogenetic tree with all ITS1/ITS2 sequences align (KKH1-KKH3, KWH1-KWH3 and the parental strains).

### Acknowledgements

### Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no competing interests.

## References

- Arcari, S. G., Caliari, V., Sganzerla, M., and Godoy, H. T. (2017). Volatile composition of Merlot red wine and its contribution to the aroma: optimization and validation of analytical method. *Talanta*, 174, 752-766. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.074>
- De Barros Lopes, M., Bellon, J. R., Shirley, N., and Ganter, P. (2002). Evidence for multiple interspecific hybridization in sensu stricto species. *FEMS Yeast Research*, 1(4), 323–331. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(01\)00051-4](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(01)00051-4)
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology*, 154, 164–175. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)54076-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)54076-9)
- Boulton, C., and Quain D. E. (2001). *Brewing yeast and fermentation*. Blackwell, Oxford, United Kingdom.
- Dunn, B., and Sherlock, G. (2008). Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Research*, 18(10), 1610–1623. <https://doi.org/10.1101/gr.076075.108>
- Domizio, P. House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F. and Bamforth, C. W. (2016) *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 122, 599–604. <https://doi.org/10.1002/jib.362>
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teilling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., and Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, 166(6), 1397-1410.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>
- Garshol, L. M., and Preiss, R. (2018). How to Brew with Kveik. *Technical Quarterly*, 55(4), 76–83. <https://doi.org/10.1094/tq-55-4-1211-01>.
- González, S. S., Barrio, E., and Querol, A. (2008). Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in Brewing. *Applied and environmental microbiology*, 74(8), 2314–2320. <https://doi.org/10.1128/AEM.01867-07>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-20. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Krogerus, K. (2017). Novel brewing yeast hybrid: creation and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 65–78. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8007-5>
- Krogerus, K., Magalhães, F., Kuivanen, J., and Gibson, B. (2019). A deletion in the *STAI* promoter determines maltotriose and starch utilization in *STAI+* *Saccharomyces cerevisiae*



strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7597–7615. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10021-y>

Krogerus, K., Preiss, R., and Gibson, B. (2018). A unique *saccharomyces cerevisiae saccharomyces uvarum* hybrid isolated from norwegian farmhouse beer: characterization and reconstruction. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02253>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096

Libkind, D., Todd, C., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., and Johnston, M. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast, 108(35), 14539–14544. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105430108>

Langos, D. Granvogl, M. and Schieberle, P. (2013) Characterization of the key aroma compounds in two bavarian wheat beers by means of the sensomics approach, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 11303–11311. <https://doi.org/10.1021/jf403912j>

Odor & flavor detection thresholds in water (in parts per billion), Leffingwell and Associates, 1978. Accessed in <http://www.leffingwell.com/odorthre.htm>, November, 2019.

McMurrough, I., Madigan, D., Donnelly, D., Hurley, J., Doyle, A., Hennigan, G., McNulty, N., and Smyth, M. R. (1996). Control of ferulic acid and 4-vinyl guaiacol in brewing. *Journal of Institute of Brewing*, 102(102), 327–332. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1996.tb00918.x>

Meilgaard, M. C. (1982). Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(6), 1009–1017. <https://doi.org/10.1021/jf00114a002>

Markowski, P. *Farmhouse Ales: Culture and Craftsmanship in the Belgian Tradition*. Brewers Publications, Boulder, 2004.

Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., and Iefuji, H. (2014). Single nucleotide polymorphisms of *PADI* and *FDCI* show a positive relationship with ferulic acid decarboxylation ability among industrial yeasts used in alcoholic beverage production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.017>

Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Kawamukai, M., and Iefuji, H. (2010). *PADI* and *FDCI* are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(6), 564–569. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.11.011>

Saitou, N., and Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425. <https://doi.org/citeulike-article-id:93683>

- Pham, T., Wimalasena, T., Box, W. G., Koivuranta, K., Storgårds, E., Smart, K. A., and Gibson, B. R. (2011). Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'wild' yeast contaminants. *Journal of the Institute of Brewing*, 117, 556–568. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00504.x>
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., and 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(5), 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>
- Preiss, R., Tyrawa, C., Krogerus, K., Garshol, L. M., and Van Der Merwe, G. (2018). Traditional Norwegian Kveik are a genetically distinct group of domesticated *Saccharomyces cerevisiae* brewing yeasts. *Frontiers in Microbiology*, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02137>
- Preiss, R., Tyrawa, C., Merwe, G. Van Der, Biology, C., Laboratories, E., Author, C., and City, R. (2017). Traditional norwegian kveik yeasts: underexplored domesticated *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *bioRxiv*, 1-30. <https://doi.org/10.1101/194969>
- Rasmussen, T. C. (2016). Characterization of genotype and beer fermentation properties of Norwegian Farmhouse Ale Yeasts, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, 2016.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Verachtert, H. and Derdelinckx, G. (2003). Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6782–6790. doi: 10.1021/jf034631z
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., and Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96 (2), 110-118 [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90112-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5)
- Vidgren, V., Londesborough, J., and Brew, J. I. (2011). 125th anniversary review: yeast flocculation and sedimentation in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(4), 475–487. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00495.x>

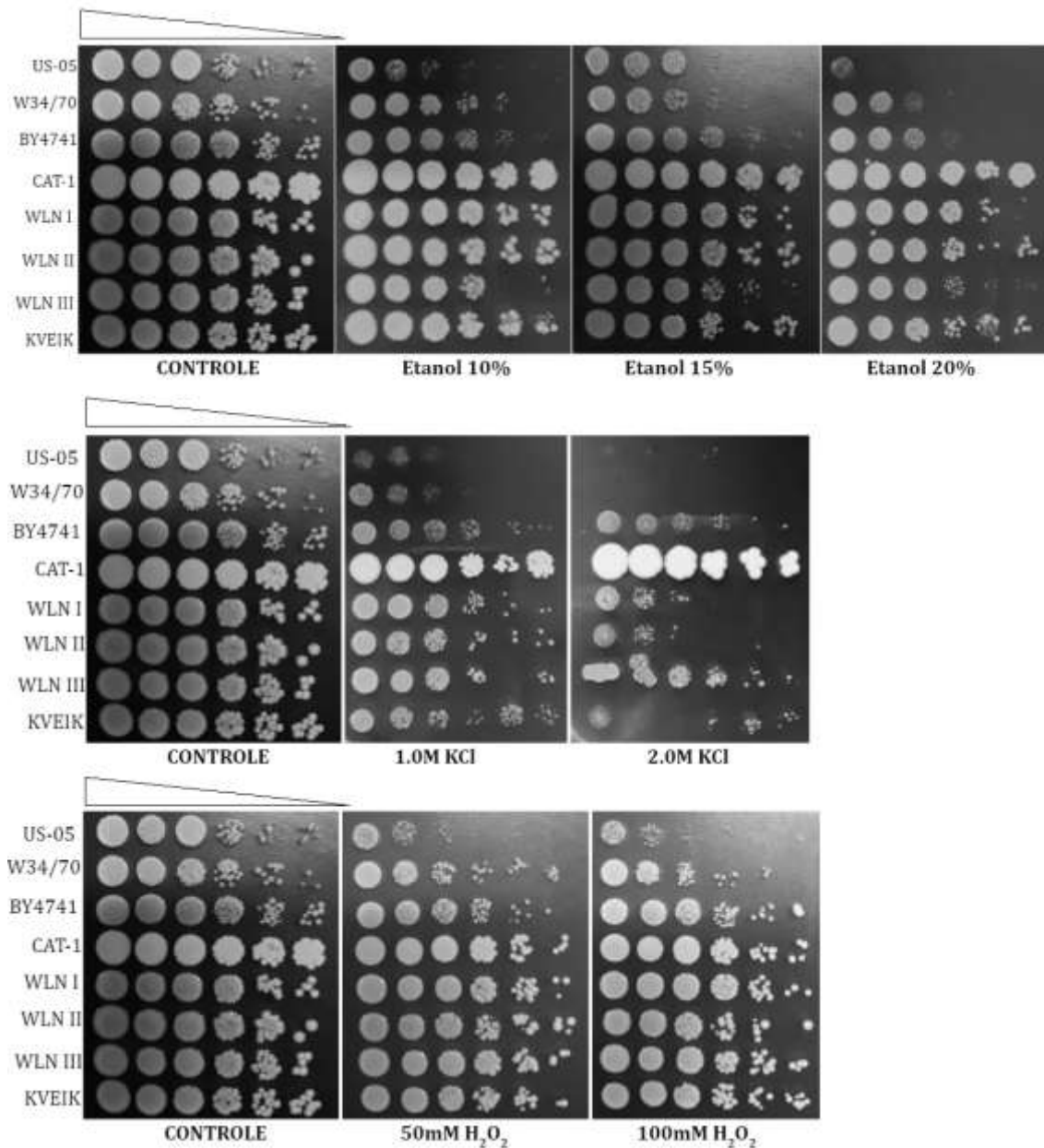
## 4 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS ADICIONAIS

### 4.1 Adaptabilidade das leveduras Wallonian Farmhouse Ale (WLN) aos estresses fermentativos

#### 4.1.1 Teste em gotas

Durante a fermentação cervejeira, as células de levedura são submetidas a vários estresses simultâneos, como estresse osmótico, etanólico e oxidativo (GIBSON, B.R. *et al.*, 2007). Para avaliar a sensibilidade das leveduras WLN I, II, e III a estes estresses, realizamos o teste em gotas, método baseado na habilidade das células de levedura de crescer em meio sólido na presença de agentes estressores (KWOLEK-MIREK, M. & ZADRAG-TECZA, R., 2014). Para a realização dos ensaios fenotípicos foram utilizadas cepas de levedura *SafAle*<sup>™</sup> US-05 (levedura ale), *SafLager*<sup>™</sup> W34/70 (levedura lager), *farmhouse ale* norueguesa *Voss Kveik* (The Yeast Bay<sup>™</sup>), CAT-1 (levedura produtora de bioetanol), BY4741 (levedura de laboratório) e as três cepas de *farmhouse ale* belga (WLN I, II e III). Culturas celulares foram mantidas em meio YPD até atingir a fase exponencial, então foram centrifugadas, lavadas com água estéril e resuspendidas para uma concentração final de 10<sup>8</sup> células por mL em meio YPD. Para determinar a resistência das cepas ao estresse osmótico, as culturas foram submetidas a tratamento com 1.0 M e 2.0M de cloreto de potássio (KCl) por uma hora e diluídas serialmente para concentrações de 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> e 10<sup>1</sup> células por mL. Amostra de 5 µL de cada suspensão celular foi inoculada em placas de Petri com meio de cultura YPD sólido e as placas foram incubadas a 28°C. Da mesma forma, para os testes de estresse osmótico e etanólico, as culturas celulares foram submetidas aos agentes estressores por uma hora (50mM e 100mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e

10%, 15% e 20% de etanol (v/v), respectivamente). O crescimento das colônias foi avaliado após 48 horas, como ilustrado na figura 7.



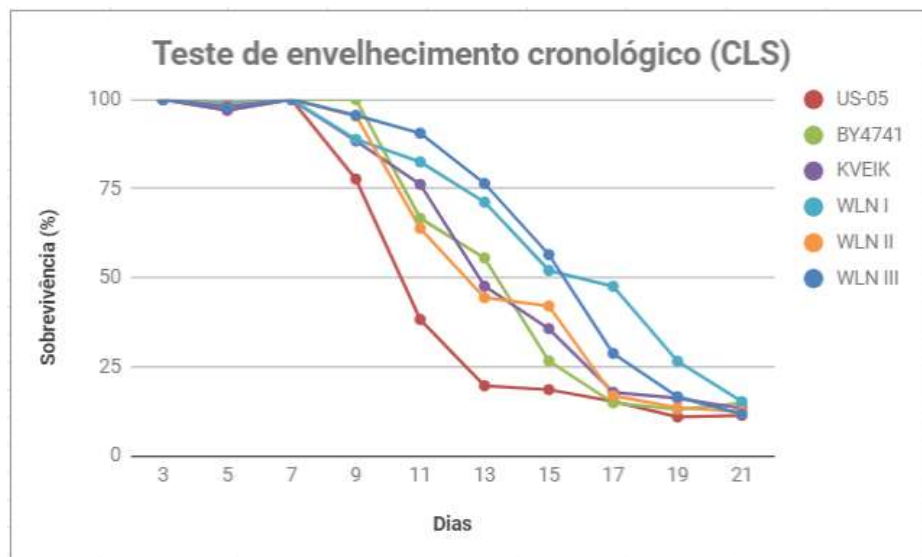
**Figura 7.** Viabilidade celular determinada pelo teste em gotas. Crescimento das cepas US-05, W34/70, BY4741, CAT-1, WLN I, II e III e KVEIK em placas de ágar YPD contendo 10%, 15% e 20% (v / v) de etanol, 1.0M e 2.0M de KCl e 50mM e 100mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nossos dados indicam que as cepas WLN I, II e III parecem ser notavelmente resistentes ao estresse oxidativo, osmótico e etanólico quando comparadas a outras cepas de levedura. WLN I e III apresentam alta tolerância a estresse osmótico e oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e a altas concentrações de etanol. Com relação ao estresse osmótico, tanto as linhagens WLN III quanto CAT-1 mostraram baixa sensibilidade a 1,0 M de KCl. Em comparação com a *US-05*, todas as cepas de *farmhouse ale* belga foram mais resistentes ao estresse hiperosmótico a 1.0 M e 2.0 M de KCl. Em relação ao estresse oxidativo, o WLN I apresenta resistência em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM), dados que reforçam o uso dessas cepas para programas de hibridização.

#### 4.1.2 Teste de envelhecimento cronológico (CLS)

Sabe-se que as leveduras sofrem dois tipos de envelhecimento: replicativo e cronológico (SINCLAIR *et al.*, 1998). Em leveduras que se reproduzem por brotamento, a expectativa de vida é classificada como tempo de vida replicativo (*replicative lifespan*, RLS), definido como o número de células-filhas que uma célula-mãe pode produzir antes da senescência, e tempo de vida cronológico (*chronological lifespan*, CLS), definido como o período de tempo que as células que não estão em divisão permanecem vivas (LONGO VD., 2012). Para os ensaios de envelhecimento cronológico, é necessário determinar a viabilidade de células individuais na população durante a fase estacionária. As células foram inoculadas em 10 ml de meio YPD e cultivadas durante a noite. Após 24 h, as células foram inoculadas em 50 mL de meio YPD em frascos de 250 mL até uma densidade óptica a 600 nm (OD 600) de 0,250. As culturas foram cultivadas com agitação (250 rpm) a 30°C. A densidade celular máxima é normalmente alcançada após 48 horas de crescimento em YPD, portanto, 3 dias após a inoculação foi considerado como o dia

0 de vida cronológica (OCAMPO, A., & BARRIENTOS, A., 2011). A capacidade de células quiescentes formarem colônias foi medida a cada dois dias a partir da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (QUAN Z., 2015). As curvas de envelhecimento para ambas cepas de *Kveik* e WLN II foram semelhantes à curva de envelhecimento da cepa de laboratório BY4741. As leveduras WLN I e III apresentam CLS substancialmente prolongada, com a taxa de sobrevivência máxima no dia 15 (figura 8).



**Figura 8.** Curvas de envelhecimento cronológico (CLS) durante 21 dias de cultivo. Fonte: própria, 2019.

## 5 DISCUSSÃO

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas no mundo. O Brasil é o terceiro maior produtor da bebida e, em 2019, o setor microcervejeiro alcançou a marca de mil estabelecimentos registrados. A crescente busca do consumidor por novos produtos se apresenta como uma oportunidade para o desenvolvimento de novas cervejas com características singulares. Atualmente, compõem como principais microrganismos responsáveis pela fermentação cervejeira espécies pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* (LODOLO, KOCK, AXCELL e BROOKS, 2008). *S. cerevisiae* é responsável pela fermentação de cervejas da família ale e abrange o maior número de cepas atualmente disponíveis para uso em cervejarias. *S. pastorianus*, por sua vez, é responsável pela fermentação de cervejas da família lager e, embora apresente menos representantes disponíveis para a indústria, é a espécie mais utilizada mundialmente no setor cervejeiro (GIBSON E LITI, 2015; WHITE e ZAINASHEFF, 2010).

Apesar do grande número de cepas de levedura disponíveis para fermentação cervejeira, o desenvolvimento de híbridos de leveduras é crucial para a indústria, uma vez que permite a elaboração de linhagens com fenótipos fermentativos otimizados, como a geração de compostos aromáticos e a maior tolerância aos diferentes estresses da fermentação (KROGERUS, 2017). Dos chassis de leveduras cervejeiras distintos que podem ser utilizados para a geração de híbridos, cepas de farmhouse ale são bastante promissoras, devido à sua capacidade de produzir grandes quantidades de éster, apresentar alta atenuação e floculação média. Além disso, outra levedura muito interessante para programas de hibridação é a *Saccharomyces kudriavzevii*, devido à sua capacidade de formar compostos fenólicos, crescimento a baixas temperaturas e alta produção de glicerol.

O desenvolvimento de cepas microbianas para o setor de alimentos e bebidas é prejudicada pela relutância do consumidor em aceitar organismos geneticamente modificados (OGM) na cadeia alimentar humana. Esse fato levou os pesquisadores a voltar às abordagens tradicionais, incluindo criação direcionada. Embora essas estratégias não tenham a precisão das técnicas geneticamente modificadas (GM)

e a garantia da qualidade seja mais um desafio, existem muitos métodos não-OGM disponíveis, principalmente quando se trabalha com micróbios altamente tratáveis, como *Saccharomyces spp.*

Com base em pesquisas e desenvolvimento anteriores que testaram a viabilidade do uso da criação interespecífica de leveduras no gênero *Saccharomyces* para gerar novos fenótipos para aplicação em fermentação de bebidas (BELLON *et al.*, 2011, 2013), o presente trabalho descreve a geração de híbridos interespecíficos de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* na tentativa de introduzir melhorias em características importantes e relevantes para a cerveja.

Especificamente, o objetivo foi gerar leveduras híbridas de *S. cerevisiae* de origem belga (WLN III) e *S. kudriavzevii* (NCYC2889) para a produção de cerveja que apresentem melhor perfil fermentativo em relação às cepas parentais, como uma maior faixa de temperatura de fermentação (17 °C, 25 °C e 35 °C), conduzindo uma fermentação eficiente em menor tempo com a produção de composto voláteis que sejam desejáveis no produto final.

Para a escolha das leveduras utilizadas no programa de hibridização, realizamos testes de tolerância a três estresses fermentativos encontrados no processo de produção cervejeira (dados mostrados no adendo deste trabalho), estresse osmótico, oxidativo e etanólico. Quando comparadas às leveduras comumente utilizadas na indústria para a fabricação de cerveja como a US-05 (cepa de levedura ale), as três cepas belgas da região da Valônia (WLN I, II e III) apresentaram uma elevada tolerância aos estresses citados. Nossos dados indicaram que as linhagens WLN I, II e III parecem ser notavelmente resistentes aos estresses fermentativos quando comparadas a outras linhagens de leveduras testadas e, portanto, são ótimas candidatas para o uso em programas de hibridização. As cepas belgas apresentaram semelhante tolerância aos estresses quando comparadas à cepa Voss Kveik, *Saccharomyces cerevisiae* oriunda de fazendas norueguesas que tem despertado interesse da indústria devido à sua capacidade de fermentar mostos em temperaturas elevadas.



Além da tolerância aos estresses fermentativos, avaliamos o também o envelhecimento celular das cepas belgas e nossos resultados apontam um CLS substancialmente estendido, outra vantagem das cepas escolhidas para este trabalho.

Baseado nesses resultados a cepa WLN III foi selecionada como parental para o programa de hibridização com a levedura *S. kudriavzevii*, escolhida por apresentar criotolerância e alta produção de glicerol.

A partir do método de hibridização rara, geramos 20 possíveis híbridos entre as cepas parentais selecionadas. A hibridização foi confirmada com o sequenciamento da região ITS e três híbridos foram escolhidos para a caracterização em mosto cervejeiro. Avaliamos a performance fermentativa dos híbridos KWH1, KWH2 e KWH3 com relação à capacidade de atenuação do mosto, produção de álcool e valores de pH após a fermentação. As três cepas híbridas apresentaram ótimos valores de atenuação (92.8 %) apesar de levarem mais tempo para atenuar o mosto que a parental *S. cerevisiae* WLN III.

Normalmente, o pH inicial do mosto tem valores próximos de 5.00, enquanto no final da fermentação o pH cai para aproximadamente 4.00, e esses dados são geralmente ignorados (BOULTON & QUAIN, 2001). Para os testes, o pH inicial do mosto padrão foi de  $5,45 \pm 0,2$  para todas as amostras. A 35 °C, os híbridos KWH1 e KWH2 apresentaram valores de pH de 3.79 e 3.77, comparados ao pH de 3.92 da parental WLN III. Recentemente foi demonstrada a busca por leveduras acidificantes naturais para produzir cervejas ácidas sem a necessidade de fermentação mista entre levedura de cerveja e bactérias produtoras de ácido (por exemplo, *Lactobacillus* e *Pediococcus*), como no caso de *Lachancea thermotolerans* (DOMIZIO, HOUSE e JOSEPH, 2016). Um pH ligeiramente ácido atingido na faixa de 35°C indica uma alta liberação de ácidos orgânicos, sendo possivelmente interessante para a aplicação no mercado de cerveja ácidas.

Com relação à produção de compostos voláteis de interesse à indústria cervejeira, onze compostos apresentaram produção acima do limiar. Desses, alguns voláteis foram produzidos apenas pelas cepas híbridas, como o hexanoato de etila, éster com aroma que remete a frutas como o maracujá amarelo, maçã,

banana e abacaxi. Dois dos híbridos caracterizados apresentam uma produção maior que seus parentais do éster dietil succinato, que apresenta aromas frutados característicos de maçã, damasco, pêssego, floral, pera e melão (PEINADO *et al.*, 2004).

Se faz necessária a caracterização fenotípica das cepas híbridas geradas, como avaliar a tolerância aos estresses fermentativos e a capacidade de floculação e assimilação de diferentes açúcares. Ainda, é preciso uma investigação mais aprofundada das propriedades dos híbridos gerados, especialmente em relação à proporcionalidade da herança do DNA, à origem do DNA mitocondrial e à produção de aromas. No entanto, os resultados obtidos em relação à produção de ésteres, as taxas de atenuação de mosto e a medição de pH após a fermentação indicam que os híbridos gerados neste trabalho apresentam potencial para utilização na indústria cervejeira, bem como as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de origem belga WLN I, II e III demonstraram alta tolerância aos estresses fermentativos e podem ser utilizadas em programas de hibridização futuros.

## 6 CONCLUSÃO

A indústria cervejeira brasileira está em crescimento, bem como a quantidade de consumidores da bebida. A busca por novos produtos gera a necessidade de inovação, e uma das possibilidades é pela hibridização interespecífica, técnica que permite o desenvolvimento de cepas não-OGM que possuam características únicas de fermentação que sejam de interesse para a indústria. Neste trabalho, geramos novas leveduras capazes de fermentar o mosto cervejeiro em diferentes temperaturas e produzir ésteres que não são produzidos pelas cepas parentais, demonstrando o vigor do híbrido. A partir dos dados obtidos, compreendemos que o uso da técnica de hibridização interespecífica pode ser uma ferramenta eficaz na geração de cepas alternativas às cepas já utilizadas comumente na indústria. Ainda, é possível inferir que as cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* de origem belga WLN I, II e III podem ser utilizadas como chassis para a construção de novos híbridos, já que apresentam tolerância elevada a diversos estresses fermentativos e produzem compostos fenólicos agradáveis para alguns estilos cervejeiros. Os híbridos gerados neste trabalho apresentam potencial uso na indústria cervejeira devido às suas distintas características fermentativas.

## 7 PERSPECTIVAS

- Avaliação da expressão de genes relacionados à formação dos ésteres observados, como *ATF1* e *ATF2*;
- Avaliação da expressão de genes relacionados à floculação (*FLO1*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10* e *FLO11*), assim como análise fenotípica da capacidade de floculação dos híbridos;
- Avaliação da assimilação de diferentes carboidratos (glicose, maltose, frutose, maltotriose e dextrinas) pelo método de cromatografia líquida (HPLC);
- Avaliação da expressão dos genes *PAD1* e *FDC1*, relacionados à biossíntese de compostos fenólicos;
- Determinação da herança do DNA mitocondrial pela expressão do gene *COX2*, gene mitocondrial que codifica a enzima citocromo oxidase;
- Verificação da expressão do gene *STA1* (expressão da enzima glicoamilase), para avaliar se a capacidade dos híbridos de fermentar dextrinas está relacionada à essa enzima;
- Avaliação da tolerância das cepas híbridas aos diversos estresses fermentativos (estresse etanólico, osmótico e oxidativo).

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSUHAIM, H.; VOJISAVLJEVIC, V.; PIROGOVA, E. Effects of non-thermal microwave exposures on the proliferation rate of *saccharomyces cerevisiae* yeast', in World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, IFMBE Proceedings 39, M. Long (ed.), Springer, Beijing, China, pp. 48-51 (World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering), 2012.

AMORIM, B. As duas grandes famílias cervejeiras. *Revista da cerveja*, v. 7, p. 52-54, 2013.

BARKER, MG.; BRIMAGE, LJE. & SMART, KA. Effect of Cu, Zn superoxide dismutase disruption mutation on replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 177: 199–204, 1999.

BARNETT, J. 'A History of Research on Yeasts 2: Louis Pasteur and his Contemporaries, 1850 +/- 1880'. *Yeast*, p. 755-771, 2000.

BECKMAN, K. B. & AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547-581. 1998.

BENNETT, JM. *Ale, Beer, and Brewsters in England: Women's Work in a Changing World, 1300–1600*. New York, Oxford University Press, 1996.

BERLOWSKA, J.; KREGIEL, D.; RAJKOWSKA, K. Biodiversity of brewery yeast strains and their fermentative activities. *Yeast*, n. 32, p. 289-300, 2015.

BING, J.; HAN, P.J.; LIU, W.Q. *et al.*, Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Curr Biol.*, n. 24, p. 380-381, 2014.

BJCP Style Guidelines. 2015. Disponível em: <[http://www.bjcp.org/docs/2015\\_Guidelines\\_Beer.pdf](http://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf)> Acesso em novembro de 2018.

BLEOANCA, I., SILVA, A.R.C., PIMENTEL, C., RODRIGUES-POUSADA, C., MENEZES, R.A. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering* VOL. 116 No. 6, 697-705, 2013.

BOULTON & QUAIN. *Brewing Yeast & Fermentation*. Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing Company, 2001.

BRIGGS, D. *et al.*, *Brewing Science and Practice*. CRC Press, Boca Raton, Boston, New York, Washington DC. 2004.

CABISCOL, E. *et al.*, Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275(35):27393-8, 2000.

CONWAY, J. Beer production worldwide from 1998 to 2017 (in billion hectoliters). Statista, 2018. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>>. Acesso em: 5 de jun. de 2019.

DADOS do setor. Cervbrasil (Associação Brasileira da Indústria da Cerveja), 2019. Disponível em: <[http://www.cervbrasil.org.br/novo\\_site/dados-do-setor/](http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/)>. Acesso em: 20 de maio de 2019.

DAVIES, KJA. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives* (Rice-Evans C, Halliwell B & Lunt GG, eds), pp. 1–32. The Biochemical Society, London, UK, 1995.

DONALIES, UEB.; NGUYEN, HTT.; STAHL, U. Improvement of *Saccharomyces* Yeast Strains Used in Brewing, Wine Making and Baking. *111:67–98*, 2008.

DOUDICAN, N. A.; SONG, B.; SHADEL, G. S.; DOETSCH, P. W. Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, v. 25, p. 5196-5204, 2005.

DUNN, B., SHERLOCK, G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res* 18:1610–1623, 2008.

FAGAN, BM. *The Oxford Companion to Archaeology*. Oxford University Press, Oxford, 1996.

FERRARI, V. O mercado de cervejas no Brasil. 131 f. Dissertação (Mestrado em Economia do Desenvolvimento) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GARAY-ARROYO, A., COVARRUBIAS, A. A., CLARK, I., NINO, I., GOSSET, G., MARTINEZ, A. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 734-741, 2004.

GIBSON, B.R., & LITI, G. *Saccharomyces pastorianus*: genomics insights inspiring innovation for industry. *Yeast*, 32, 17-27, 2015.

GIBSON, B.R.; SMITH, J.M.; LAWRENCE, S.J; SHELTON, N.; SMITH & SMART, KA., Oxygen as toxin: oxidative stress and brewing yeast physiology. *Cerevisiae* 31: 25–36, 2006.

GIBSON, B. R., LAWRENCE, S. J., BOULTON, C. A., BOX, W. G., GRAHAM, N. S., LINFORTH, R. S. T., & SMART, K. A. The oxidative stress response of a lager brewing yeast strain during industrial propagation and fermentation. *FEMS Yeast Research*, 8(4), 574–585, 2008.

GIBSON, B.R., LAWRENCE, S.J., LECLAIR, J.P.R., POWELL, C.D., SMART, K.A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol.*, 31, 535-569, 2007.

GLOBAL BEER CONSUMPTION BY COUNTRY IN 2016. Kirin Beer University Report, News Releases, Kirin Holdings. 2017. Disponível em: <[https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2017/1221\\_01.html](https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2017/1221_01.html)>. Acesso em: 03 de junho de 2019.

GIROTTI, W. ALBERT. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, v. 39, p 1529-1542, 1998.

GONZÁLEZ, SS.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Molecular Characterization of New Natural Hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in Brewing. *J Food Microbiol* 74:2314–20, 2008.

GONZÁLEZ, SS.; GALLO, L.; CLIMENT, MD.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *Int J Food Microbiol* 116: 11–18, 2007.

GRAVES-BROWN, C. *Dancing for Hathor: Women in Ancient Egypt*. Bloomsbury Academic, 2010.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK, 1999.

HAMMOND, J.R.M.; DAVIS, D., LEE, M., & STOREY, K. Does osmotic pressure affect yeast performance in high gravity fermentation? *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 28, 316-325, 2001.

HAZELWOOD, L.A.; WALSH, M.C.; PRONK, J.T.; DARAN, J.M. Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop iso- $\alpha$ -acids. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 76, p. 318-328, 2010.

HELD, P. Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces Cerevisiae*, 2010. Disponível em: <<http://www.biotek.com/resources/articles/beer-brewing-synergyh1-yeast-growth.html>> Acesso em novembro de 2018.

HORNESEY, IS. *A History of Beer and Brewing*. RSC paperbacks: Cambridge, 2003.

HULSE, GA. Yeast propagation. *Brewing Yeast Fermentation Performance*. 2nd ed (Smart KA, ed), pp. 249–256. Blackwell Science Publishers, Oxford, UK, 2003.

HUUSKONEN, A.; MARKKULA, T.; VIDGREN, V. *et al.*, Selection from industrial lager yeast strains of variants with improved fermentation performance in very high gravity worts. *Appl Environ Microbiol.*, n. 76, p. 1563-1573, 2010.

KROGERUS, K.; MAGALHÃES, F.; VIDGREN, V.; GIBSON, B.R. New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42: 769–778, 2015.

KROGERUS, K.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; CASTILLO, S.; GIBSON, B.R. Inheritance of brewing-relevant phenotypes in constructed *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces eubayanus* hybrids. *Microb Cell Fact* 16: 66, 2017.

KUNZE, W. *Technology brewing and malting*, 3rd international ed. Berlin: VLB Berlin, 2004

KWOLEK-MIREK, M. & ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res* 14(7), 1068-79, 2014.

LEGRAS, J-L.; MERDINOGLU, D.; CORNUET, J.M. & KARST, F. *Bread, Beer and Wine: Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Ecol*. 16:2091-102, 2007.

- LIBKIND, D. HITTINGER, C.T., VALÉRIO, E. *et al.*, Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, n. 108, p. 14539-14544, 2011.
- LODOLO, E. J., J. L. F. KOCK, B. C. AXCELL & BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* — the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res.*, 2008.
- LOCKLIN, N. *Women's Work and Identity in Eighteenth-Century Brittany*. Routledge: Ashgate Publishing, London, 2007.
- LONGO, VD. Envelhecimento Cronológico de Fabrizio P. em *Saccharomyces cerevisiae*. *Subcell Biochem.* 57: 101-121, 2012.
- LORENZ, RT. & PARKS, LW. Involvement of heme components in sterol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* 26:598–603, 1991.
- MARTIN V, QUAIN DE, SMART KA, *Brewing Yeast Oxidative Stress Responses: Impact of Brewery Handling*. *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Smart KA (ed), pp. 61-73, 2003.
- MASKELL, DL.; KENNEDY, AL.; HODGSON, JA. & SMART KA. Impact of carbohydrate composition of media on lager yeast replicative lifespan. *J Am Soc Brew Chem* 59: 111–116, 2001.
- MELZ, M. Brasil chega a mil fábricas de cerveja. *Abracerva (Associação Brasileira de Cerveja Artesanal*, 2019. Disponível em: <<https://abracerva.com.br/2019/06/07/brasil-chega-a-mil-fabricas-de-cerveja/>>. Acesso em: 11 de jun. de 2019.
- MERTENS, S.; STEENSELS, J.; SAELS, V. Large Set of Newly Created Interspecific *Saccharomyces* Hybrids Increases Aromatic Diversity in Lager Beers. *81:8202–14*, 2015.
- MICHEL, C. *Geschichte des Bieres von der ältesten Zeit bis zum Jahre*, Augsburg:Verlagsbuchhandlung Gebrüder Reichel, 1899.
- MICHEL, M.; MEIER-DÖRNBERG, T.; JACOB, F. Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *86:1195–1212*, 2016.
- MICROCERVEJARIAS no Brasil: Características e oportunidades. *Sebrae Mercados*, 2016 Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/\\$File/7503.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/$File/7503.pdf)>. Acesso em: 21 de maio de 2019.
- MORADO, R. *Larousse da Cerveja*. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009.
- MURAKAMI, C.; DELANEY, JR.; CHOU, A.; CARR, D.; SCHLEIT, J.; SUTPHIN, GL. pH neutralization protects against reduction in replicative lifespan following chronological aging in yeast. *Cell Cycle*.11: 3087–3096, 2012.
- NAUMOV, GI. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* comb. nov., a new variety established by genetic analysis. *Microbiology* 69: 338–342, 2000.



OCAMPO, A. & BARRIENTOS, A. Quick and reliable assessment of chronological life span in yeast cell populations by flow cytometry. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(6-7), 315–323, 2011.

ODUMERU, J. A.; D'AMORE, T.; RUSSEL, I.; STEWART, G. G. Effects of heat shock and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis) brewing yeast strain during fermentation of high gravity wort. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 111-116, 1992.

O'ROURKE, TW. *et al.*, Mitochondrial dysfunction due to oxidative mitochondrial DNA damage is reduced through cooperative actions of diverse proteins. *Mol Cell Biol* 22(12):4086-93, 2002.

PALMER, John J. *How to brew: everything you need to know to brew great beer every time*. Third edition. Brewers Publications, 2017.

PANCHAL, C.J. & STEWART, G.G. The effect osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. *Journal of the Institute of Brewing, London*, 86: 207-10, 1980.

PEINADO, R.A. *et al.* Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, v. 84, p. 585-590, 2004.

PEYTON, Jane. *Beer O'Clock: Craft, Cask and Culture* (english edition). Summersdale Publishers LTD – ROW, 30 de set. de 2013.

PINCH, G. *Egyptian Mythology: A Guide to the Gods, Goddesses, and Traditions of Ancient Egypt*. Oxford University Press, 2004.

PINCHBECK, I. *Women workers and the industrial revolution 1750 - 1850*. George Routledge & Sons, LTD. Broadway House, 68-74, Carter Lane, E.G. London, 1930.

POWELL, CD.; QUAIN, DE. & SMART, KA. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Res* 3: 149–157, 2003.

PROTZ, R. *Ultimate Encyclopedia of Beer*. Carlton Books Limited, Smithmark Pub, 1995.

QUAN, Z.; CAO, L.; TANG, Y.; YAN, Y.; OLIVER, SG.; ZHANG, N. The Yeast GSK-3 Homologue Mck1 Is a Key Controller of Quiescence Entry and Chronological Lifespan. *PLoS Genet*, 2015.

QUEROL, A., BOND, U. The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiol Lett*, 293, 1–10, 2009.

REVISTA DA CERVEJA. Dado Bier: o pioneirismo de uma cervejaria. In: *Revista da Cerveja*. 03/06/2014 Disponível em: < <http://revistadacerveja.com.br/dado-bier-o-pioneirismo-de-uma-cervejaria/>> Acesso em: 13 de maio de 2019.

RIBEIRO, GF. *et al.*, Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. *Mol Biol Cell* 17(10):4584-91, 2006.

- ROBERTS, A. Hathor Rising: The Power of the Goddess in Ancient Egypt. Inner Traditions, 1997.
- SAERENS, S.M., DELVAUX, F.R., VERSTREPEN, K.J., & THEVELEIN, J.M. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology* (2010)3(2), 165–177, 2010.
- SAERENS, SMG.; DUONG, CT.; NEVOIGT, E. Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010;
- SALMON, TB. *et al.*, Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 32(12):3712-23, 2004.
- SAMPAIO, JP.; GONÇALVES, P. Natural Populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal Are Associated with Oak Bark and Are Sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (7) 2144-2152, 2008.
- SANTOS, S. Os primórdios da cerveja no Brasil. 2 ed. Cotia, SP: Ateliê Editorial, 2004.
- SHARPE, P. Continuity and Change: Women's History and Economic History in Britain. *The Economic History Review*, 48(2), new series, 353-369. 1995.
- SHELLHAMMER, T. Beer Fermentations, *The Oxford Handbook of Food Fermentations*. Edited by Charles W. Bamforth and Robert E. Ward, 2014.
- SINCLAIR, D.; MILLS, K.; GUARENTE, L. Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Reviews in Microbiology*, 52(1), pp.533–560, 1998.
- STRUDWICK, MH. *The Encyclopedia of Ancient Egypt*. Amber Books Ltd, London, United Kingdom, 2016.
- VAN ZANDYCKE, SM.; SOHIER, PJ. & SMART, KA. The impact of catalase expression on the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech Ageing Dev* 123: 365–373, 2002.
- VENTURINI, W.; CEREDA, M. *Biotecnologia industrial vol. 4: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blucher, 2008. VENTURINI, W.G. *Tecnologia de cerveja*. São Paulo: ABDR, 2000.
- WENDLAND, J. Lager yeast comes of age. *Eukaryot Cell*, 13, 1256–1265, 2014.
- WHITE, C. & ZAINASHEFF, J. *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Brewers Association: Brewers Publications, 2010.
- YOUNG, W. Thomas. Beer. *Encyclopædia Britannica*, 2019. Disponível em: <<https://www.britannica.com/topic/beer>>. Acesso em: 10 de maio de 2019.
- ZHAO, X., Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 7588–7598, 2015.

## **CURRICULUM VITÆ resumido**

**TELINI, B.P.**

### **1. DADOS PESSOAIS**

Nome: Bianca de Paula Telini

Local e data de nascimento: Maringá - Paraná, Brasil - 22/05/1992

Endereço profissional: Fernando Ferrari, 280

Telefone profissional: (51) 992903933

E-mail: bitelini@gmail.com

### **2. FORMAÇÃO**

2010 – 2014: Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

2015 – 2016: MBA Gestão Estratégica Empresarial e Comercial

Centro Universitário Leonardo da Vinci (UNIASSELVI)

### **3. ESTÁGIOS**

2010 – 2011: Bolsista de Iniciação Científica

Laboratório de Fisiologia Vegetal

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Bolsas: PIBIC – CNPq

Orientador: ARTHUR GERMANO FETT NETO

Projeto: Regulação da Produção de Alcalóides Analgésicos em Espécies de Psychotria.

Atividades: Neste laboratório tive minha primeira experiência profissional da faculdade. Passei a fazer parte deste laboratório no segundo semestre. Era incumbida de funções básicas laboratoriais e também fiz parte da linha de pesquisa de "metabólitos secundários".

2012 – 2014: Bolsista de Iniciação Científica

Laboratório de Fisiologia Vegetal

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Bolsas: PROBIC - FAPERGS

Orientador: JOSE ARTUR BOGO CHIES

Projeto: AVALIACAO DO PERFIL IMUNOLOGICO EM MULHERES  
COM ABORTAMENTO ESPONTANEO DE REPETICAO: PAPEL  
DAS CELULAS NK E AMBIENTE SUPRESSOR

Atividades: Participação e desenvolvimento na grande área de  
biologia molecular, trabalhando especificamente no projeto intitulado  
"Imunologia da gestação".

#### 4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2014 - Destaque no XXVI Salão de Iniciação Científica, sessão Genética  
Humana I, UFRGS.

#### 5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

2014 – 2016: Projeto de extensão

Projeto: Doutores-Palhaços: o uso do riso como instrumento  
terapêutico

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre  
(UFCSPA)

## 6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

PEREIRA, C. S. ; TELINI, B. P. ; ASSIS, E. B. ; LUNGE, V. R. . Detecção de polimorfismos associados à maciez da carne em genes da calpaína e da calpastatina em bovinos da raça Simental no Rio Grande do Sul. Revista de Iniciação Científica da ULBRA, v. 13, p. 5-11, 2015.

TELINI, BIANCA; VEIT, TIAGO DEGANI ; CHIES, JOSÉ ARTUR B. ; VIANNA, PRISCILA . The CCR5-32 polymorphism as a pre-eclampsia susceptibility marker: an evaluation in Brazilian women. Archives of Gynecology and Obstetrics (Internet), v. epub, p. p. 1, 2014.

PAULA TELINI, BIANCA; VEIT, TIAGO ; VIANNA, PRISCILA ; BOGO CHIES, JOSÉ . Association between the CCR5-32 polymorphism and preeclampsia. BMC Proceedings, v. 8, p. P70, 2014.

## 7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

**TELINI, B. P.**, MENONCIN, M., BONATTO, D.

The farmhouse ale yeast strains as potential chassis for intra and interspecies yeast hybrid design. ISSY 34 – International Specialized Symposium on Yeasts. 2018.

**TELINI, B. P.**, MENONCIN, M., BONATTO, D. O potencial de cepas de leveduras farmhouse ales como chassis para o desenho de híbridos intra e interespecíficos 6ta. JORNADAS SUDAMERICANAS DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA DE LEVADURAS. 2018.

**TELINI, B. P.**; BUSATTO M.; CHIES JAB.; Vianna P. Association between the CCR5 $\Delta$ 32 polymorphism and preeclampsia. 5º Congresso Brasileiro de Biotecnologia. 2013.

**TELINI, B. P.**; BUSATTO M. ; ROVARIS DL. ; CHIES JAB. ; Vianna P. . Relationship between the polymorphism BclI in glucocorticoid receptor gene and the development of preeclampsia: role of stress in pregnancy. In: 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia - Rodada e Feira de Negócios, 2012, Guarujá - SP. Brasil Biotec - 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia - Rodada e Feira de Negócios, 2012.

**TELINI, B. P.;** MATSUURA, H. N. ; FETT-NETO AG . O Alcalóide N,  $\beta$ -D-Glicopiranosil Vincosamida (GPV) não confere proteção contra herbívoros em um sistema de interação específica. In: XIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XIV Reunião Latino-Americana de Fisiologia Vegetal, 2011, Búzios, Rio de Janeiro. Brazilian Journal of Plant Physiology Brazilian Society of Plant Phisiology, 2011.