

Saccharomyces pastorianus:

a levedura híbrida que deu origem às cervejas *lagers*


Suzane de Souza Lovatti¹, Sandro Vandermuren Griffo¹, Marcela Ferreira Paes²

¹ Graduandos em Química Industrial, Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Vila Velha, ES

² Coordenadora do Curso de Bacharelado em Química Industrial, Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Vila Velha, ES

Autor para correspondência: sulovatti@gmail.com

Palavras-chave: *Saccharomyces pastorianus*, fermentação, lager, levedura, cerveja



O consumo de cerveja faz parte do dia-a-dia de grande parte da população adulta brasileira, de forma que as cervejas do tipo *lager* (no qual se inclui o estilo Pilsen) permanecem sendo as mais consumidas. As cervejas do tipo *lager* são obtidas a temperaturas entre 8 e 15°C, por meio de um processo de fermentação conduzido por leveduras da espécie *Saccharomyces pastorianus*. A herança genética desta espécie provém da já conhecida *S. cerevisiae* e da recém-descoberta *S. eubayanus*. As leveduras do tipo *lager* subdividem-se em dois grupos: *Saaz* e *Frohberg*. Suas características são reflexos das diferentes proporções dos genomas provenientes de *S. cerevisiae* e *S. eubayanus* entre os dois grupos.

O início da produção da cerveja remonta ao período Neolítico e desde então, a bebida tem apresentado diversos papéis sociais ao longo da história. Dentre suas várias utilizações, destacam-se seu uso como oferenda em cerimônias religiosas, como salário em sociedades antigas e como fonte nutritiva de água de boa qualidade em tempos de escassez. O consumo da bebida é extremamente popular, tornando sua produção rentável e possibilitando impactos positivos na economia. Dados de 2016 indicam que o brasileiro consome, em média, 60,7 litros de cerveja ao ano, enquanto na República Tcheca o consumo gira em torno de 143 litros.

De forma geral, a fabricação da cerveja pode ser dividida em quatro etapas principais: brassagem, fervura, resfriamento e fermentação. A brassagem consiste no processo pelo qual o amido contido nos grãos de **malte** é convertido (por ação das enzimas também contidas nos grãos) em açúcares fermentáveis, tais como maltose e glicose. Nesta etapa, os grãos de malte são mergulhados em água numa temperatura que favoreça a atividade das enzimas presentes (entre 65 e 68°C) que transformam as moléculas de amido do malte em açúcares menores, possibilitando sua posterior fermentação. O líquido doce obtido contendo os açúcares fermentáveis é chamado de **mosto**. Após a brassagem, o mosto é fervido por pelo menos uma hora e nele se adiciona o **lúpulo**, responsável pelo amargor e aroma da cerveja. Ao final da fervura, o mosto é resfriado para possibilitar um ambiente adequado para a adição das leveduras, responsáveis pela fermentação dos açúcares obtidos.

As leveduras são organismos unicelulares eucarióticos pertencentes ao reino Fungi, cujas espécies mais importantes para este tipo de produção pertencem ao gênero *Saccharomyces*. Diferentes **cepas** influenciam em diversos parâmetros como aroma e teor alcoólico, possibilitando a produção de diversos estilos de cerveja. As leveduras consumirão os açúcares produzidos durante a brassagem, convertendo-os em gás carbônico, álcool e outros compostos de sabor, típicos da cerveja.

As cervejas **lagers** representam o tipo mais conhecido e consumido desta bebida, sendo o estilo **Pilsen** seu principal representante. A espécie *Saccharomyces pastorianus* promove o processo fermentativo deste tipo de cerveja, caracterizada por se realizar a temperaturas mais baixas (entre 8 e 15°C) e pela decantação da levedura (Tabela 1).

Mosto - meio no qual ocorre a fermentação. Na produção de cerveja, consiste no líquido contendo açúcares resultantes da brassagem, no qual a levedura será inoculada.

Cepa - termo utilizado para se referir a variações de uma mesma espécie de microrganismos. Nos casos em que uma espécie sofre mutações ou se adapta a novas condições ambientais, seus descendentes podem formar uma nova cepa, porém mantendo semelhanças morfológicas e/ou fisiológicas com seu ancestral.

Lager - tipo de cerveja obtida a temperaturas entre 8 e 15°C, cuja levedura utilizada para fermentação do mosto (*Saccharomyces pastorianus*) deposita-se ao fundo do fermentador durante o processo.

Malte - grão germinado de um determinado cereal. Durante a maltagem, o cereal (cevada, por exemplo) é umedecido e começa a germinar. Quando as radículas crescem, o grão é seco, para que o processo seja cessado, e em seguida torrado. Os grãos maltados são ricos em enzimas e produzem grandes quantidades de açúcares fermentáveis.

Lúpulo - são as flores cônicas da planta fêmea de uma trepadeira, *Humulus lupulus*. Essas flores são desidratadas e adicionadas durante a produção da cerveja para dar amargor, sabor e aroma.

Pilsen - estilo de cerveja *lager*, originária da cidade tcheca homônima, com cor entre palha e dourado-escuro, apresentando colarinho branco e duradouro. Este estilo é o mais comum entre as cervejas comerciais brasileiras.

Características	Leveduras Ale	Leveduras Lager
Tipo de fermentação	"Alta*"	"Baixa*"
Espécie principal	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pastorianus</i>
Temperatura de fermentação	18-22°C	8-15°C
Temperatura máxima de crescimento celular	≥ 37°C	< 34°C
Fermentação de melibiose	Não fermentam	Fermentam

Tabela 1. Principais diferenças entre leveduras *ale* e *lager*. *O tipo de fermentação "alta" e "baixa" referem-se à posição que as leveduras fermentadoras localizam-se no fermentador, na parte superior ou inferior, respectivamente.



O GRUPO *Saccharomyces sensu stricto*

As espécies de leveduras de maior interesse econômico do gênero *Saccharomyces* encontram-se reunidas dentro do grupo *Saccharomyces sensu stricto* de acordo com a sequência de RNA ribossômico e com o tamanho e estabilidade do genoma mitocondrial. A *S. cerevisiae* encontra-se inserida no grupo *Saccharomyces sensu stricto*, que também é composto por outras espécies próximas como a *S. bayanus*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus*.

Enquanto a *S. cerevisiae* contribui para a produção de bebidas alcoólicas (cervejas e vinhos), pães e biomassa, a levedura híbrida *S. pastorianus* (syn. *carlsbergensis*) contribui exclusivamente para fermentações de cervejas do tipo *lager*. A *S. bayanus* representa um

nicho de levedura industrial menos relevante na produção de vinhos, podendo ser encontrada em fermentações a temperaturas mais baixas que as aplicadas utilizando *S. cerevisiae* (Tabela 1). A *S. bayanus* é predominante ao final das fermentações naturais de vinho devido à sua tolerância a altas concentrações de etanol. A quarta espécie citada desse grupo, *S. paradoxus*, diferencia-se por não ser “domesticada” (ou seja, por não ser utilizada pelo homem por meio da seleção e reprodução sucessiva de culturas com características desejáveis), sendo encontrada na natureza em árvores de folhas largas, solos e insetos. Também fazem parte do grupo *Saccharomyces sensu stricto* as espécies *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. abricoluse*, *S. eubayanus*, que não são utilizadas industrialmente.

PRINCIPAIS ESPÉCIES DE LEVEDURAS DO PROCESSO CERVEJEIRO

As leveduras utilizadas em processos cervejeiros são atualmente divididas em dois grandes grupos: leveduras de cervejas **ale** (*S. cerevisiae*) e leveduras de cervejas **lager** (*S. pastorianus* syn. *carlsbergensis*). Tradicionalmente, as **ale** caracterizam-se como leveduras de alta fermentação, pois se mantêm na superfície do líquido durante o processo enquanto as **lagers** são leveduras de baixa fermentação, assim denominadas por se manterem no fundo do fermentador (tradução dubia do termo em inglês *Bottom Fermenting*) e formando apenas uma pequena camada de superfície. Atualmente, esta distinção não é tão útil, visto que muitas cepas de leveduras utilizadas na produção de ales também possuem a capacidade de decantar e se manter ao fundo do fermentador.

A classificação formal das leveduras cervejeiras tem mudado significativamente ao longo do tempo, de forma que, no passado, tanto leveduras usadas na produção de cerveja **ale** quanto na de cerveja **lager**, eram caracterizadas como variantes de *S. cerevisiae*. Como as cepas apresentavam diversas diferenças genéticas e fisiológicas, a separação destas espécies passou a ser proposta. Como características divergentes entre as mesmas, podem ser citadas a habilidade em fermentar **melibiose** (que é convertida em galactose e glicose por atividade enzimática que não ocorre nas cepas **ale**) e suas temperaturas máximas de crescimento (cujo limite para as **lagers** é de 34°C). As principais características que diferenciam as leveduras **ale** e **lager** são apresentadas na Tabela 1.

Devido à produção e ao consumo crescentes de cervejas artesanais, um terceiro tipo de levedura vem ganhando importância econômica. Trata-se das leveduras do gênero *Brettanomyces*, ou Brets, como são conhecidas na indústria. Estas são utilizadas na produção do estilo **lambic**, de origem belga, e que historicamente consistia na fermentação espontânea do mosto promovida por leveduras selvagens, ou seja, por leveduras naturais do ambiente. As *Brettanomyces* spp. são consideradas contaminantes devido à sua capacidade

de produzir aromas fenólicos (consequência da formação de fenóis voláteis) e ácido acético, ambas características indesejáveis na produção de diversos estilos de cerveja. Apesar desta visão negativa à qual estas espécies historicamente foram associadas, os sabores e aromas obtidos pelos produtos de suas fermentações têm sido explorados na fabricação de cervejas com características mais ácidas.

HERANÇA GENÉTICA DA *S. pastorianus*

Por muito tempo, os processos cervejeiros basearam-se na produção de cervejas do tipo **ale**, utilizando cepas de *S. cerevisiae* cuja fermentação ocorre a temperaturas relativamente mais altas. Somente a partir do século XV as **lagers** passaram a existir como estilo de cerveja, tornando-se mais populares no século XIX.

O advento da produção de cervejas **lagers** com cepas puras de levedura remonta ao final do século XIX, por meio do trabalho de Emil Christian Hansen, no Laboratório Carlsberg em Copenhague. Hansen isolou quatro cepas distintas a partir da cultura de leveduras da cerveja **lager** Carlsberg. Dessas, apenas uma se mostrou adequada para a fermentação da cerveja, sendo então chamada de “*Carlsberg Yeast No. 1*” e introduzida na cervejaria homônima para uso em escala industrial no dia 13 de maio de 1883. A “*Carlsberg Yeast No. 1*” foi então nomeada *S. carlsbergensis* e atualmente é conhecida como *S. pastorianus*.

O sequenciamento genético de cepas **ale** e **lager** tem mostrado que a *S. pastorianus* primitiva consistia em um híbrido **alotetraploide** criado pela fusão da *S. cerevisiae* com a levedura contaminante *S. eubayanus*, (uma espécie de *Saccharomyces* criotolerante que até 2011 era desconhecida, recebendo esta nomenclatura devido à sua semelhança com a *S. bayanus*, que por sua vez consiste num híbrido da *S. eubayanus*, *S. uvarum* e *S. cerevisiae*).

Pesquisadores propuseram um modelo em que a hibridização da levedura diplóide *S. eubayanus* com uma cepa de *S. cerevisiae* do tipo **ale** também diplóide gerou a levedura alotetraploide *S. pastorianus*. A domestica-

Ale - tipo de cerveja produzida a temperaturas entre 18 e 22°C, cujas leveduras utilizadas emergem à superfície do mosto durante a fermentação.

Melibiose - dissacarídeo que, quando hidrolisado pela enzima α -D-galactosidase, converte-se em galactose e glicose, possibilitando sua fermentação.

Alotetraploide - termo utilizado para descrever um organismo que possui quatro conjuntos de cromossomos idênticos (4n) provenientes de espécies diferentes.

ção impôs uma forte pressão seletiva e extensa reorganização genômica, de forma que os organismos descendentes domesticados tornaram-se geneticamente distintos de seus ancestrais encontrados na natureza, resultando na criação de um híbrido com grande capacidade fermentativa, característica da *S. cerevisiae*, e com tolerância a baixas temperaturas assim como a *S. eubayanus*.

Ainda segundo este modelo, as cepas híbridas de *S. pastorianus* podem ter sido as progeni-

toras de diversas cepas híbridas de *S. bayanus*, frequentemente verificadas como contaminantes em processos fermentativos, através de eventos de hibridização adicionais envolvendo cepas de *S. uvarum*. A análise genômica das cepas de *S. bayanus* mais conhecidas, CBS 380 e NBRC1948, mostram que a parte de seu genoma não pertencentes a *S. cerevisiae* correspondem a 67% de *S. uvarum* e 33% de *S. eubayanus*, e 37% de *S. uvarum* e 63% de *S. eubayanus* respectivamente. (Figura 1).

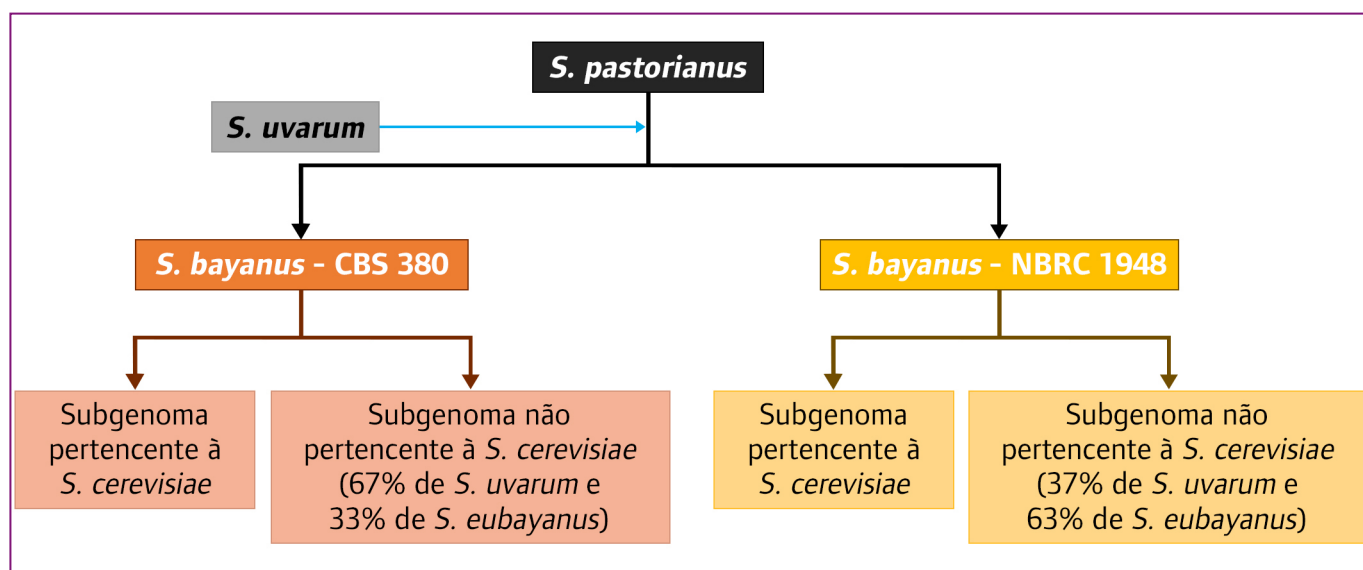
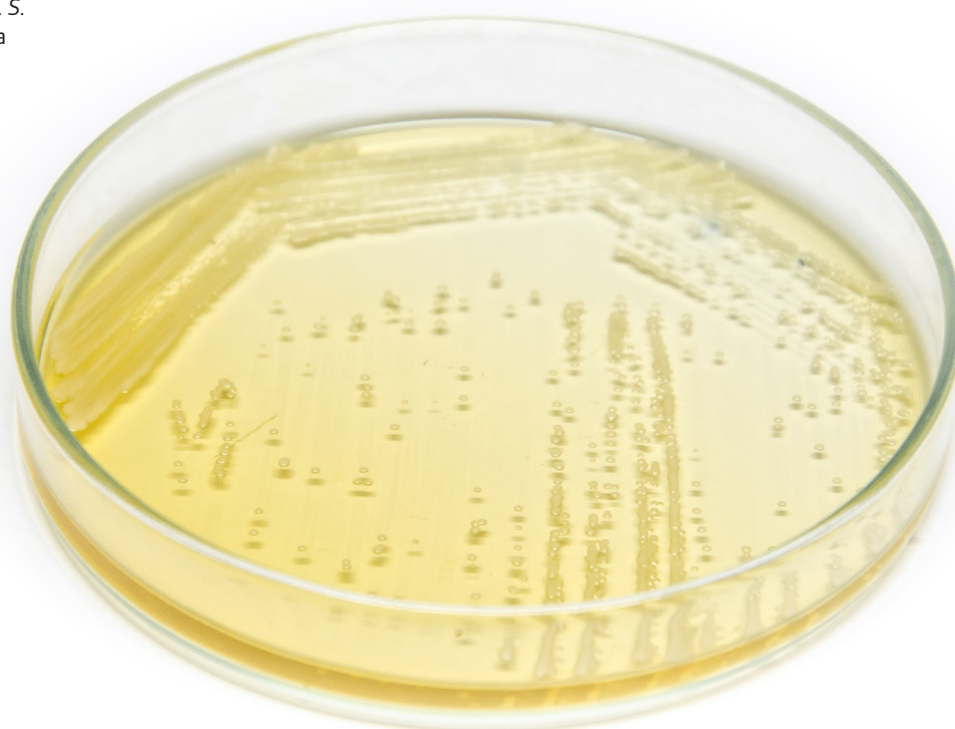


Figura 1.

Descendência de cepas de *Saccharomyces bayanus* a partir do ancestral *S. pastorianus*. *S. pastorianus* ancestral é uma cepa híbrida, que pode ter hibridado com *S. uvarum*.



OS GRUPOS SAAZ E FROHBERG

As cepas de *S. pastorianus* têm sido estudadas e divididas em dois grupos: *Saaz* e *Frohberg*, nomeados de acordo com as regiões da Boêmia e Alemanha onde foram inicialmente utilizadas. Estes dois grupos, apesar de se caracterizarem pela fermentação em baixas temperaturas, apresentam diferenças em diversos outros aspectos. O grupo *Saaz*, também chamado de Grupo Híbrido 1, é conhecido por apresentar alta **floculação**, porém menor

capacidade de fermentação quando comparado ao grupo *Frohberg* (ou Grupo Híbrido 2), que por sua vez é composto por cepas menos floculentas porém altamente fermentativas. Pesquisas sugeriram que ambos os grupos apresentavam capacidades similares de fermentação de glicose e maltose, porém diferiam em relação ao uso de maltotriose e por diferenças no genoma. As diferentes características observadas entre os dois grupos de leveduras do tipo *lager* estão paralelamente ligadas às diferenças de seus genomas, conforme comparação apresentada na Figura 2.

Floculação - fenômeno apresentado por leveduras, as quais se unem em agregados chamados flocos, constituídos por várias células.

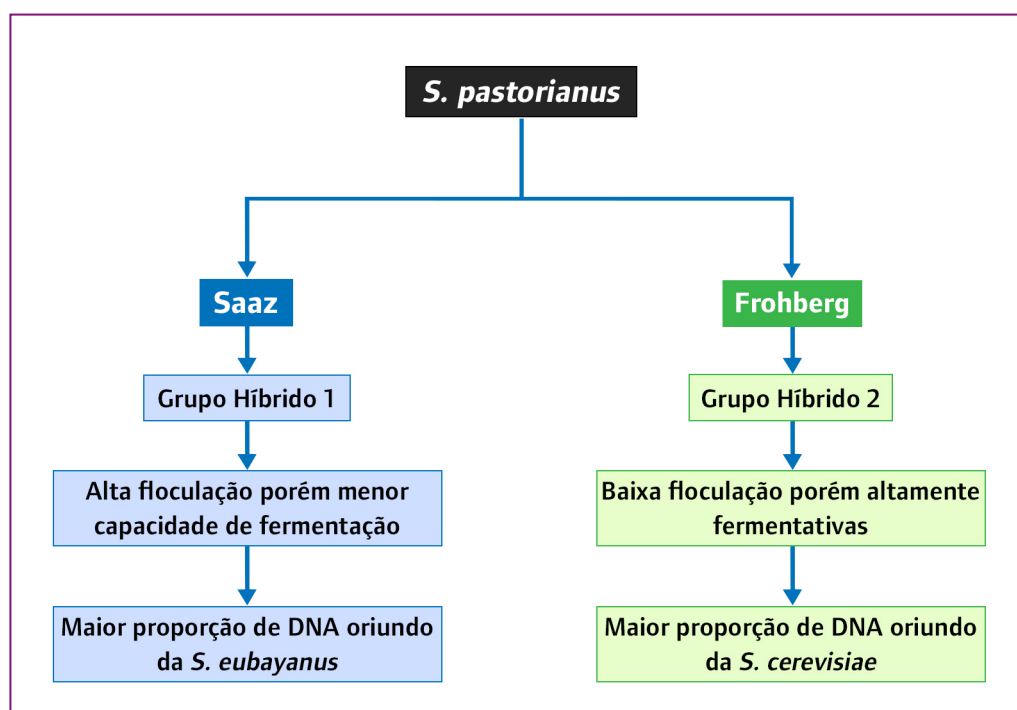


Figura 2. Caracterização básica e comparação entre as cepas de *S. pastorianus* dos Grupos Híbridos 1 (*Saaz*) e 2 (*Frohberg*), responsáveis pela fermentação de cervejas do tipo *lager*.

Assim, segundo os estudos de Dunn e Sherlock (2008), o ancestral do Grupo *Saaz* é resultado do cruzamento entre um esporo de uma *S. cerevisiae* do tipo *ale* haplóide e um esporo de *S. eubayanus* haplóide, produzindo um híbrido diplóide de *S. pastorianus* (Figura 3a). Devido à perda de uma porção considerável do DNA oriundo da *S. cerevisiae* (cromossomos VI e VII, assim como partes do IX, XIII e XV), a proporção de DNA derivada da *S. eubayanus* tornou-se maior, fazendo com que as

características pertencentes a esta última prevalecessem. Em comparação, a formação do ancestral do Grupo 2 é derivada de um cruzamento entre uma célula diplóide de *S. cerevisiae* e uma célula haplóide de *S. eubayanus*, criando um genoma híbrido com maior proporção de DNA oriundo da *S. cerevisiae* (Figura 3b). Mesmo as cepas atuais, após consideráveis perdas deste sub-genoma, continuam apresentando uma quantidade maior de DNA do ancestral *S. cerevisiae*.

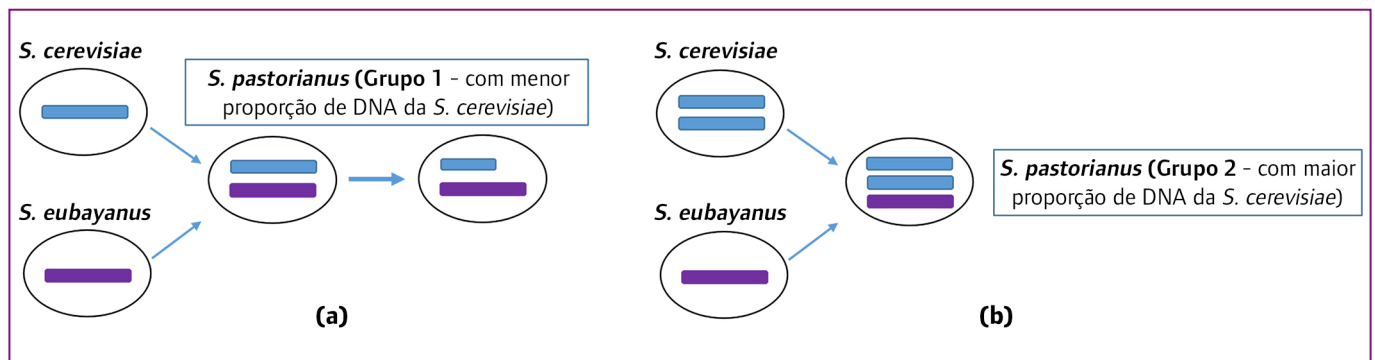


Figura 3. (a) Formação do ancestral do Grupo 1 – Saaz e (b) formação do ancestral do Grupo 2 – Frohberg.

As principais espécies de leveduras utilizadas nos processos cervejeiros podem ser encontradas no grupo *Saccharomyces sensu stricto*. Historicamente, a espécie *S. cerevisiae* foi a protagonista deste tipo de produção, que até o século XV baseava-se na fabricação de cervejas ale. As temperaturas ótimas de fermentação apresentadas pelas leveduras do tipo ale e lager são o parâmetro mais relevante para sua diferenciação.

O recente sequenciamento genético de cepas de *S. pastorianus*, espécie característica do estilo lager, demonstra que sua origem deriva da própria *S. cerevisiae*, além da recém descoberta *S. eubayanus*, da qual as cepas lager herdaram a capacidade fermentativa a temperaturas mais baixas.

Dois grupos são identificados dentre as cepas de leveduras lager, de forma que o Grupo 1 (Saaz) possui maior proporção de DNA oriundo da *S. eubayanus* e, conseqüentemente, apresenta maior capacidade de floculação quando comparado às cepas pertencentes ao Grupo 2, que por sua vez possuem maior proporção de DNA da ancestral *S. cerevisiae*, apresentando sua alta capacidade fermentativa.

PARA SABER MAIS

BARNETT, J. A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Rees: a short review for non-taxonomists. *Yeast*, v. 8, n. 1, p. 1-23, 1992.

DUNN, B.; SHERLOCK, G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Research*, v. 18, n. 10, p. 1610-1623, 2008.

GIBSON, B.; LITI, G. *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast*, v. 32, n. 1, p. 17-27, 2015.

HILL, A. E. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Ed Cambridge: Woodhead Publishing, 2015, 506 p.

LIBKIND, D. et al. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 108, n. 35, p. 14539-14544, 2011.

