

## O MICROBIOMA DE CERVEJAS DE FERMENTAÇÃO MISTA PRODUZIDAS DE FORMA ESPONTÂNEA E NÃO-ESPONTÂNEA

I Simpósio Brasileiro de Bebidas Fermentadas e Destiladas., 1ª edição, de 13/04/2021 a 16/04/2021  
ISBN dos Anais: 978-65-86861-97-6

**PIRAINE; Renan Eugênio Araujo <sup>1</sup>, BOCHMAN; Matthew L. <sup>2</sup>**

### RESUMO

#### 1. INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, os métodos de produção de cerveja são divididos em duas categorias: (a) fermentação na parte inferior do fermentador, realizada por *Saccharomyces pastorianus* na produção de cervejas lagers; e (b) fermentação na parte superior do fermentador, próximo à superfície do mosto, realizada por *S. cerevisiae* para produção de cervejas ales. Ampliando-se o conceito para fermentações mistas, duas novas categorias podem ser incluídas: (c) fermentação não-espontânea, realizada por uma cultura starter in-house, que consiste de leveduras e bactérias ácido-láticas (LABs); e (d) fermentação espontânea, realizada por microrganismos inoculados através do ar ambiente em fermentadores abertos (coolships), os quais podem ser diferentes microrganismos como enterobactérias, leveduras, LABs, bactérias produtoras de ácido acético (AAB), entre outros (DE ROOS; DE VUYST, 2019; VRIESEKOP et al., 2012).

Geralmente fermentações mistas são realizadas por leveduras e LABs na criação de cervejas sours (também conhecidas como azedas ou ácidas), formando uma microbiota complexa e que age através da sua interação e cooperação (FARIA-OLIVEIRA et al., 2015). Entretanto, grande parte dos cervejeiros não sabe exatamente quais microrganismos estão presentes nem a proporção na suas fermentações. Ainda que leveduras selvagens, LABs e algumas bactérias Gram-positivas sejam consideradas contaminantes em fermentações, esses mesmos gêneros microbianos são altamente desejados para a produção de estilos específicos de cervejas, como as Lambics e American Coolship Ales, por fornecer sabores únicos à essas bebidas (BOKULICH; BAMFORTH; MILLS, 2012). Nesse sentido, os microrganismos e/ou suas enzimas são utilizados através de processos puramente biotecnológicos para realização da acidificação, alcoolização, proteólise, lipólise e na conversão de aminoácidos nos mostos cervejeiros (DE ROOS; DE VUYST, 2019).

O interesse em cervejas de fermentação mista cresce anualmente nos Estados Unidos (SPITAEELS et al., 2014), contudo o microbioma presente nessas cervejas e a sua caracterização ainda são pouco explorados, demandando novos estudos confiáveis que permitam aprofundar o conhecimento nesse método de produção. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar o metagenoma em cervejas de fermentação mista produzidas através dos métodos de fermentação espontânea e não-

<sup>1</sup> Biotecnologista e Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas, renanbiotec@gmail.com

<sup>2</sup> Biologista molecular pelo Juniata College (EUA) - Professor na Graduação e Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Indiana University (EUA), bochman@indiana.edu

espontânea.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Amostras

As amostras utilizadas no estudo foram obtidas através do projeto de financiamento coletivo “Mixed culture metagenomics of the microbes making sour beer” (DOI 10.18258/13495) hospedado na plataforma Experiment ([www.experiment.com](http://www.experiment.com)). 20 amostras, armazenadas a 4 °C, entre lamas e cervejas resultantes de fermentação espontânea e não-espontânea, produzidas por cervejeiros artesanais de diversos estados dos Estados Unidos foram utilizadas.

As amostra de cerveja (50 mL) foram processadas por centrifugação a 1.500 x g por 10 min a 4 °C. As amostras de lama ou culturas starter, um volume de 1- 5 mL foi suspenso em 50 mL de água ultrapura estéril e tratado como as de cerveja. O pellet de células e restos celulares foram suspensos em 500 uL de 2x DNA/RNA Shield (Zymo Research (Irvine, CA) e armazenados a - 20 °C. As análises do microbioma foram realizadas através do serviço ZymoBIOMICS® Targeted Sequencing Service for Microbiome Analysis pela empresa Zymo Research.

### 2.2. Extração de DNA e sequenciamento

A extração de DNA foi realizada utilizando os kits ZymoBIOMICS® -96 MagBead DNA (ZymoResearch, Irvine, CA) ou ZymoBIOMICS® DNA Miniprep, através de uma plataforma de extração automatizada. A identificação do metagenoma foi realizado com 10% PhiX spike-in usando Sequenciamento de Nova Geração através do sistema Illumina® MiSeq™, com o kit de reagente v3 (600 ciclos). Inicialmente, foram construídas bibliotecas de DNA específicas para ambos os grupos. Para bactérias, houve o sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S usando o kit Quick-16S™ NGS Library Prep Kit (ZymoResearch, Irvine, CA), no qual primers 16S foram utilizados para amplificar a região V3-V4 do gene. Na identificação dos fungos, objetivou-se à amplificação completa da região ITS (Internal Transcribed Spacer) usando o mesmo kit, entretanto com a utilização de primers para ITS2. Controles negativos e positivos foram utilizados durante todos os processos.

### 2.3. Análise de bioinformática

Os resultados do sequenciamento foram utilizados para atribuição de relações filogenéticas, visualização da composição das amostras, alpha- e beta- análise de diversidade. Variantes de sequência de amplicon (ASVs) foram inferidos a partir das leituras usando a pipeline DADA2. Esses foram utilizados para gerar gráficos da análise de coordenadas principais 3D (PCoA), usando uma matriz de distância da composição de espécies pelo método Bray-Curtis. Os resultados foram reanalisados pelo alinhamento das sequências amplificadas usando o banco de dados da coleção de nucleotídeos do National Center for Biotechnology (NCBI) e a ferramenta nucleotide BLAST.

O software MEGA v. 10.1.7 foi utilizado para o alinhamento, construção e visualização da árvore filogenética. O alinhamento das sequências foi

<sup>1</sup> Biotecnologista e Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas, [renanbiotec@gmail.com](mailto:renanbiotec@gmail.com)

<sup>2</sup> Biologista molecular pelo Juniata College (EUA) - Professor na Graduação e Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Indiana University (EUA), [bochman@indiana.edu](mailto:bochman@indiana.edu)

realizado com o uso da ferramenta ClustalW, e a árvore filogenética usando o método Bootstrap com 1000 replicações, a partir do método estatístico Neighbor-joining. As árvores circulares foram usadas como templates para as figuras finais, as quais tiveram esquemas e cores adicionados através do software GIMP v.2.10.18. A composição microbiana para cada amostra foi avaliada através do software GraphPad Prism 7, bem como a construção dos gráficos circulares para exposição dos níveis e organizações filogenéticas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise através de bioinformática permitiu a identificação dos microbiomas das amostras, foi possível observar 60 gêneros e 140 espécies diferentes de bactérias, e ainda 4 isolados os quais foi possível somente a identificação a nível de família. As bactérias com maior prevalência em nosso estudo foram *Lactobacillus acetotolerans* (em 60% das amostras), *Pediococcus damnosus* (35%) e *Ralstonia picketti-mannitolilytica* (35%). Na identificação de fungos, foram observados 19 gêneros e 26 espécies, dentre os quais os mais prevalentes nas amostras foram as leveduras *Brettanomyces bruxellensis* (75%) e *Saccharomyces cerevisiae* (65%). Ainda, além das leveduras identificadas, foi possível observar a presença do material genético de cogumelos (ex: *Agaricus iranicus*) e bolores (ex: *Capnodiales* sp.).

Como observado por BOKULICH et al. (2012) e SPITAEELS et al. (2014), que descrevem microrganismos associados às fases da fermentação espontânea de cervejas (fermentação, acidificação e maturação), também foram identificados em nosso trabalho os DNAs de bactérias da família Enterobacteriaceae, representando 26.36% das bactérias identificadas. De grande importância para cervejas sour, foram observados *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp., e bactérias ácido-lácticas dos gêneros *Leuconostoc* spp., *Weissela* spp. e *Aerococcus* spp.

Foi identificada a presença de 4 espécies diferentes de *Brettanomyces* spp., as quais têm grande influência nos sabores de Lambics, English Ales e American Coolship Ales (DE ROOS; DE VUYST, 2019). A origem dessas leveduras selvagens está ligada tanto a inoculação de starters comerciais quanto a sua presença no microambiente em que essas cervejas foram produzidas, representando sua grande adaptabilidade a fermentação cervejeira. A presença desse microrganismos no interior dos barris de madeira, nos quais as cervejas foram maturadas e/ou fermentadas, pode ser a fonte de inóculo dessas leveduras, como observado por DE ROOS et al. (2019), o que também pode explicar a presença de leveduras como *Pichia* spp., *Wickerhamomyces* spp., *Debaryomyces* spp., e fungos como *Penicillium* spp. no metagenoma identificado de cada amostra.

### 4. CONCLUSÕES

Em conclusão, foi possível determinar o microbioma de cervejas produzidas por fermentação mista, fornecendo informações importantes para que a indústria cervejeira possa conhecer e entender as reações e resultados dos processos empregados em suas fábricas.

Como perspectivas futuras, iremos combinar as culturas obtidas e acompanhar a evolução da população microbiana através do curso da fermentação para determinar quais espécies são dominantes, que características determinam na fermentação que auxiliará no desenvolvimento de novas culturas personalizadas para produção de

<sup>1</sup> Biotecnologista e Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas, renanbiotec@gmail.com

<sup>2</sup> Biologista molecular pelo Juniata College (EUA) - Professor na Graduação e Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Indiana University (EUA), bochman@indiana.edu

cervejas de fermentação mista.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W.; MILLS, D. A. Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, 2012.

DE ROOS, J.; DE VUYST, L. Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 99, n. 1, p. 25-38, 2019.

DE ROOS, J.; VAN DER VEKEN, D.; DE VUYST, L. The interior surfaces of wooden barrels are an additional microbial inoculation source for lambic beer production. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 85, n. 1, p. 1-18, 2019.

FARIA-OLIVEIRA, F. et al. The Role of Yeast and Lactic Acid Bacteria in the Production of Fermented Beverages in South America. In: *Food Production and Industry*. [s.l.] InTech, 2015. v. ip. 13.

SPITAELS, F. et al. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, 2014.

VRIESEKOOOP, F. et al. 125th Anniversary review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 118, n. 4, p. 335-345, 2012.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cerveja, Fermentacao mista, Metagenoma, Microbioma

<sup>1</sup> Biotecnologista e Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas, renanbiotec@gmail.com

<sup>2</sup> Biologista molecular pelo Juniata College (EUA) - Professor na Graduação e Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Indiana University (EUA), bochman@indiana.edu