



Universidade de Aveiro

Ano 2021

Departamento de Química

**João Pedro
Oliveira
Costa**

**Caracterização microbiológica de cervejas
artesaniais do tipo “Sour”**



**João Pedro
Oliveira
Costa**

**Caracterização microbiológica de cervejas
artesaniais do tipo “Sour”**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, no ramo Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Ângela Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e sob a supervisão empresarial do Mestre Cervejeiro Nicolas Billard, da empresa Essência D’Alma, Lda.

o júri

presidente

Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

arguente

Doutora Cátia Sofia Faria Martins
Bolsreira de Pós-Doutoramento, CICECO - Universidade de Aveiro

orientador

Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Por me terem recebido e acolhido durante a realização do estágio, agradeço aos colaboradores da empresa Essência D'Alma, bem como ao Mestre Cervejeiro Nicolas Billard, pela oportunidade de realização do estágio na empresa e pelo acompanhamento do decorrer do trabalho.

Pela orientação e apoio prestado durante a realização deste trabalho e escrita da dissertação, e pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas, agradeço à Professora Doutora Ângela Cunha.

Pelo auxílio em diversas tarefas relacionadas com o meu trabalho, agradeço à Natalia Sierra, investigadora do laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia, assim como aos outros parceiros do laboratório, que se mostraram colaborantes.

Pela partilha de saberes e pelo apoio durante o estágio, agradeço aos meus amigos, que igualmente me acompanharam durante todo o meu percurso académico.

Por fim, pelo apoio incondicional a todos os níveis, agradeço aos meus pais e irmão. Sem eles, isto não teria sido possível.

palavras-chave

cerveja artesanal “sour”, microbiomas, leveduras de cerveja, bactérias do ácido láctico (LAB), bactérias do ácido acético (AAB), sequenciação *Illumina*

resumo

As cervejas artesanais do tipo “Sour” representam um caso particular na indústria cervejeira, uma vez que a sua produção envolve fermentações espontâneas operadas por fungos e bactérias. Disto resulta um pH mais baixo do que a cerveja comum, associado a aromas particulares mais ácidos. O objetivo do trabalho foi a caracterização microbiológica de uma série de diferentes cervejas de tipo “Sour”, produzidas por uma cervejaria artesanal. A quantificação de bactérias e fungos seguiu uma abordagem dependente de cultivo e a caracterização detalhada das comunidades de fungos e bactérias foi feita por sequenciação avançada das regiões ITS2 de fungos e 16S rRNA de bactérias. Através da caracterização detalhada das comunidades de fungos e bactérias associadas a dois estilos particulares (*Extra* e *Rubi*), procurou-se pôr em evidência as inter-relações entre os microrganismos e as características distintivas de cada estilo. Os resultados confirmaram a dominância de leveduras não-*Saccharomyces*, particularmente do género *Dekkera*, e de bactérias das famílias *Lactobacillaceae* e *Acetobacteraceae*. No entanto, alguns dos grupos microbianos detetados mostraram ser exclusivos de um dos estilos, o que pode confirmar um efeito seletivo de fatores relacionados com a fermentação, como o álcool e o pH, e um efeito de inoculação a partir das barricas de madeira em que decorre a fase de maturação.

keywords

Sour beer, microbiome, brewing yeasts, lactic acid bacteria (LAB), acetic acid bacteria (AAB), Illumina sequencing

abstract

Craft sour beer represents a particular case in brewing, since its production involves spontaneous fermentations operated by fungi and bacteria. This results in a lower pH than traditional beer, associated with particular flavours more acid. The objective of the work was the microbiological characterization of an array of different sour beers, produced in a craft brewery. The quantification of bacteria and fungi followed a culture-dependent approach and the detailed characterization of fungal and bacterial communities involved a next generation sequencing approach, targeting the ITS2 region of fungi and 16S rRNA genes of bacteria. Through the detailed characterization of the communities of fungi and bacteria associated with two particular beer styles (*Extra* and *Rubi*), we sought to highlight the interrelations between microorganisms and the distinctive properties of each style. The results confirmed the dominance of non-*Saccharomyces* yeasts, particularly of the genus *Dekkera*, and bacteria of the families *Lactobacillaceae* and *Acetobacteraceae*. However, some of the microbial groups detected were found to be exclusive to one of the styles, which may confirm a selective effect of factors related to fermentation, such as alcohol and pH, and an inoculation effect from the wooden barrels where occurs the maturation phase.

Índice

Índice de figuras.....	iv
Índice de tabelas.....	iii
Índice de equações.....	iii
Abreviaturas.....	ii
I. Introdução.....	1
I.1. Contextualização.....	1
I.1.1. História da cerveja.....	1
I.1.2. A cerveja artesanal e a empresa: microcervejaria Vadia.....	3
I.2. Cerveja.....	4
I.2.1. Matérias-primas.....	4
I.2.1.1. Água.....	4
I.2.1.2. Cereais.....	5
I.2.1.2.1. Cevada.....	6
I.2.1.3. Lúpulo.....	8
I.2.1.4. Leveduras.....	9
I.2.2. Processo de produção.....	12
I.2.2.1. Maltagem e moagem.....	13
I.2.2.2. Brassagem, filtração, fervura e arrefecimento do mosto.....	14
I.2.2.3. Fermentação e maturação.....	18
I.2.2.3.1. Subprodutos da fermentação.....	20
I.2.2.3.2. Contaminações microbianas.....	22
I.2.2.4. Filtração e carbonatação.....	22
I.2.2.5. Enchimento e pasteurização.....	23
I.2.2.6. Armazenamento e distribuição.....	24
I.2.3. Cerveja “Sour”.....	25
I.3. Diversidade microbiana em cervejarias artesanais.....	28
I.4. Identificação de microrganismos na indústria cervejeira.....	31
I.4.1. Abordagens dependentes de cultivo.....	32
I.4.2. Abordagens independentes de cultivo.....	33
I.5. Objetivo do estágio.....	35
II. Materiais e Métodos.....	36
II.1. Amostragem.....	36
II.2. Avaliação de parâmetros da fermentação (em cuba).....	36
II.3. Colheita de amostras para análises microbiológicas.....	38

II.4. Análises microbiológicas dependentes de cultivo	38
II.5. Análises independentes de cultivo	39
II.5.1. Extração de DNA metagenômico e sequenciação	39
II.5.2. Processamento da sequenciação e análises estatísticas	41
III. Resultados e Discussão.....	43
III.1. Parâmetros de evolução da fermentação	43
III.2. Quantificação de microrganismos	47
III.3. Estrutura e composição das comunidades microbianas	50
III.3.1. Diversidade e abundância fúngica	50
III.3.2. Diversidade e abundância bacteriana.....	56
IV. Conclusão	62
Referências bibliográficas	64
Anexo I – Informações gerais sobre os produtos criados e comercializados pela Essência D’Alma.....	72
Anexo II – Processo de produção de cerveja <i>Sour</i> na Essência D’Alma	74
Anexo III – Tabelas com as OTUs e os níveis taxonômicos.....	75
Anexo IV – Manuscrito para publicação.....	78

Índice de figuras

Figura 1. Evolução do número de microcervejarias em Portugal. Adaptado da referência ¹¹	3
Figura 2. Exemplo de um grão de cevada e seus constituintes: 1 – pelagem rígida; 2 – endosperma; 3 – camada de aleurona; 4 – tegumento; 5 – escutelo; 6 – caulículo; 7 – radícula. Adaptado da referência ³	6
Figura 3. Esquema da glicólise e fermentação alcoólica realizada pela <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Adaptado da referência ²⁷	10
Figura 4. Esquema das operações unitárias realizadas durante a produção de cerveja numa indústria. Adaptado da referência ⁵	12
Figura 5. Representação das atividades metabólicas da <i>Saccharomyces</i> , que resultam na produção de inúmeros compostos interferentes na qualidade da cerveja. Adaptado da referência ²⁹	20
Figura 6. Evolução da diversidade de microrganismos presentes na cerveja lambic no decurso da fermentação: fase <i>Enterobacteriaceae</i> , fermentação, acidificação e maturação. Adaptado da referência ³³	27
Figura 7. Diagrama demonstrativo do microbioma existente nas várias etapas da produção de cerveja: desde a maltagem ao empacotamento. Adaptado da referência ²⁹	28
Figura 8. Procedimento de sequenciação por síntese (Illumina). Adaptado da referência ⁷⁵	34
Figura 9. Amostras de cervejas Rubi (Barricas #9, #11 e #13) e Extra (Barricas #21, #22 e #23).....	46
Figura 10. Representação do teor de bactérias mesófilas aeróbias totais, bactérias lácticas, fungos totais e leveduras de cerveja em amostras correspondentes a diferentes estilos de cervejas tipo “Sour”, determinados por contagem de colónias após sementeira em meios de cultura adequados. Os valores representam a média de 3 (bactérias) ou 5 (fungos) réplicas analíticas e as barras de erro representam o desvio padrão. * – não determinado por problemas de contaminação.....	48
Figura 11. Curvas de rarefação da riqueza de OTUs em função do esforço de sequenciação das comunidades de fungos das amostras de cerveja a um nível de similaridade de 97%.	51
Figura 12. Mapa da composição comunitária fúngica de amostras de cerveja com base na distância Bray-Curtis calculada a partir de abundâncias OTU fundidas ao nível do género.	52
Figura 13. Análise de escala multidimensional baseada na matriz de distância Bray-Curtis em pares das comunidades fúngicas (as duas primeiras coordenadas são mostradas, representando 88,4% da variação total).	55
Figura 14. Diagrama de Venn de OTUs fúngico em abundâncias superiores a 1% nos dois tipos de cerveja analisados. Os números indicam quantas OTUs foram partilhadas ou exclusivas nas amostras.	56
Figura 15. Curvas de rarefação da riqueza de OTUs em função do esforço de sequenciação das comunidades de bactérias das amostras de cerveja a um nível de similaridade de 97%.	57
Figura 16. Mapa da composição comunitária bacteriana de amostras de cerveja com base na distância Bray-Curtis calculada a partir de abundâncias OTU fundidas ao nível do Género.	58

Figura 17. Análise de escala multidimensional baseada na matriz de distância Bray-Curtis em pares das comunidades bacterianas (as duas primeiras coordenadas são mostradas, representando 88,4% da variação total). 60

Figura 18. Diagrama de Venn de OTUs bacterianos em abundâncias superiores a 1% nos dois tipos de cerveja analisados. Os números indicam quantas OTUs foram compartilhadas ou exclusivas nas amostras..... 61

Índice de tabelas

Tabela 1. Principais países produtores e consumidores de cerveja a nível europeu no ano de 2018. Adaptado da referência ¹¹	2
Tabela 2. Constituição da cevada antes da maltagem. Adaptado da referência ⁴	8
Tabela 3. Descrição do conteúdo e lote de cada barrica analisada, assim como o lote e a data de armazenamento da cerveja na mesma, e volume correspondente.	37
Tabela 4. Valores do °Brix, potencial alcoólico e pH inicial de cada amostra de cerveja analisada.	44
Tabela 5. Estimativa da riqueza de espécies e diversidade de comunidades de fungos em barricas de cervejas Extra e Rubi.....	52
Tabela 6. Estimativa da riqueza de espécies e diversidade de comunidades de bactérias em barricas de cervejas Extra e Rubi.	56

Índice de equações

Equação 1. Conversão dos α -ácidos (humulonas) em iso- α -ácidos (isohumulonas), durante a fervura do mosto. Adaptado da referência ¹⁵	17
--	----

Abreviaturas

AAB	<i>Acetic Acid Bacteria</i>
ACA	<i>American Coolship Ale</i>
ATP	Adenosina tri-fosfato
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CIP	<i>Cleaning In Place</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
DMS	Sulfureto de dimetilo
DON	Desoxinivalenol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
HMF	Hidroximetilfurfural
IBU	<i>International Bitterness Unit</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LAB	<i>Lactic Acid Bacteria</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NMDS	<i>Non-Metric Multidimensional Scaling</i>
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RBCA	<i>Rose Bengal Chloramphenicol Agar</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
TGGE	<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>
UFC	Unidades formadoras de colónias
UP	Unidade de pasteurização
VSCs	<i>Volatile Sulfur Compounds</i>
YGCA	<i>Yeast Glucose Chloramphenicol Agar</i>
WLD	<i>Wallerstein Laboratory Differential</i>
WLN	<i>Wallerstein Laboratory Nutrient</i>

I. Introdução

I.1. Contextualização

I.1.1. História da cerveja

O processamento de alimentos sempre esteve dependente de uma vasta gama de tecnologias de preservação, para assegurar que a qualidade dos alimentos era mantida, desde o seu fabrico até ao seu consumo. A fermentação constitui uma das tecnologias mais antigas, sendo um processo outrora aplicado como uma técnica de preservação de alimentos, através da inibição do crescimento da microflora indesejável ¹. Além disso, ajudava na redução de compostos antinutricionais como os taninos e polifenóis ². Apesar de terem sido explorados durante milhares de anos quer em alimentos quer em bebidas, foi apenas num passado recente que os processos fermentativos foram associados à atividade de microrganismos, no contexto do desenvolvimento do processo de pasteurização ^{1,3}. Os estudos de Pasteur sobre o papel das leveduras na fermentação alcoólica resultaram na identificação e caracterização de diferentes espécies envolvidas no processo, representando assim um marco na área da microbiologia alimentar ^{1,3,4}.

A produção de bebidas fermentadas remonta há vários anos e estima-se que estas já eram consumidas por populações nómadas do Neolítico ^{1,5}. Entre os anos 4000 e 2000 a.C., os Egípcios e os Sumérios desenvolveram o processo de produção de bebidas fermentadas a partir de cereais, tidos como os responsáveis pela génese da cerveja nas regiões do Crescente Fértil, Mesopotâmia e Egipto ^{3,6}. Este processo já se assemelhava ao da cerveja moderna, principalmente devido à fermentação alcoólica associada ¹. Além da fermentação, os processos tradicionais de produção de cerveja incluem inúmeras etapas: maltagem, que consiste na germinação dos grãos de cereais e na libertação de enzimas que degradam várias moléculas, especialmente o amido; brassagem, que inclui a fervura do mosto, a sua filtração e posterior arrefecimento; maturação da cerveja fermentada; filtração, enchimento e embalagem ⁷. A metodologia de produção de cerveja permaneceu maioritariamente artesanal até à revolução industrial, com alguns países europeus (Alemanha, Bélgica e Inglaterra) a destacarem-se na compreensão dos processos de produção de cerveja e no desenvolvimento de estilos específicos ⁸. Desde o final do século XIX até agora, a produção de cerveja registou grandes avanços tecnológicos para se tornar num processo finamente controlado, no qual foi possível assegurar a consistência das características do produto final ⁹. A industrialização trouxe

inovação no processo de produção a vários níveis, nomeadamente: 1) separação das várias etapas, minimizando a contaminação; 2) desenvolvimento de equipamentos modernizados, como moinhos para o malte, bem como da tubagem e das bombas; 3) capacidade de arrefecimento de grandes quantidades de mosto; 4) utilização de agentes de estabilização e clarificação da cerveja, como o colagénio, que ajudam na remoção de partículas em suspensão; 5) melhorias no processo de maltagem dos grãos. Além disto, verificou-se um desenvolvimento no sentido de melhoramento do processo de brassagem. Como forma de aumentar o controlo do processo e a estabilidade das cervejas, assistiu-se a uma otimização dos sistemas de filtração e à introdução de pasteurização e de carbonatação artificial para a inserção de dióxido de carbono na bebida ³. Atualmente, a produção de bebidas alcoólicas contribui significativamente para a economia de vários países, sendo as mais relevantes a cerveja, o vinho, a sidra e as bebidas espirituosas ⁵.

De um modo geral, a indústria cervejeira é dominada por um pequeno número de multinacionais e milhares de pequenos produtores e microcervejarias, que produzem dezenas de biliões de litros e geram centenas de biliões de dólares em receitas globais ¹⁰. Devido à expansão da comercialização em novos mercados na América e na Ásia, cerca de 34% da cerveja mundial é produzida na Europa atualmente ³. Na Tabela 1 encontram-se os 10 principais países produtores e consumidores de cerveja na Europa, no ano de 2018, em termos de volume (em 1,000 hl) ¹¹. A Alemanha foi o maior produtor e consumidor de cerveja na Europa no ano de 2018 ¹¹.

Tabela 1. Principais países produtores e consumidores de cerveja a nível europeu no ano de 2018. Adaptado da referência ¹¹.

Países produtores de cerveja	Produção (em 1,000 hl)	Países consumidores de cerveja	Consumo (em 1,000 hl)
Alemanha	93,652	Alemanha	84,649
Polónia	42,603	Reino Unido	48,559
Reino Unido	42,282	Espanha	39,890
Espanha	38,134	Polónia	38,360
Holanda	24,912	França	23,500
França	22,000	Itália	20,319
República Checa	21,272	Roménia	16,600
Roménia	16,600	República Checa	15,936
Itália	16,415	Holanda	12,269
Turquia	9,700	Áustria	9,190

I.1.2. A cerveja artesanal e a empresa: microcervejaria Vadia

Produzida pela primeira vez na década de 1970, a cerveja artesanal é hoje em dia uma bebida conhecida mundialmente, especialmente nos EUA ¹², sendo o país onde se concentra a maior parte da indústria cervejeira mundial ¹³. O processo de fabrico das cervejarias artesanais difere ligeiramente do processo industrial, o que afeta o microbioma e as características do produto final ⁸. A principal diferença entre o processo artesanal e o industrial está relacionada não só com as variedades de malte, lúpulo e leveduras utilizadas, mas também com o facto de as cervejarias artesanais produzirem pequenos lotes de cerveja. Isto permite a exploração de novos ingredientes e aromas, como por exemplo notas de aroma de café, de fruta e de especiarias, resultantes das variedades de matéria-prima utilizada que atribuem aromas à cerveja ¹⁴. O aumento da procura por receitas originais que se distingam, pelo seu sabor e textura, das marcas tradicionais conhecidas, resultou num aumento exponencial das microcervejarias, a nível europeu ¹². Em Portugal, existem algumas empresas nesta área, sendo um mercado que tem assistido a um crescimento exponencial, como se pode ver na Figura 1.

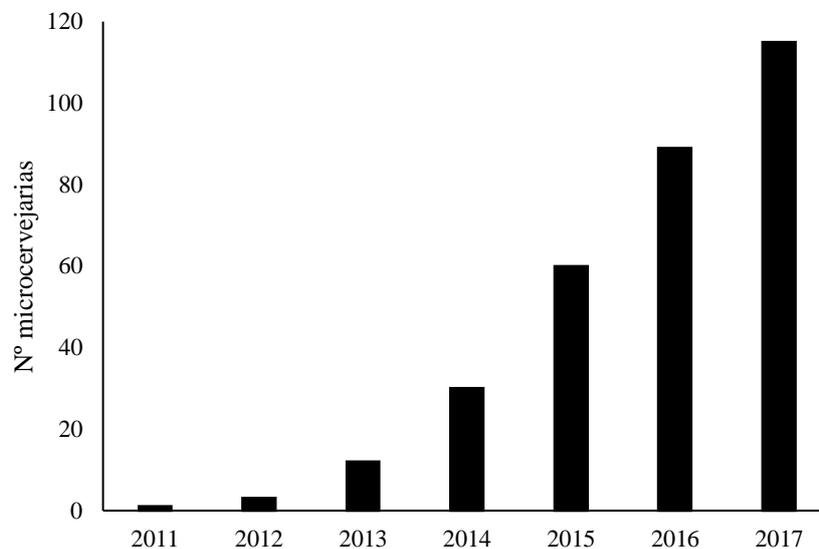


Figura 1. Evolução do número de microcervejarias em Portugal. Adaptado da referência ¹¹.

O presente trabalho foi realizado durante um estágio curricular em ambiente empresarial na cervejaria Essência D’Alma, detentora da marca Vadia. Esta empresa está sediada em Ossela, Oliveira de Azeméis. Além de produzir e comercializar diversos estilos de cervejas, a empresa formula também sidras de vários sabores (Anexo I).

A marca Vadia é uma das pioneiras na produção e comercialização de cerveja artesanal em Portugal. Desde a sua entrada no mercado, a marca tem sido distinguida e premiada nos mais diversos e conceituados concursos de cerveja a nível mundial, sendo cada vez mais reconhecida internacionalmente. Estes concursos são normalmente realizados em países com fortes hábitos cervejeiros, como é o caso da Bélgica, no *Brussels Beer Challenge*, da França, no *Concours de Lyon*, e da Inglaterra, no *World Beer Awards*. Estas conquistas fazem da cerveja Vadia a marca de cerveja artesanal portuguesa com maior reconhecimento mundial, possuindo mais de duas dezenas de medalhas.

I.2. Cerveja

A cerveja é uma bebida que resulta da atividade de leveduras selecionadas sobre um mosto preparado a partir de cevada maltada e/ou outros cereais e água, ao qual foi adicionado lúpulo que concede um aroma mais floral, além do seu amargor característico ¹⁵. A cerveja apresenta baixo pH, baixos níveis de oxigénio e alto teor em dióxido de carbono, sendo fatores que a protegem do eventual desenvolvimento de microrganismos contaminantes ou patogénicos. Essa proteção também é conferida pela adição de lúpulo, que possui propriedades antissépticas ¹⁶. No entanto, estas características detêm um poder limitado para controlar os organismos que causam deterioração na bebida, na medida em que não inibem as contaminações na totalidade ⁸.

I.2.1. Matérias-primas

I.2.1.1. Água

A água é um dos ingredientes da cerveja, sendo o seu componente maioritário, influenciando na qualidade do produto final. No processo de produção de cerveja, a água é maioritariamente usada na etapa de maltagem, e usada em menor quantidade no decorrer do restante processo de fabrico ¹⁷. A água usada na indústria cervejeira pode derivar de várias fontes, como poços ou nascentes. A água subterrânea possui a melhor qualidade em termos microbiológicos e compostos orgânicos. As águas superficiais provêm de lagos, rios e reservatórios. Deste modo, sofrem mudanças sazonais e a ocorrência de chuvas têm impacto na temperatura e na qualidade da própria água. Em comparação com as águas subterrâneas, as águas superficiais geralmente contêm pequenas concentrações

de minerais e são mais suscetíveis à contaminação microbiológica. A superfície do poço deve estar especialmente protegida, para evitar contaminações que possam ser causadas pela perfuração. Uma vez que a água absorve os minerais aquando da sua passagem pelo solo, a situação hidrogeológica é decisiva para a composição da água, assim como a localização das fontes ¹⁸. Antes de ser utilizada na cervejaria, a água é tratada, para garantir a composição considerada adequada ⁹. Como métodos de tratamento e controlo da qualidade microbiológica, as cervejarias podem recorrer a tratamento ultravioleta, microfiltração, uso de dióxido de cloro, uso de ozono, filtração por carvão ativado, entre outras técnicas ¹⁹. A água também sofre tratamento para a remoção dos iões que causam a sua dureza, antes da sua aplicação em sistemas de geração de vapor ⁹. O uso de permutadores de iões é amplamente utilizado na indústria de bebidas fermentadas para a desmineralização das águas, visto que este processo permite a remoção seletiva de catiões e aniões. Os iões que incrementam a dureza da água (cálcio, magnésio) podem ser removidos usando resinas de troca iónica, capazes de adsorver catiões e aniões a partir de uma solução eletrolítica e substituí-los por uma quantidade equivalente de iões da mesma carga ³. O oxigénio é removido quando a água é usada em inúmeras operações na cervejaria, principalmente no ajuste do teor alcoólico numa fermentação de alta gravidade, nas cervejas *ale* ⁹. A gestão da água e o descarte de resíduos tornaram-se um fator de custo significativo e são um aspeto importante a considerar no funcionamento de uma cervejaria ¹⁷.

I.2.1.2. Cereais

A produção de cerveja requer o uso de grãos de cereais, usualmente maltados, que apresentam na sua constituição polímeros úteis para a germinação dos grãos, como o amido e as proteínas. Durante a maltagem e a brassagem, estes polímeros originam moléculas mais simples, principalmente péptidos, dextrinas e açúcares de cadeias mais curtas. Deste modo, os cereais fornecem o substrato fermentativo, que contém os açúcares, às leveduras. Algumas das características dos cereais são importantes, como a quantidade e diversidade de metabolitos de interesse presentes e a capacidade de conversão dos polímeros complexos, através da maltagem ³.

I.2.1.2.1. Cevada

De entre os cereais cultivados, a cevada (*Hordeum vulgare*) é aquele que apresenta uma distribuição mais ampla em virtude da tolerância a diferentes condições climáticas, crescendo igualmente bem em ambientes frios ou temperados, em zonas de grande precipitação, com longos períodos de exposição à luz solar e até mesmo em ambientes secos³. Contém um elevado teor em amido e, na forma maltada, em enzimas hidrolíticas. Por estas razões, é o cereal mais usado na produção de cerveja^{3,4}. É também comum a utilização de outros cereais como o trigo, o arroz, o centeio, a aveia e o milho, dependendo do estilo de cerveja que se pretende. Os cereais podem ser adicionados sem maltagem prévia, de modo a baixar custos ou atribuir propriedades sensoriais diferenciadoras às cervejas. Neste caso, os cereais são designados de adjuntos e necessitam de ser fervidos para a solubilização e gelatinização do amido²⁰.

O grão de cevada (Figura 2) é formado pelo endosperma, o embrião, o escutelo e a parede celular. O endosperma é constituído por dois tecidos: uma parte amilácea e uma camada de aleurona, resultantes da diferenciação que ocorre durante o desenvolvimento do grão³. O endosperma amiláceo permite o armazenamento de nutrientes para o embrião durante a germinação²¹. A parede celular é constituída por β -glucanas (80%) e arabinoxilanas (20%)^{3,9}. A camada de aleurona reveste o endosperma e é composta por células que contêm proteínas (aleurona), lípidos, vitaminas e minerais^{4,21}. Após o início da germinação, as células da camada de aleurona libertam enzimas hidrolíticas que convertem os grânulos de amido e as proteínas de armazenamento em açúcares e aminoácidos, respetivamente, para o embrião em crescimento. O escutelo localiza-se na interface do embrião e do endosperma amiláceo e participa na secreção enzimática e na absorção de produtos de degradação³.

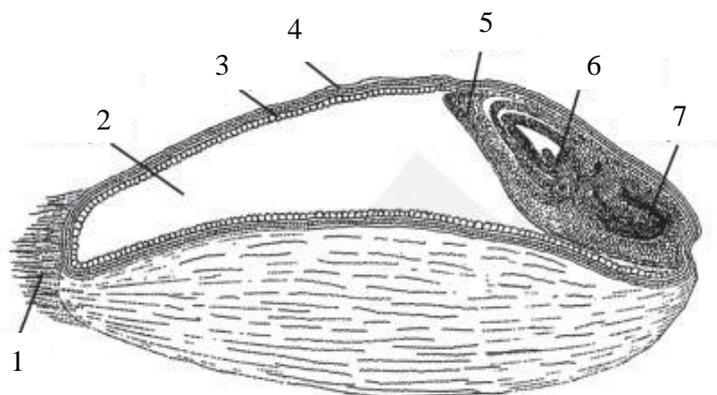


Figura 2. Exemplo de um grão de cevada e seus constituintes: 1 – pelagem rígida; 2 – endosperma; 3 – camada de aleurona; 4 – tegumento; 5 – escutelo; 6 – caulículo; 7 – radícula. Adaptado da referência³.

A composição do grão da cevada, antes da maltagem, encontra-se resumida na Tabela 2. Grande parte da sua constituição corresponde a amido, que se encontra localizado em grânulos presentes nas células endospermicas. Este polímero é composto por amilose e amilopectina²². Além disso, contém uma pequena percentagem de açúcares simples como por exemplo a sacarose, a glucose e a frutose, e de açúcares complexos como a celulose²¹. No entanto, as enzimas presentes no grão não conseguem hidrolisar a celulose por conter ligações glicosídicas β -1,4, não contribuindo para os açúcares que serão fermentados. A hemicelulose é composta por arabinoxilanas e β -glucanas, sendo que estas últimas moléculas podem ter um efeito negativo na cerveja, caso não sejam quebradas⁴, para evitar o risco de formação de precipitados ou mesmo neblina na cerveja embalada^{23,24}. A cevada também apresenta algum conteúdo proteico, que na cerveja final está presente em concentrações muito reduzidas²¹. São essencialmente produtos resultantes da quebra de proteínas como peptonas, pequenos péptidos e aminoácidos. Estas pequenas moléculas são nutrientes para as leveduras e influenciam tanto a turbidez como a manutenção e retenção da espuma na cerveja final⁴. Relativamente ao conteúdo lipídico, este corresponde principalmente a ácidos gordos²¹. As insaturações contidas em algumas moléculas desempenham um papel importante na estrutura da parede celular das leveduras e no envelhecimento dos sabores da cerveja⁴. Além disso, também está presente matéria inorgânica em quantidades residuais, nomeadamente silicatos, sais de potássio e fosfatos, essenciais em várias reações que ocorrem durante a fermentação^{4,21}. São ainda encontradas vitaminas, polifenóis e enzimas, sendo estas últimas libertadas em maiores quantidades durante a maltagem. As enzimas são cruciais para a produção de cerveja, uma vez que clivam o amido e as proteínas, dando origem a compostos mais simples que serão usados pelas leveduras⁴.

Tabela 2. Constituição da cevada antes da maltagem. Adaptado da referência ⁴.

Constituintes	Composição	Porcentagem
Amido	Amilose	65%
	Amilopectina	
Açúcares simples	Sacarose	2%
	Glucose	
	Frutose	
Celulose	Glucose	5%
Hemicelulose	Arabinosilanas	7%
	β -glucanas	
Proteínas	Peptonas	11%
	Pequenos péptidos	
	Aminoácidos	
Lípidos	Ácidos gordos	2%
Matéria inorgânica	Silicatos	2%
	Sais de potássio	
	Fosfatos	
	Vitaminas	
	Polifenóis	6%
	Enzimas	

I.2.1.3. Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta trepadeira dióica cujas flores das plantas femininas desenvolvem cones com um elevado teor de resinas amargas. Existem inúmeras variedades desta planta e a composição das suas flores varia conforme o tipo de lúpulo, o armazenamento, a altura da colheita e a secagem das culturas ³. A maioria dos cervejeiros usa lúpulo em *pellets*, por serem mais facilmente manuseáveis, terem tempos de conservação maiores e apresentarem uma melhor taxa de recuperação do amargor. Os *pellets* podem ser fracionados em extratos de resina e de aroma, permitindo uma flexibilidade na introdução de amargor separado do aroma ⁹. Um método possível para a extração de compostos do lúpulo é recorrendo a uma extração a alta pressão ou uma extração com fluidos supercríticos, sendo que o mais usado é CO₂ ²⁵. Os extratos contêm praticamente todos os óleos essenciais do lúpulo, além de uma proporção suficientemente elevada de α -ácidos (humulonas) e lupulinas pouco amargas, que são os cones das plantas de lúpulo ²⁶, além de outros componentes como resinas e vestígios de triglicéridos, ceras, clorofilas e sais inorgânicos ²⁵.

O lúpulo é uma das matérias-primas que contribui com notas de aroma à cerveja, tendo um forte impacto na sua qualidade ⁹. Existem várias razões para a adição desta planta à cerveja, de entre as quais: 1) conferir aroma e amargor distintos; 2) precipitar certos componentes nitrogenados do mosto; 3) auxiliar na clarificação do mosto; 4) conferir propriedades antibacterianas à cerveja e 5) estabilizar a espuma da cerveja ²⁶. Os cones de lúpulo contêm vários componentes como resinas, óleos essenciais, proteínas, polifenóis, lípidos, ceras, celulose e aminoácidos ²⁶. Por sua vez, as pétalas possuem substâncias como proteínas, hidratos de carbono e polifenóis ³. O contributo que o lúpulo confere à fermentação é particularmente atribuído aos precursores dos compostos ativos de sabor e amargor encontrados nas resinas, secretadas pelas glândulas de lupulina. Os óleos essenciais do lúpulo são igualmente importantes, pois fornecem características de sabor e aroma à cerveja ²⁶.

Existem alguns tipos de lúpulo que apresentam um maior teor em ácidos e resinas amargas, devendo ser adicionados no início do aquecimento para a extração do amargor ^{3,5}. Por outro lado, existem outros que concedem aromas florais e frutados, contendo um menor teor de resinas amargas e maior teor de compostos voláteis, como o monoterpeno linalol. Estes tipos de lúpulo, pelo contrário, devem ser introduzidos no mosto perto do término da fervura ou já no fermentador ³⁻⁵. A contribuição do monoterpeno linalol no conjunto de aromas que o lúpulo proporciona na cerveja é mais perceptível quando se adiciona o lúpulo numa fase mais tardia da fervura do mosto, e é usualmente responsável pelo carácter floral da bebida ²⁶. Muitos fabricantes de cerveja tentam manter alguma da constituição original acrescentando determinadas variedades de lúpulos aromáticos, perto do final da fervura. Este processo, conhecido por *late hopping*, pode ser combinado com o *dry hopping*, isto é, a adição de lúpulo à cerveja imediatamente antes do empacotamento, conferindo-lhe um carácter mais intenso de lúpulo ¹⁵.

I.2.1.4. Leveduras

As leveduras são microrganismos do Domínio *Eukarya*, Reino *Fungi*, unicelulares e anaeróbios facultativos, podendo alternar entre a respiração aeróbia ou fermentação anaeróbia, mediante a presença ou ausência de oxigénio, respetivamente ⁴. No caso da respiração aeróbia, a glucose é convertida em piruvato, dando origem à acetil-CoA, que é um composto intermediário. Na presença de oxigénio, é metabolizado pelo ciclo de Krebs, resultando CO₂. Do transporte de eletrões na cadeia respiratória tendo o oxigénio

como aceitador terminal, resulta ATP produzido por fosforilação oxidativa e água. Na ausência de oxigênio no meio, o piruvato é metabolizado por fermentação alcoólica (Figura 3). Este sofre descarboxilação para formar CO₂ e acetaldeído, que depois é reduzido a etanol^{19,27,28}.

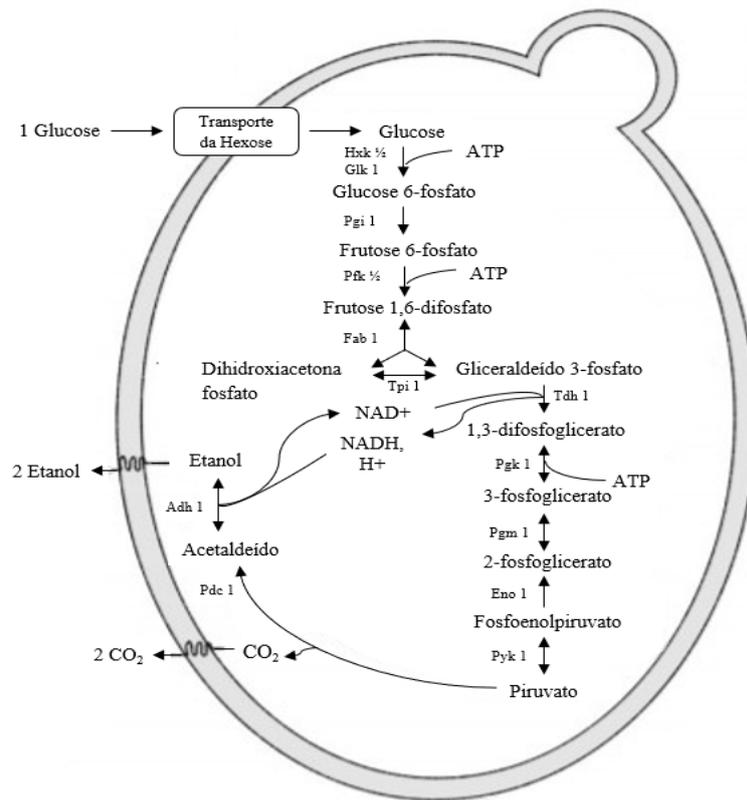


Figura 3. Esquema da glicólise e fermentação alcoólica realizada pela *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado da referência²⁷.

A seleção adequada das espécies de levedura é fundamental não só para maximizar o teor alcoólico, mas também para a qualidade sensorial da bebida²⁸. Para fermentações de cerveja em grande escala, normalmente usam-se culturas puras de espécies selecionadas de *Saccharomyces*, originadas internamente ou fornecidas por empresas produtoras de leveduras. Em processos de escala artesanal, além da utilização de culturas puras de *S. cerevisiae*, pode ocorrer fermentação espontânea dependente da microflora indígena (leveduras e bactérias selvagens) presentes na matéria-prima e nas instalações de produção²⁸.

As estirpes de levedura estão relacionadas com os tipos de cerveja, nomeadamente: *ale*, *lager* e *lambic*. Os tipos *ale* e *lager* são os mais comercializados, variando quanto à espécie de levedura utilizada. A cerveja *ale* é característica da fermentação realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e ocorre a temperatura

mais elevada²⁹. As leveduras neste tipo de cerveja tendem a acumular-se no topo da cuba, sendo designadas como leveduras de fermentação alta⁴. Isto facilita a sua recolha por deslizamento à superfície e o reaproveitamento para a fermentação seguinte²⁹. A fermentação da cerveja *lager* é normalmente realizada pela levedura *Saccharomyces pastorianus*, que resulta de um híbrido entre as espécies *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*³⁰. As leveduras *lager* são organismos mais complexos que as leveduras *ale*, por resultarem da hibridação genética entre duas espécies^{28,29,31}. Posto isto, não existem espécies de *S. pastorianus* livres na Natureza e, uma vez que fermentam na parte inferior da cuba, geralmente apresentam uma maior tendência para floculação^{28,29}. No caso das *lager*, o processo fermentativo ocorre a temperatura mais baixa. São denominadas por leveduras de fermentação baixa por se posicionarem na parte inferior da cuba^{28,29}. As leveduras com maior tendência para floculação produzem uma cerveja mais clarificada, enquanto as leveduras que fermentam no topo da cuba (*ale*) produzem uma cerveja com maior grau de turbidez⁴. A floculação descreve a capacidade de agregação e sedimentação das espécies de levedura, tornando-se fundamental a escolha adequada das leveduras para a fermentação da cerveja pretendida³². As cervejas *lambic* diferem das demais, uma vez que o processo fermentativo ocorre de forma espontânea, envolvendo várias estirpes de levedura e culturas não puras inoculadas. Posteriormente, estas cervejas são transferidas das cubas de fermentação para barricas³³. Como a cada estirpe envolvida na fermentação corresponde um sabor característico, o produto final apresenta uma maior panóplia de sabores³³.

De um modo geral, a fermentação de hidratos de carbono deve ser rápida e imediata. Para tal, a levedura deve ter propriedades adequadas de floculação e sedimentação, estabilidade genética, osmotolerância, tolerância ao etanol, e deve ser capaz de produzir ésteres e álcoois, de modo a atribuir aromas interessantes. Além disso, é necessária uma alta viabilidade celular para reutilização, bem como tolerância à variação de temperatura³⁴. Relativamente aos requisitos para fermentações alcoólicas, o crescimento das leveduras é favorecido em meios ácidos e a temperaturas moderadas. A maioria das estirpes de *S. cerevisiae* cresce melhor a temperaturas entre os 20 °C e os 30 °C e a pH entre 4,5 e 6,5²⁸. No caso da espécie *S. pastorianus*, as estirpes adaptam-se melhor a temperaturas inferiores (8-15 °C)³². Esta espécie não consegue crescer em anaerobiose estrita, uma vez que o oxigénio é necessário para a biossíntese dos ácidos gordos da membrana²⁸. A composição nutricional do meio de fermentação é determinante para o crescimento e metabolismo da levedura. Os macronutrientes representam fontes

de carbono, azoto, oxigénio, enxofre, fósforo, potássio e magnésio. Os micronutrientes são apenas necessários em concentrações residuais e correspondem a alguns metais como o cálcio, cobre, ferro e zinco ²⁸.

I.2.2. Processo de produção

O processo de produção de uma cerveja segue o esquema geral representado na Figura 4. No entanto, pode variar nas técnicas utilizadas e na execução ou não de algumas etapas. Algumas cervejarias optam por não pasteurizar ou filtrar a cerveja após a fermentação, garantindo que esta permaneça com leveduras e com compostos que seriam removidos nessas etapas.

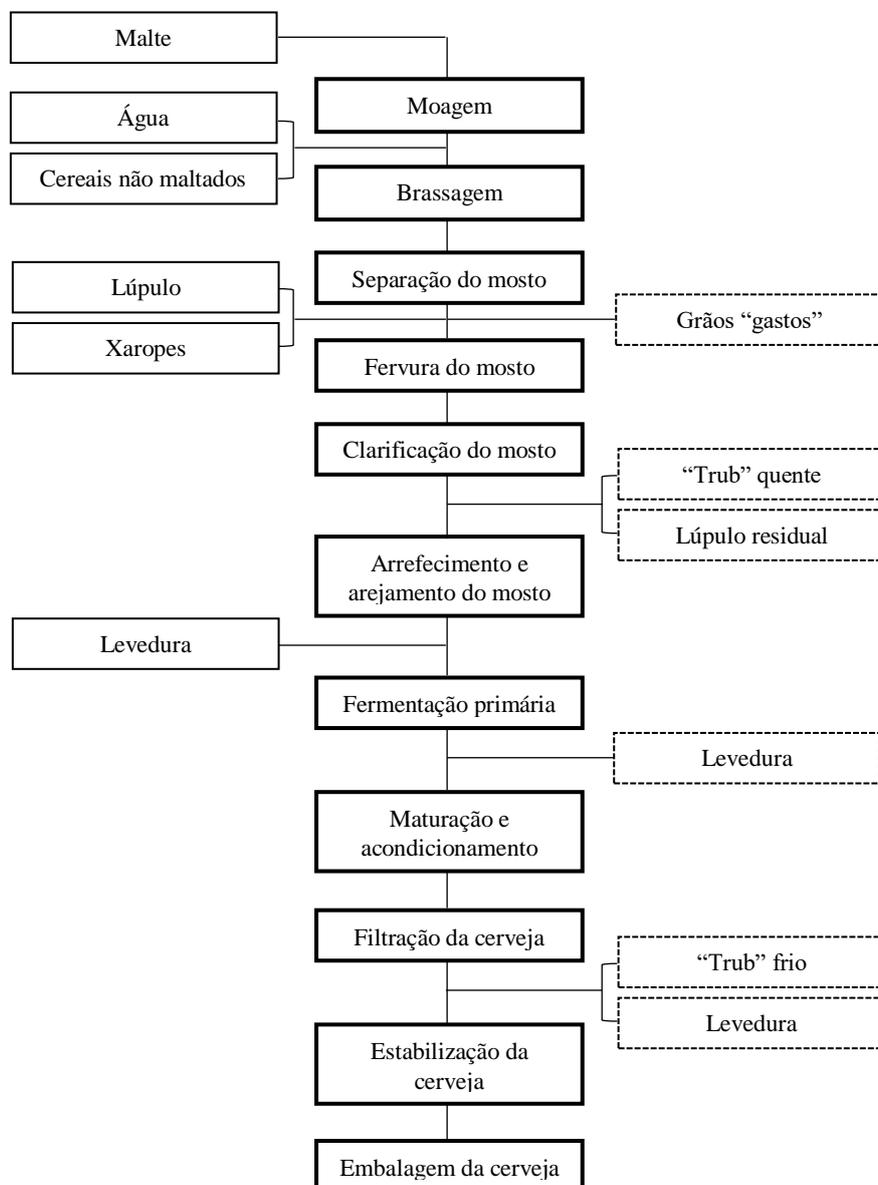


Figura 4. Esquema das operações unitárias realizadas durante a produção de cerveja numa indústria. Adaptado da referência ⁵.

I.2.2.1. Maltagem e moagem

A primeira fase da produção de cerveja é a maltagem, que consiste em três passos essenciais: maceração, germinação e dessecação ⁹. O processo de maltagem, nomeadamente o passo da germinação, tem sofrido progressos, otimizando o conteúdo em amido, o potencial enzimático dos grãos e as suas potencialidades tecnológicas ³. Em primeiro lugar, os grãos são embebidos em água de modo a aumentar o teor de humidade e induzir a síntese de enzimas hidrolíticas ²¹. A germinação tem alguns objetivos, especificamente relacionados com os passos seguintes do processo, de entre os quais: 1) quebrar a parede celular do grão e hidrolisar proteínas da matriz; 2) produzir a quantidade ideal de enzimas hidrolíticas; 3) produzir malte verde modificado. De seguida, o produto obtido (malte verde) é colocado no forno para secagem, onde circulam grandes quantidades de ar quente ³. Nos fornos atuais comuns existem várias secções e sistemas de recuperação de calor. Os objetivos da secagem são: 1) finalizar o processo de modificação dos grãos e o crescimento da planta; 2) reduzir a humidade para níveis adequados ao armazenamento de grãos; 3) preservar as enzimas desenvolvidas durante a maltagem; 4) desenvolver características de cor e aroma do malte, consoante pretendido pelo fabricante de cerveja ³. A humidade excessiva do malte pode dar origem à formação de sulfureto de dimetilo (DMS) a partir do seu precursor, a S-metilmetionina, durante a maltagem, que confere um sabor desagradável quando presente em altas concentrações no produto final ^{5,35}, idêntico ao marmelo ³⁶. No entanto, quando presente em baixas concentrações, é uma característica desejável das *lagers* ²⁸. A formação de DMS acontece durante cada etapa do tratamento térmico, no decorrer da preparação do malte e do mosto, a cerca de 70 °C ³. É um composto bastante volátil, sendo facilmente removido com o vapor libertado durante a ebulição ⁵. A temperatura e o período de ebulição permitem um controlo eficaz da quantidade de S-metilmetionina, degradando-se a temperaturas elevadas aplicadas durante longos períodos ³.

O malte deve ser armazenado algumas semanas antes do seu uso ⁹, a temperaturas relativamente baixas e em ambiente seco ³. Os passos que se seguem, nomeadamente a fermentação e a filtração, bem como as propriedades intrínsecas da cerveja (sabor, cor), são influenciados pela qualidade do malte. O pH do malte varia entre 5,80 e 5,95 no caso do malte de cevada pálido. O malte escuro exhibe valores mais baixos, entre 5,5 e 5,8, devido a uma maior abundância de produtos resultantes das reações de Maillard ³.

De seguida, os grãos de malte sofrem fragmentação mecânica ³. Este processo denomina-se por moagem, e visa reduzir o tamanho das partículas do malte e aumentar a exposição do endosperma à ação enzimática, para que seja alcançado o maior rendimento de conversão do amido no menor tempo possível ³⁷. As cascas dos grãos devem permanecer mesmo depois de estes serem moídos, funcionando como um bom filtro na etapa de filtração ⁴. Assim, obtém-se um bolo de filtro permeável. A moagem pode ser feita a seco, moagem húmida ou com condicionamento, sendo a primeira a mais comum ³. Existe uma imensa variedade de moinhos a seco que incorporam dois a seis rolos. Na maioria das cervejarias de grande dimensão, são usados moinhos que incorporam seis rolos, para otimizar a distribuição do tamanho das partículas ³⁷. O seu tamanho é essencial ao desempenho do sistema de separação do mosto e do tanque de filtração ³⁷. O uso de grãos húmidos antes da moagem confere-lhes elasticidade e maior resistência à degradação ⁵.

I.2.2.2. Brassagem, filtração, fervura e arrefecimento do mosto

Após a moagem, segue-se a brassagem, cujo principal objetivo é produzir um líquido turvo ligeiramente doce, designado por mosto, que apresente as características pretendidas na cerveja final ^{5,35}. O mosto é composto por hidratos de carbono (90%), fontes de azoto (5%) e pequenas quantidades de iões inorgânicos (cálcio, zinco, cobre), muitas vezes requeridos como cofatores para enzimas, lípidos e polifenóis ²⁷. Os hidratos de carbono predominantes são a sacarose (5%), os monossacarídeos (10%), a maltotriose (15%) e a maltose (50%). Estas proporções são fortemente dependentes da qualidade do cereal e do processo usado para a sua maltagem. Cerca de 20 a 30% do total de hidratos de carbono presentes no mosto são dextrinas não fermentáveis, que são polissacarídeos decorrentes da degradação do amido ²⁷. Além disso, durante a brassagem ocorre fosforólise, isto é, o fosfato orgânico presente no malte é convertido em fosfatos primários por ação de fosfatases ³. Alguns cereais, como a aveia, apresentam um conteúdo proteico mais elevado. Algumas vezes são adicionados durante a brassagem para aumentar o teor proteico do mosto e, conseqüentemente, a quantidade de espuma na cerveja final, sendo designados por adjuntos ⁴.

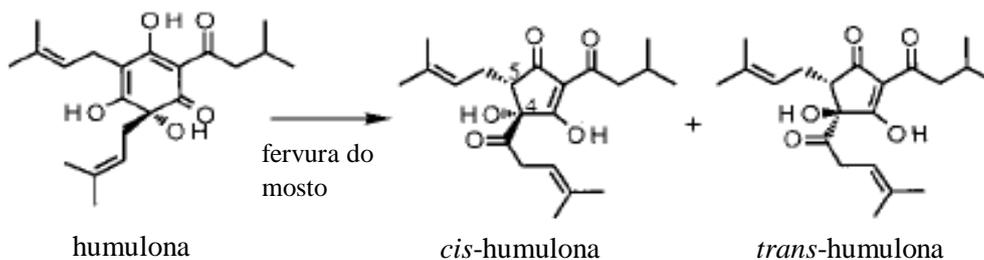
Na fase inicial da brassagem, os grãos moídos são introduzidos em água, fazendo com que as enzimas contidas no malte sejam ativadas, como as enzimas hidrolíticas do amido ⁵. Ao absorverem água, os grãos de amido aumentam de volume e perdem a sua

estrutura cristalina, promovendo a gelatinização ³. As principais enzimas envolvidas na degradação do amido são a α -amilase e a β -amilase. Ambas clivam as ligações α -(1,4)-D-glicosídicas do amido ^{3,22}. A α -amilase cliva as ligações entre os monómeros de glucose aleatoriamente, ao longo das cadeias de amido ³⁵. É a enzima mais abundante e é altamente termotolerante, permitindo não só a hidrólise do amido, mas também da quantidade substancial de adjuvante ²². A β -amilase cliva a maltose a partir da extremidade não redutora da molécula e é responsável pelo grau de atenuação do mosto ³, que corresponde ao extrato fermentável, isto é, à concentração de açúcares consumida durante a fermentação. O mosto encontra-se totalmente atenuado quando não existe qualquer quantidade de extrato fermentável residual ³⁸. Esta é uma enzima limitante, na medida em que apresenta uma atividade mais baixa em comparação com a α -amilase e uma certa instabilidade a eventuais variações de temperatura ²². As duas enzimas não são independentes uma da outra, uma vez que a α -amilase disponibiliza mais extremidades não redutoras para a β -amilase atuar, para uma maior degradação ³⁵. Após a gelatinização, ocorre a completa degradação do amido em maltose e dextrinas, num processo designado por sacarificação. A hidrólise do amido durante a brassagem deve ser monitorizada, dado que os resíduos de amido não degradados e as dextrinas resultam em partículas suspensas na cerveja ⁵. Durante a brassagem, também ocorre citólise e proteólise. A citólise consiste na degradação da parede celular, composta por β -glucana e hemicelulose. Realiza-se através da ação de endo- β -glucanases, β -glucano solubilases e endo-xilanases, e inicia-se aquando da maltagem, continuando durante a brassagem ⁵. A proteólise resulta na formação de diversos produtos da degradação de proteínas, desde produtos de maior peso molecular a produtos de menor peso molecular, incluindo aminoácidos. A proteólise é realizada por várias enzimas: endopeptidases, aminopeptidases, carboxipeptidases e dipeptidases ⁵. A hidrólise enzimática pode ser controlada através da temperatura, viscosidade do mosto, pH e duração do processo ³. A brassagem, consequentemente, influencia o teor de álcool, a concentração de açúcares não fermentados na cerveja, o perfil de péptidos e aminoácidos do mosto, o pH do mosto e da cerveja, e algumas propriedades físicas da cerveja, como a espuma, cor e clarificação ⁵.

A brassagem é feita em tanques de aço inoxidável, cujo conteúdo é aquecido a vapor e agitado para assegurar que haja uma mistura homogénea. Pode ser classificada em dois tipos: infusão e decocção ⁵. No caso da infusão, o aquecimento do mosto é feito por patamares, para promover diferentes reações de hidrólise, até à temperatura final de brassagem ⁵. As vantagens deste método são a sua fácil monitorização e o menor consumo

de energia, relativamente ao método de decocção⁵. Nos processos de decocção, transfere-se parte da mistura para outro recipiente, onde vai ser aquecida. Posteriormente, esse volume da mistura é transferido de volta para a panela de brassagem, aquecendo o restante volume até à temperatura pretendida⁵. Perante este fenómeno, a hidrólise do amido e das proteínas é mais facilmente alcançada. Além disso, permitem às cervejarias conseguirem atingir vários valores de temperatura adequados para os ingredientes utilizados ou para os estilos de cerveja³⁵.

Posteriormente, ocorre a filtração, que corresponde a uma separação sólido-líquido dos compostos de malte dissolvidos das partes insolúveis como a casca, através da lavagem com água a elevadas temperaturas^{3,5}. Deste processo, obtém-se o mosto clarificado e uma porção insolúvel composta por grãos e resíduos, designada por “dreche”, que consiste num subproduto importante da produção de cerveja, aproveitável na indústria alimentar ou na produção de bioetanol^{5,39}. Uma das aplicações mais comuns da “dreche” é ser frequentemente vendida como ração animal. Além disso, apresentam fibras e proteínas na sua constituição, podendo melhorar o valor nutricional dos produtos alimentares⁴⁰. A filtração pode ser realizada de diferentes formas, por transferência da mistura final para uma prensa de filtro vertical ou para uma panela que possua o fundo adaptado à separação do mosto dos grãos^{3,5}. Segue-se a fervura do mosto, que é um processo complexo e exigente a nível termodinâmico por desencadear uma série de reações químicas, físicas, físico-químicas e bioquímicas^{5,9}. A fervura é usualmente realizada em duas etapas: retenção a quente e evaporação. Durante a retenção a quente, ocorrem inúmeras reações químicas como a isomerização dos componentes do lúpulo, inativação de enzimas e a precipitação de complexos proteicos com polifenóis^{3,29}. Este fenómeno resulta numa diminuição considerável da microflora que provoca a deterioração da cerveja, como *Lactobacillus* e no aumento da concentração de ácidos provenientes do lúpulo, levando a uma redução do pH³⁵. Além disso, ocorrem reações de Maillard, gerando compostos aromáticos voláteis, não voláteis e melanoidinas, que têm um impacto significativo na cor, no aroma, na acidez e no sabor da cerveja^{3,5}. As melanoidinas possuem propriedades antioxidantes. A concentração de produtos intermediários, nomeadamente 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) e o furfural, influencia a cor do mosto que é monitorizada como descritora do progresso das reações de Maillard⁵.



Equação 1. Conversão dos α -ácidos (humulonas) em iso- α -ácidos (isohumulonas), durante a fervura do mosto. Adaptado da referência ¹⁵.

A isomerização dos componentes dos α -ácidos (humulonas) em iso- α -ácidos (isohumulonas) do lúpulo (Equação 1) permite a extração do amargor, sendo necessária uma elevada temperatura para se obter um bom rendimento ^{5,9,41}. Os iso- α -ácidos constituem a fração quantitativa mais significativa no lúpulo e são responsáveis pelo amargor característico da cerveja ¹⁵.

Os α -ácidos presentes no lúpulo inibem o crescimento de microrganismos que causem deterioração da cerveja, principalmente bactérias de Gram positivo. A inibição deve-se à presença do grupo prenil, localizado nas cadeias laterais destas moléculas. Estas propriedades são importantes para promover a estabilidade da cerveja, uma vez que inativam os microrganismos durante a fervura do mosto ¹⁵. As propriedades antibacterianas dos α -ácidos estão relacionadas com a sua capacidade de afetar a permeabilidade da parede celular bacteriana, resultando na inibição do transporte ativo de açúcares e aminoácidos ²⁶.

A etapa de evaporação serve para remover compostos indesejáveis como o mirceno, proveniente do lúpulo, substâncias aromáticas e outras, como o DMS ^{3,4}. A intensidade e duração da fervura determinam a evaporação e degradação do DMS livre e do seu precursor, respetivamente. Dada a elevada volatilidade do DMS, este pode ser facilmente eliminado a elevadas temperaturas com o vapor de água ⁵. Durante esta etapa, sucede em simultâneo a desnaturação de proteínas e a sua posterior coagulação ³⁵. Este processo está dependente de vários fatores como temperatura e tempo de ebulição, homogeneidade da mistura e pH do mosto ³. O complexo insolúvel (*trub*) gerado na fervura é retirado usando um remoinho (*whirlpool*), antes do arrefecimento do mosto num permutador de calor ^{9,35}.

I.2.2.3. Fermentação e maturação

Durante a fermentação, o mosto é transformado em cerveja, através da atividade metabólica das leveduras, convertendo os açúcares em etanol e dióxido de carbono. Ademais, formam-se outros subprodutos que influenciam o perfil do aroma e o sabor da cerveja resultante ³. Nas cervejarias de maior dimensão e nas microcervejarias, a fermentação é iniciada quando se adiciona o inóculo de leveduras ao mosto ³, sendo este transferido para um fermentador ⁵, ou para uma cuba de fermentação. No tipo *lambic*, a fermentação ocorre espontaneamente, a partir de espécies autóctones ³³. No entanto, em algumas cervejas deste tipo são utilizadas culturas puras iniciais de *Brettanomyces* spp. (teleomorfo *Dekkera*) ²⁸.

O mosto contém açúcares fermentáveis, derivados da hidrólise das reservas de amido dos grãos de malte ³⁸. A maltose é o componente maioritário, todavia existem outros como é o caso da glucose, sacarose e maltotriose ^{5,27}. Para o crescimento das leveduras, o inóculo necessita sobretudo de fontes de azoto, sobretudo aminoácidos e iões de amónia, usados para a síntese proteica pela célula ^{3,27}. Os aminoácidos são igualmente relevantes para a produção de álcoois e ésteres, tendo influência no aroma final ²⁷. Durante o desenvolvimento das leveduras, ocorre também biossíntese de lípidos, permitindo a absorção de nutrientes. A biossíntese de lípidos usa a acetil-coenzima A como precursor. O crescimento da levedura também requer minerais para a estabilização dos seus complexos enzimáticos, absorção de nutrientes e manutenção da integridade da célula. As células de levedura devem entrar rapidamente em contacto com os nutrientes do mosto, sendo injetadas de forma contínua no fluxo do mosto frio. Quanto maior a concentração de células, maior a turbidez ³.

No início do processo, introduz-se oxigénio no fermentador para permitir que a levedura cresça e que se atinja o perfil de fermentação desejado ⁹. Numa primeira fase, há a degradação oxidativa dos hidratos de carbono através da glicólise e do ciclo de Krebs, sendo conservada energia sob a forma de ATP. Durante a fermentação, a atividade do ciclo de Krebs é reduzida, apesar de servir como uma fonte de intermediários para a biossíntese ⁵. O balanço de energia resultante do processo fermentativo é de 2 mol de ATP por mol de glucose ³. No entanto, a presença de oxigénio excessivo leva ao crescimento exacerbado das leveduras e a uma alteração no rendimento obtido. Em paralelo, formam-se subprodutos da fermentação em concentrações mais baixas, especialmente ésteres, que causam mudanças no sabor e aroma do produto ⁹. Em

condições aeróbias e de elevada concentração de glucose, a levedura opta por realizar fermentação alcoólica em vez de respiração. A este fenómeno dá-se o nome de efeito *Crabtree*. Estas concentrações de glucose são sempre encontradas em condições de fermentação, particularmente de mosto. Assim, o efeito *Crabtree* ocorre aquando da propagação e do início da fermentação, e é totalmente independente do arejamento ³.

A levedura é capaz de flocular, isto é, formar aglomerados de células e sedimentar na base do fermentador, podendo afetar positiva ou negativamente o processo. Se o agregado de células sedimenta muito cedo, isto é, se a floculação for rápida, deixa de haver células suficientes para a redução do diacetilo ³, um composto conhecido pelo seu aroma a manteiga ⁴². Se a sedimentação for fraca e lenta, muitas células de levedura permanecem em suspensão, podendo-se formar uma neblina no sobrenadante, que causa problemas na filtração posterior ³. As leveduras devem apenas flocular quando a fermentação estiver concluída, uma vez que isso facilita os processos de filtração e de clarificação ⁹.

Para se obter um bom rendimento no processo fermentativo, deve-se proceder à monitorização de todas as variáveis, durante o processo e no seu término, de modo a garantir a estabilidade e a consistência quer do processo, quer do produto final ³⁷. O controlo da fermentação e da maturação implica a medição das suas variáveis inerentes como a temperatura, o pH, o número de células durante a fermentação, a turbidez e o conteúdo em CO₂ ³. A compreensão do processo fermentativo, bem como das variáveis intrínsecas como a composição do mosto, a fisiologia da levedura, o design do fermentador e a qualidade da cerveja, têm registado progressos muito significativos com impacto no grau de controlo do processo e na qualidade e estabilidade das cervejas ³⁷.

Durante a fermentação secundária ou a maturação da cerveja, vários objetivos devem ser alcançados, nomeadamente: 1) sedimentação das células de levedura; 2) melhoria da estabilidade coloidal através da sedimentação dos complexos tanino-proteína; 3) remoção de compostos aromáticos indesejáveis; 4) melhoria da estabilidade da espuma da cerveja; 5) ajuste da cor da cerveja adicionando corantes, se necessário; 6) ajuste do amargor da cerveja adicionando produtos de lúpulo, se necessário ⁵.

I.2.2.3.1. Subprodutos da fermentação

Os subprodutos da fermentação são formados nas vias metabólicas colaterais da levedura e podem ser divididos em vários grupos: álcoois superiores, ésteres, compostos de carbonilo, compostos voláteis de enxofre (VSCs), ácidos, entre outros (Figura 5) ^{3,29,43}.

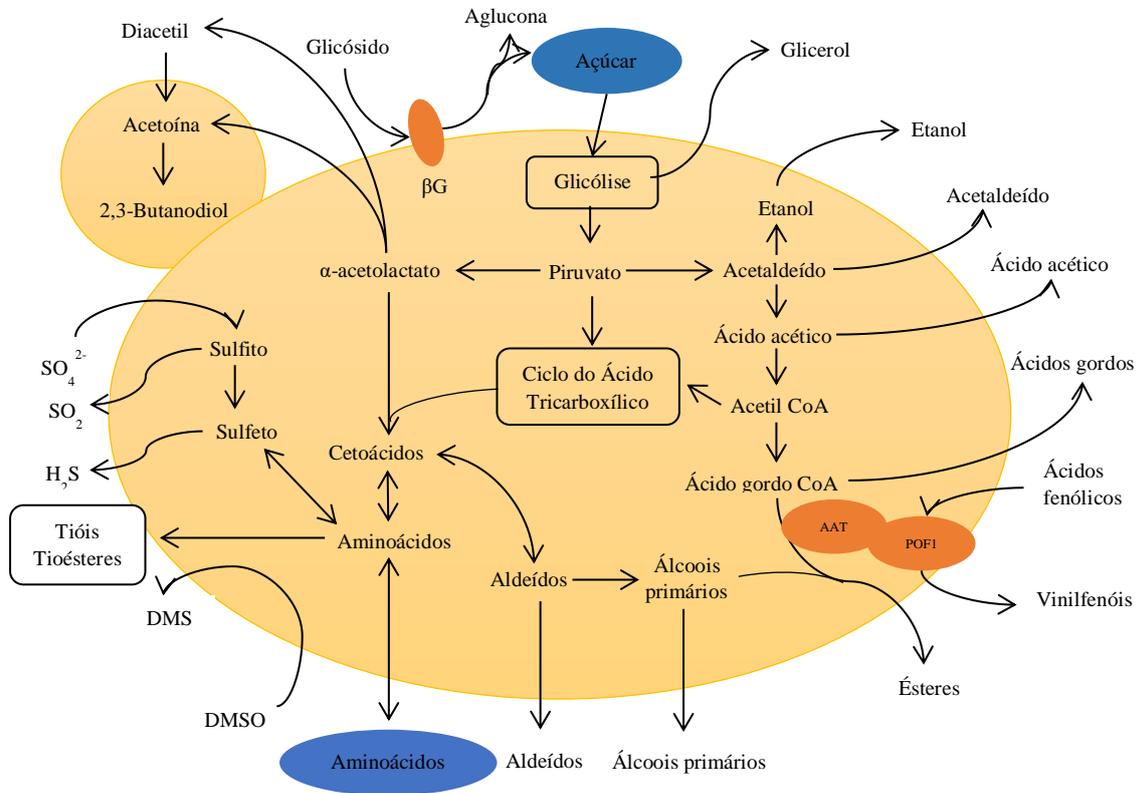


Figura 5. Representação das atividades metabólicas da *Saccharomyces*, que resultam na produção de inúmeros compostos interferentes na qualidade da cerveja. Adaptado da referência ²⁹.

Os álcoois superiores correspondem à maior fração destes compostos voláteis, e podem ser alifáticos ou aromáticos. Os álcoois alifáticos contribuem para um aroma mais alcoólico. Alguns álcoois aromáticos conferem um sabor doce à cerveja, mas existem outros menos agradáveis. Os álcoois superiores podem ser sintetizados pela via anabólica ou catabólica ⁵. Em ambas as vias, são formados α -cetoácidos. Na via anabólica, formam-se através da biossíntese de aminoácidos originados a partir de hidratos de carbono. Na via catabólica, são produzidos pela quebra de aminoácidos, catalisada pela aminotransferase. Os α -cetoácidos resultantes são descarboxilados em aldeídos, e subsequentemente desidrogenados para originar o álcool primário correspondente ^{43,44}. Os ésteres são sintetizados a partir da reação enzimática entre álcoois superiores e ácidos orgânicos, sendo que a sua produção está relacionada com uma maior produção de precursores de álcool, com o crescimento das leveduras e com o metabolismo dos lípidos

^{3,44}. Os ésteres influenciam as propriedades organolépticas da cerveja, concedendo sabores frutados ⁴⁴, mas quando presentes em excesso, podem dar origem a *off-flavours* indesejáveis ⁴³.

Os compostos de carbonilo incluem aldeídos e cetonas. As cetonas mais comuns na cerveja são as chamadas dicetonas vicinais, que contêm dois grupos carbonilo adjacentes ^{3,5}. Duas das cetonas mais relevantes no paladar do produto final são o diacetilo (2,3-butanodiona) e a 2,3-pentanodiona, produtos secundários das vias de biossíntese da valina e da isoleucina, respectivamente ^{37,43}. São produzidos através da degradação do acetolactato e do acetohidroxitirato, intermediários de vias metabólicas da síntese de aminoácidos exportados para o mosto ²⁹. A 2,3-butanodiona e a 2,3-pentanodiona atribuem notas de manteiga e de caramelo, respectivamente, que são indesejáveis a inúmeros tipos de cerveja. A presença destas cetonas acima do limite de percepção sensorial na cerveja torna-as desagradáveis em muitos estilos de cerveja, podendo indicar contaminação microbiana, especialmente de espécies de *Lactobacillus* e *Pediococcus* ⁴². Na fase de maturação, a levedura reduz enzimaticamente estes compostos a 2,3-butanodiol e 2,3-pentanodiol, que têm limites de aroma mais elevados e não têm um impacto muito significativo no sabor da cerveja ^{5,29,42}, conferindo sabores ligeiramente mais doces ³⁶. Uma alternativa é a adição de uma enzima bacteriana durante a fermentação, a acetolactato descarboxilase. O produto resultante, que no caso do acetolactato é a acetoína, tem um sabor menos intenso que o diacetilo ⁹. Além disso, fazendo uma cromatografia gasosa ou líquida, é possível determinar a concentração de diacetilo presente, facilitando depois a sua remoção ⁴².

Os compostos voláteis de enxofre (VSCs), como o sulfeto de hidrogénio e o DMS, não são desejáveis na cerveja devido ao seu forte odor a vegetais, se estiverem presentes acima do limite de percepção sensorial. A sua ocorrência na cerveja não depende diretamente da fermentação, mas da concentração presente no mosto ³. Os ácidos detetados na cerveja são orgânicos, como o ácido acético, láctico, málico e outros, ou inorgânicos como o ácido fosfórico. Estes compostos aumentam a acidez da bebida ^{5,43}. Alguns ácidos são originados do mosto, enquanto outros resultam do metabolismo e da autólise das leveduras que também produz, por oxidação, ácidos gordos de cadeia longa, nomeadamente insaturados, devido à quebra dos lípidos da membrana, representando um efeito adverso para a qualidade do produto final ⁴³.

I.2.2.3.2. Contaminações microbianas

O processo de conversão dos açúcares existentes no mosto e os seus parâmetros específicos associados, como o baixo pH e o efeito de outras matérias-primas adicionadas, constituem uma barreira para uma eventual contaminação pela maioria dos microrganismos ²⁹. No entanto, no início da fermentação, o mosto é suscetível a contaminações, sendo importante compreender e monitorizar o microbioma presente durante a fermentação e, conseqüentemente, a qualidade da cerveja ^{29,45}.

De um modo geral, as leveduras de cerveja contribuem positivamente para o seu sabor e textura, produzindo bolhas de gás e espuma. O seu impacto na bebida varia com as espécies envolvidas no processo fermentativo ⁴³. O gliceraldeído-3-fosfato, um produto resultante da via glicolítica, pode ser encontrado em diferentes estilos de cerveja. Caso esteja presente em níveis excessivos, aumenta a viscosidade da mesma. As leveduras podem sofrer autólise durante a fermentação, libertando algumas substâncias como aminoácidos (por exemplo, ácido glutâmico) e nucleótidos (por exemplo, monofosfato de guanosina), que influenciam o sabor da cerveja direta ou indiretamente, atribuindo-lhe um caráter envelhecido ⁴³. As bactérias afetam sobretudo a aparência e o sabor, causando turbidez, acidificação, formação de aromas indesejáveis como notas de manteiga, de vinagre, entre outros, e aparecimento de sedimentos ⁴³.

I.2.2.4. Filtração e carbonatação

A filtração é uma operação crítica, visto que antes dessa fase, a cerveja apresenta uma concentração significativa de partículas em suspensão. Muitas vezes, estas partículas constituem uma fração significativa do volume, sendo constituídas por células, muitas das quais se encontram naturalmente agregadas por floculação ⁴⁶. De um modo geral, a filtração pretende remover materiais suspensos da cerveja e evitar o desenvolvimento de potenciais formadores de turbidez, preservando a cerveja de mudanças visíveis indesejáveis até ao seu empacotamento ³. A maior parte das cervejas passa diretamente da fase de fermentação para o armazenamento a frio, a pelo menos -1 °C, com o objetivo de acelerar a precipitação e a sedimentação dos complexos proteicos e de reduzir a turbidez ⁹. Além das proteínas, os taninos têm também um efeito considerável na turbidez da bebida, podendo ambos ser removidos por adsorção ou ação enzimática, em alternativa à tradicional sedimentação.

Os processos de filtração podem ser realizados à superfície ou em profundidade, dependendo do local da separação do sólido ³. Na filtração à superfície, normalmente recorre-se a uma membrana porosa, em que as partículas a ser separadas com diâmetro superior ao do poro permanecem retidas na superfície da membrana. Na filtração em profundidade, o processo de separação do sólido acontece numa camada porosa situada em profundidade, ficando as partículas retidas no interior da camada, isto é, no interior do material do filtro ^{3,46}. Atualmente, o sistema mais eficaz do ponto de vista energético baseia-se na utilização de filtros de terra de diatomáceas, sendo, no entanto, possível usar outros sistemas, como filtros de cartucho ⁹. A sequência de operações deve ser projetada de forma a maximizar o rendimento do processo, o que implica a introdução de tecnologias a montante das etapas de filtração, como a centrifugação, floculação e o tratamento enzimático. Isto resulta numa cerveja de elevada qualidade, contudo acarreta custos adicionais associados ao controlo do crescimento de contaminantes ⁴⁶. O conteúdo em dióxido de carbono é depois ajustado, através de carbonatação natural ou artificial. As cervejas que contêm maior teor de CO₂ são menos suscetíveis a contaminações ⁹.

I.2.2.5. Enchimento e pasteurização

O enchimento representa um desafio em termos de estabilidade microbiológica da cerveja. Durante esta etapa, a cerveja proveniente da cuba entra em contacto com superfícies complexas na máquina de enchimento, que contactam com vestígios de cerveja, e é brevemente exposto ao ar. Adicionalmente, o movimento rotativo, a turbulência do equipamento, a temperatura e a humidade elevadas podem favorecer o desenvolvimento de biofilmes microbianos persistentes ²⁹, nomeadamente nas áreas de enchimento das garrafas e nas cabeças de enchimento ⁴⁷, que afetam a segurança e a qualidade do produto.

O enchimento é normalmente realizado em garrafas de vidro, podendo também ser feito em latas de alumínio, garrafas de plástico produzidas a partir de polímeros de polietileno ou em barris ^{3,48}. Estes últimos representam um risco acrescido por serem consecutivamente reutilizados e estarem, por vezes, submetidos a exposição prolongada ao ar ao circularem entre diferentes locais ou cervejarias ²⁹. Esta fase do procedimento deve ser realizada com as mínimas perdas possíveis e até ao nível desejado, garantindo a preservação da qualidade do produto, evitando a perda de dióxido de carbono, a oxidação e a entrada de microrganismos contaminantes ⁴⁹. A oxidação compromete a qualidade do

sabor e da cor, assim como a estabilidade microbiológica. Deste modo, é conferido um amargor pronunciado e induzida a formação de neblina ³. Uma vez que a cerveja é carbonatada, contém gás e, por isso, o seu enchimento requer um certo nível de pressão para evitar a desgaseificação e a perda de espuma. O nível de pressão necessário está dependente do teor em CO₂ e da temperatura do produto durante o enchimento. Geralmente esta etapa ocorre a temperaturas baixas, permitindo uma melhor solubilidade do CO₂ ^{3,49}.

Após o enchimento, a cerveja pode correr o risco de sofrer deterioração microbiana se o armazenamento for prolongado, mesmo em condições tidas como ótimas. Deste modo, muitas indústrias cervejeiras reforçam a estabilização do produto, através da pasteurização ²⁹, que, em virtude das propriedades da cerveja, como o seu teor alcoólico e o baixo pH, não necessita de temperaturas muito elevadas nem tempos de aquecimento muito longos. Deve ser imposta uma dada temperatura, necessária para destruir os microrganismos e em simultâneo minimizar os efeitos no sabor e aroma da bebida ⁴⁶. Contudo, a pasteurização pode causar danos oxidativos, podendo haver um rápido envelhecimento da bebida no curto período de pasteurização. Para evitar este acontecimento, alguns fabricantes de cerveja têm procurado reduzir o número de unidades de pasteurização (UP), através de temperaturas mais baixas e/ou tempos de pasteurização mais curtos ³⁷. Segundo o *Handbook on Small & Medium Scale Industries (Biotechnology Products)*, o mais indicado para o processo será 6 a 15 minutos a 60 °C, parâmetros adequados a não ser que a cerveja contenha uma elevada contaminação antecedente à pasteurização ⁵⁰.

I.2.2.6. Armazenamento e distribuição

As etapas finais no fluxo da produção de cerveja são a rotulagem, empacotamento e armazenamento. Após o empacotamento, a cerveja pode estar exposta a variações de temperatura e ao ar, principalmente quando armazenada em barris reutilizáveis. Pode haver uma deterioração do seu sabor, da cor e uma permanente formação de turbidez, pela precipitação de proteínas por polifenóis ²⁹. A espuma também pode ser significativamente afetada, se a cerveja se encontrar a temperaturas elevadas e se persistir uma concentração elevada de leveduras ³. A espuma tem um papel fundamental na cerveja engarrafada, dado que diminui a perda de CO₂ e previne a entrada de oxigénio ^{3,19}.

Como resultado da globalização e da expansão do mercado de produção e exportação de cerveja, este produto está cada vez mais sujeito a períodos e distâncias de transporte mais longos e, conseqüentemente, a grandes variações nas condições de armazenamento. Isto traduz-se na ocorrência de reações oxidativas, gerando componentes químicos que alteram as propriedades sensoriais e a estabilidade da bebida ⁴⁸, e provocando o que se designa por envelhecimento da cerveja. Contrariamente ao vinho, este fenómeno resulta em alterações indesejáveis de paladar na cerveja ^{48,51}. Formam-se vários compostos que aceleram a formação de um perfil de sabores envelhecidos, principalmente compostos de carbonilo voláteis. Um deles é o trans-2-nonenal, um composto de carbonilo insaturado responsável pelo desenvolvimento de aromas “a cartão”, resultantes de reações oxidativas, sendo formado independentemente da concentração de oxigénio presente na cerveja engarrafada ^{51,52}. Há também um aumento da formação de aldeídos, diminuição da concentração dos compostos que atribuem amargor (iso- α -ácidos), formação permanente de neblina e variações visíveis na cor. As características do envelhecimento diferem entre os tipos de cerveja, porém normalmente observa-se um incremento nos aromas doces e uma diminuição do paladar amargo ^{48,52}. Os aromas doces que se formam advêm da formação de notas de caramelo e açúcar queimado ⁵².

I.2.3. Cerveja “Sour”

A cerveja “Sour” é ácida e resulta do longo armazenamento de uma cerveja produzida em cuba. Com o passar do tempo, a bebida vai acidificando devido à ação de microrganismos. O desenvolvimento destas cervejas baseia-se no princípio de fabrico das *lambic sour beers*, que é um dos processos mais antigos de produção, cujo país de origem é a Bélgica. A cerveja resulta usualmente de uma fermentação espontânea, o que significa que o processo não é iniciado através da inoculação de leveduras ou bactérias como culturas iniciais ⁵³, mas sim de espécies autóctones ⁵⁴. Para acelerar o processo de acidificação, esta cerveja é posteriormente transferida para barricas de madeira de carvalho, que anteriormente continham outras bebidas ⁵³. O contacto das novas bebidas com as barricas de madeira permite a extração de diversos compostos, tais como fenólicos e taninos, implicados na formação de múltiplos sabores, durante a maturação. As barricas são normalmente reutilizadas em processos espontâneos de fabrico da cerveja *lambic*, explorando em profundidade o microbioma aí presente ⁵⁵. Contudo, estes reservatórios de

madeira são difíceis de higienizar, o que torna favorável o alojamento do microbioma residente, podendo afetar negativamente as propriedades organoléticas das cervejas ^{55,56}.

O crescimento microbiano tem início durante o arrefecimento do mosto, num tanque exposto à atmosfera. Tradicionalmente, a produção de cervejas *lambic* ocorre apenas nos meses mais frios do ano, uma vez que são necessárias noites frias para conseguir que a temperatura do mosto desça rapidamente para cerca de 20 °C ⁵⁷. Após o arrefecimento, o mosto é transferido para barricas armazenadas numa adega ou à temperatura ambiente, tipicamente entre 15 e 25 °C. O mosto fermenta de forma espontânea e a cerveja matura nessas mesmas barricas. O produto final é uma cerveja não carbonatada, de sabor amargo que serve de base para cervejas *lambic* com frutas e outras variantes. O seu caráter ácido resulta da atividade metabólica de várias leveduras, de bactérias do ácido láctico (*lactic acid bacteria*, LAB) e bactérias do ácido acético (*acetic acid bacteria*, AAB) ⁵³. Neste tipo de cerveja, o malte usado é praticamente incolor e muito rico em enzimas. A concentração de lúpulo é baixa e normalmente é adicionado sob a forma de pétalas secas das flores de lúpulo, conhecidas como cones ^{33,58}.

A sucessão de microrganismos durante a fermentação da cerveja *lambic* diferencia-as química e sensorialmente de outras cervejas. Isto torna particularmente interessante o conhecimento das populações microbianas envolvidas nas diferentes etapas, para as indústrias que produzem este tipo de cervejas ⁵⁹. Existem quatro fases associadas ao processo fermentativo da *lambic*, às quais estão associadas diferentes espécies de microrganismos. As fases, designadas por *Enterobacteriaceae*, fermentativa, de acidificação e de maturação, e as correspondentes alterações do microbioma encontram-se representadas na Figura 6. A fase inicial, designada como fase *Enterobacteriaceae* ⁵³, corresponde aproximadamente aos primeiros dois meses, predominando as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, à qual pertence *Escherichia coli*, que vão desaparecendo progressivamente com o avançar da fermentação ⁸. Nesta fase, formam-se quantidades residuais de álcool e o pH baixa cerca de 1 unidade devido à produção de alguns ácidos, em baixas concentrações, como o ácido acético, láctico e fórmico ³. A primeira levedura fermentativa a surgir pertence ao género *Hanseniaspora* (*Kloeckera* é a designação na forma assexuada), normalmente duas semanas após a fervura do mosto. As leveduras do género *Saccharomyces* realizam a fermentação principal nos meses seguintes, correspondentes à fase fermentativa ^{8,53}. A fase de acidificação é caracterizada por um aumento da concentração de ácido láctico, de ácido acético e dos ésteres correspondentes. Ocorre após cerca de 4 meses e corresponde a uma

diminuição acentuada do pH, com consequente inativação das *Saccharomyces* ^{3,53}. Na fase final da fermentação, *Brettanomyces* spp. assume-se como a principal levedura, essencial no desenvolvimento de sabores e aromas característicos, na fase de maturação (Figura 6) ^{8,60}. Embora as cervejas *lambic* tenham um microbioma diverso nos estágios iniciais da fermentação, a diversidade e a quantidade de microrganismos atingem a estabilidade ao fim de cerca de 18 meses, em média ⁵³.

Há um interesse crescente no fabrico destas cervejas, o que implica um conhecimento mais aprofundado sobre a acidificação do mosto. Os fabricantes de cerveja ainda enfrentam muitas decisões em relação à seleção de espécies adequadas, à concentração de mosto, aos parâmetros do processo e ao procedimento de recolha para culturas de bactérias e leveduras ⁵⁸. Nos EUA, existe um tipo de cerveja que utiliza receitas e práticas de produção idênticas às da cerveja *lambic*. Esta cerveja denomina-se por *American Coolship Ale* (ACA) e o seu estilo é semelhante à cerveja “Sour”, assim como a sucessão de microrganismos que realiza a fermentação ⁵⁴. A cerveja ACA é tipicamente produzida como um produto sazonal ⁵⁶.

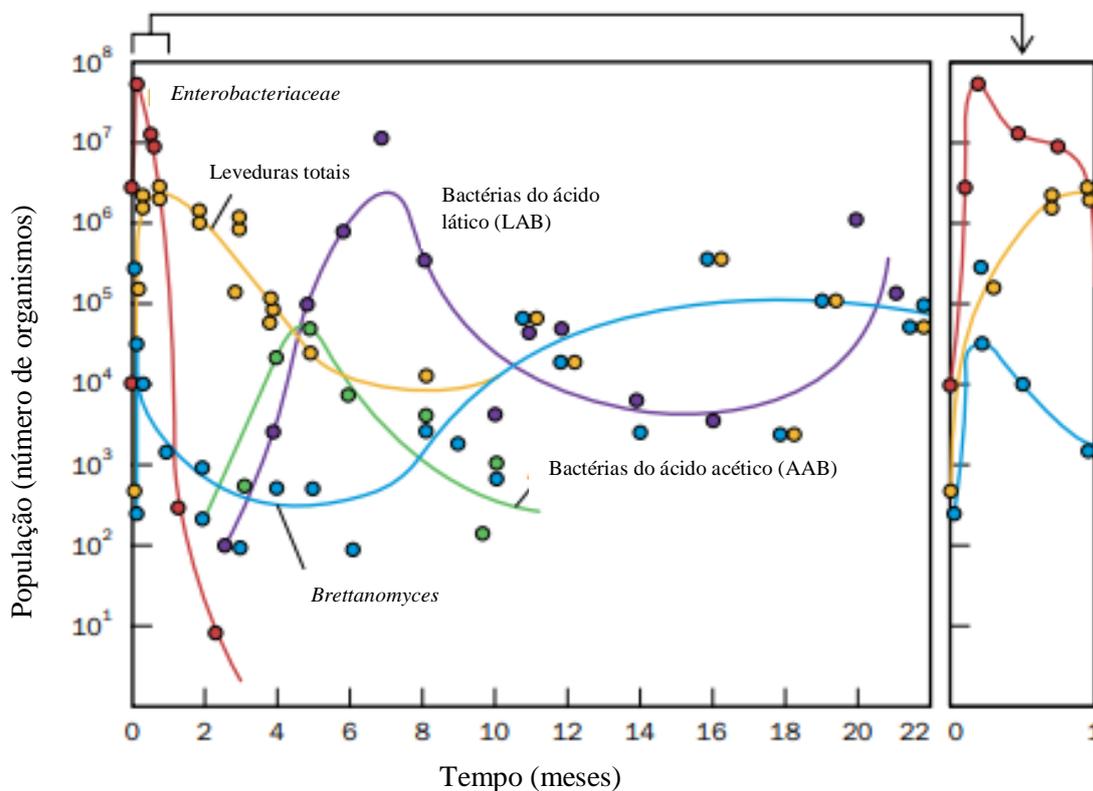


Figura 6. Evolução da diversidade de microrganismos presentes na cerveja *lambic* no decurso da fermentação: fase *Enterobacteriaceae*, fermentação, acidificação e maturação ³³. Adaptado da referência ³³.

I.3. Diversidade microbiana em cervejarias artesanais

A diversidade do microbioma envolvido na produção artesanal de cerveja é muito grande e depende do estilo de cerveja ⁸. Embora a fermentação do mosto por espécies de *Saccharomyces* seja o processo microbiano de maior importância, existe uma série de outros microrganismos, fungos e bactérias, implicados no procedimento completo (Figura 7) ²⁹. Alguns destes microrganismos são considerados contaminantes por serem provenientes de fontes externas, sem serem introduzidos intencionalmente, e por causarem a deterioração da cerveja. Outros, sem influenciarem decisivamente o paladar ou a textura, retardam o processo fermentativo, visto que competem com as leveduras pelos nutrientes disponíveis ⁸. Atualmente, há uma preocupação crescente no controlo de todas as etapas de produção, de forma a que os únicos microrganismos presentes na cerveja sejam aqueles que constituem o inóculo adicionado aos açúcares presentes no malte ⁵⁹. As fontes de contaminação podem surgir a partir das matérias-primas, do processo em si e do ambiente envolvente ⁸.

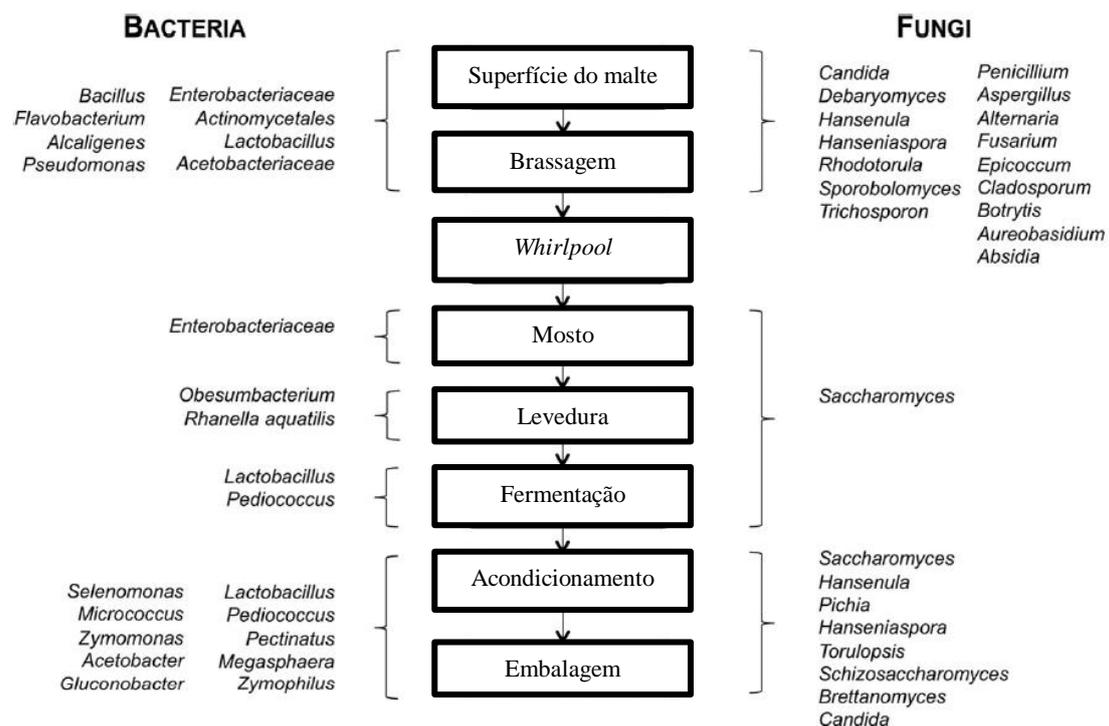


Figura 7. Diagrama demonstrativo do microbioma existente nas várias etapas da produção de cerveja: desde a maltagem ao empacotamento. Adaptado da referência ²⁹.

Na sua maioria, as bactérias presentes para além da fase inicial estão associadas a alterações indesejáveis e deterioração da cerveja. Os filos de *Bacteria* mais comuns na cerveja são *Firmicutes* (Gram positivo) e *Proteobacteria* (Gram negativo) ⁸. As

Firmicutes contêm uma camada espessa de peptidogluano na parede celular. As Classes deste Filo mais representadas na cerveja são *Bacilli* e *Negativicutes*⁸. A maior parte das *Firmicutes* presentes na cerveja são as LAB⁶¹. *Lactobacillus* e *Pediococcus* são LAB da Ordem *Lactobacillales* e Família *Lactobacillaceae*, cuja atividade pode afetar positiva ou negativamente a aparência e o perfil de sabores da cerveja⁶². Podem ser encontradas em quase todas as etapas do processo, desde a colheita da cevada até à bebida final^{6,61}. Caracterizam-se por atribuir uma textura turva à cerveja e um sabor amanteigado, associado à produção de diacetilo⁸. No entanto, algumas espécies de LAB podem ter efeitos benéficos na produção de malte, mosto e cervejas com um certo grau de acidificação, e por isso menos sujeitas à formação de neblina e à contaminação microbiana⁶³. A LAB mais frequentemente associada à deterioração da cerveja é *Lactobacillus brevis*, normalmente tolerante ao lúpulo e com ótimo crescimento a 30 °C e pH entre 4 e 5⁶¹. *Pediococcus damnosus* é também altamente resistente aos iso- α -ácidos presentes no lúpulo e tem a capacidade de se desenvolver a baixas temperaturas. Contribui para a formação de diacetilo e de ácidos durante a fermentação, além de aumentar a viscosidade do líquido^{8,64}. As bactérias da Classe *Negativicutes*, que inclui os géneros *Pectinatus* e *Megasphaera*⁸, estão associadas a um aumento da turbidez e a um sabor amargo resultante da produção de sulfeto de hidrogénio e de ácidos orgânicos, como o ácido acético e o butírico⁶³. As bactérias de Gram negativo são menos frequentes entre os agentes de deterioração da cerveja⁶¹. No entanto, quando presentes no mosto em concentrações elevadas, produzem grandes quantidades de compostos, tais como o DMS, ácidos orgânicos e 2,3-butanodiol, associados a sabores indesejáveis²⁹.

O filo *Proteobacteria*, metabolicamente diversificado, inclui bactérias de Gram negativo, entre as quais as AAB, apresentam uma parede celular distinta das *Firmicutes*, caracterizada por uma camada fina de peptidogluano e uma membrana externa lipopolissacáridica, análoga à das bactérias de Gram negativo^{8,65}. Estas conseguem converter o etanol em ácido acético e agrupam-se nos géneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*^{8,65}. São organismos aeróbios estritos que podem crescer na cerveja e causar a sua deterioração, por aumento da acidez e produção de *off-flavours*, turbidez e viscosidade, em condições aeróbias^{8,61,65}. A família *Enterobacteriaceae*, pertencente à classe γ -*Proteobacteria*⁸, inclui os géneros *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Obesumbacterium*²⁹. No mosto, estes géneros estão associados a compostos indesejáveis como o sulfureto de dimetilo. O desenvolvimento destes organismos afeta negativamente o crescimento de espécies de *Saccharomyces*.

Apresentam alguma resistência natural aos compostos antimicrobianos do lúpulo, mas são inibidas por concentrações elevadas de etanol e pH baixo. Normalmente não estão presentes no produto final podendo, todavia, interferir negativamente com o decorrer do processo ^{8,29}. Algumas espécies, especialmente dos géneros *Obesumbacterium* e *Enterobacter*, estabelecem relações de mutualismo com leveduras, levando à inoculação em série em lotes sucessivos ²⁹. Alguns filos pouco abundantes como *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroides*, *Chlamydiae* e *Planctomycetes* podem ocorrer durante o processo de produção, sendo detetáveis por abordagens de sequenciação avançada ^{45,61}.

Além das bactérias, os fungos, que incluem as leveduras e bolores, podem causar deterioração na cerveja ⁸. Alguns fungos filamentosos podem ser detetados na cevada, sugerindo uma notável relevância na qualidade do produto final ⁶⁶. Além de *Fusarium* spp., um dos bolores predominantes, neste e noutros cereais estão presentes outros fungos, produtores de micotoxinas detetáveis na cerveja e que inibem o crescimento de leveduras ^{29,67}. O desoxinivalenol (DON) tem sido demonstrado como a micotoxina mais abundante e ocorre normalmente nos grãos infetados com *Fusarium* ⁶⁷. Existe uma vasta gama de microrganismos presentes nos grãos de cereais, cuja abundância é afetada pela humidade e temperatura do processo de maltagem. Tal como na receção e armazenamento do malte, a temperatura e humidade usadas na maltagem podem resultar no desenvolvimento de fungos como *Aspergillus flavus*, *Penicillium parasiticus*, *Fusarium graminearum*, entre outros ²⁹. No entanto, as leveduras são termolábeis e não conseguem sobreviver ao processo de ebulição do mosto ⁸. As espécies contaminantes crescem mais depressa do que o inóculo, substituindo-o nos seus diferentes papéis, durante as sucessivas fermentações ⁶⁸. A levedura de fermentação também pode ser considerada como um contaminante, após a filtração da cerveja ⁶⁹. As leveduras contaminantes são normalmente leveduras selvagens, uma vez que não são usadas de forma deliberada na cervejaria e não estão sujeitas a um controlo ⁶⁸. Podem ser categorizadas como leveduras selvagens *Saccharomyces* ou não-*Saccharomyces* ⁸. As leveduras selvagens não-*Saccharomyces* incluem uma variedade de espécies, pertencentes aos géneros *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, e outros ⁶⁸. A maioria das leveduras selvagens causa estragos na cerveja através da produção de compostos como ácidos orgânicos e fenóis que atribuem sabores indesejáveis, formação de neblina ou de biofilmes superficiais ²⁹. Além disso, estas espécies aumentam a turbidez, dado que possuem propriedades não floculantes, formando sedimentos e depósitos granulares ⁸.

I.4. Identificação de microrganismos na indústria cervejeira

O estudo da microflora e da sua dinâmica durante o processo de produção de cerveja é essencial para assegurar a qualidade do produto final e a estabilidade das características ³⁴. A caracterização microbiológica engloba o estudo da viabilidade das leveduras, a sua estabilidade, o desempenho durante a fermentação e maturação e a capacidade de floculação das leveduras, para além dos habituais testes à desinfeção de equipamentos e condições sanitárias da produção ⁷⁰. Este controlo é realizado para confirmar a esterilidade dos materiais, determinar se o teor de microrganismos não excede os limites face ao risco de deterioração na cerveja e examinar a presença de microrganismos particulares ⁸. A monitorização deve abranger todas as etapas do processo, desde a seleção das matérias-primas até ao empacotamento do produto final e posterior venda ao cliente. As matérias-primas e os resíduos presentes nas máquinas, provenientes de anteriores utilizações, são suscetíveis a contaminações, podendo constituir fontes para o desenvolvimento de microrganismos, como bactérias, leveduras selvagens e bolores. Como tal, é necessário fazer a lavagem e desinfeção dos equipamentos, num processo denominado por CIP (*Cleaning in Place*) ^{8,70}. Os efeitos da contaminação vão desde ligeiras mudanças no desempenho da fermentação, que se refletem nos sabores e aromas da cerveja, até à turbidez e redução do desempenho da levedura. Eventualmente, nos piores cenários, a contaminação pode levar à eliminação de vários lotes, o que está associado a avultadas perdas financeiras ⁷⁰. No caso das cervejas “Sour”, o estudo da diversidade microbiológica presente visa determinar a influência das características das barricas na fermentação espontânea e na cerveja resultante, e na compreensão deste processo, após um longo período de maturação ⁵⁵.

Tradicionalmente, eram usadas apenas técnicas dependentes do cultivo, recorrendo à contagem de colónias em meios seletivos ou diferenciais, como uma estimativa da abundância microbiana. Assumia-se que, se o número de células de leveduras aumentasse rapidamente a partir do início da fermentação, a estirpe inoculada seria a dominante. No entanto, os métodos dependentes de cultivo implicam períodos de incubação longos em estufa, que variam consoante os grupos de microrganismos e meios de cultura. Além disso, falham na deteção de estirpes de crescimento lento, pouco abundantes ou com requisitos nutricionais particulares (estirpes fastidiosas) ^{8,34}, como é o caso das LAB ⁶. A aplicação de técnicas baseadas na biologia molecular permitiu o desenvolvimento de novos métodos de caracterização das comunidades microbianas complexas e abriram novas perspetivas de monitorização da dinâmica da sucessão

biológica durante a fermentação e o estabelecimento de relações entre a atividade metabólica dos microrganismos e as características da cerveja. As abordagens independentes de cultivo vieram possibilitar a detecção, identificação e caracterização de diferentes níveis taxonômicos e a contextualização ecológica das comunidades microbianas associadas à fermentação, incluindo as relações bióticas e abióticas em que estão envolvidos ^{8,34}.

I.4.1. Abordagens dependentes de cultivo

As abordagens dependentes de cultivo para a quantificação e identificação de microrganismos têm sido usadas há vários anos. Estas técnicas envolvem principalmente culturas de enriquecimento seletivo e sementeiras numa grande diversidade de meios de cultura. Atualmente, existem numerosas coleções de bactérias e fungos, caracterizados e identificados, representando as mais diversas matrizes ambientais alimentares ⁷¹. Ao longo do tempo, foram desenvolvidos vários métodos específicos de detecção de microrganismos que causam a deterioração da cerveja ⁶⁹. No entanto, a grande maioria (>99%) do mundo microbiano não é cultivável em laboratório ⁷².

Os métodos dependentes de cultivo apresentam algumas desvantagens, sobretudo para a determinação do número total de bactérias. As bactérias apenas podem ser cultivadas se as suas necessidades fisiológicas e metabólicas forem suscetíveis de serem reproduzidas *in vitro* e, na prática, apenas uma pequena fração das bactérias ambientais é cultivável em laboratório. Deste modo, quando comunidades microbianas complexas estão a ser analisadas por técnicas tradicionais de cultivo, os resultados são enviesados pela cultivabilidade ⁷³. Muitas células apresentam-se no estado viável-não-cultivável e, por outro lado, as culturas laboratoriais não conseguem reproduzir fidedignamente os nichos ecológicos e as relações simbióticas encontradas em ambientes naturais complexos, nos quais assenta a diversidade microbiana. Além de permitir seletivamente o crescimento de algumas espécies e suprimir o crescimento de outras, a composição da comunidade da fração cultivável é distorcida durante a cultura, porque os tempos de replicação variam com as espécies de rápido crescimento, superando outras com eficiência ^{72,73}. Assim, estes métodos não apresentam a sensibilidade e seletividade necessárias para a correta caracterização da estrutura das comunidades naturais ⁶⁹. No entanto, os métodos de referência e valores-guia associados a padrões de qualidade e

níveis de risco são ainda baseados em contagem de colônias, pelo que esta abordagem é ainda a mais usada nas rotinas de análise microbiológica nas indústrias cervejeiras ⁶⁹.

I.4.2. Abordagens independentes de cultivo

As abordagens moleculares baseadas em DNA ou RNA assentam na extração, amplificação e sequenciação de fragmentos de DNA ou na sequenciação avançada (pirosequenciação e Illumina) de produtos de amplificação (*barcoding*) ou DNA total (*metagenomics*) ^{72,74}. A pirosequenciação baseia-se na detecção e quantificação da atividade da DNA polimerase, recorrendo a três enzimas: ATP sulfúrilase, luciferase e apirase. O ATP gerado é usado pela luciferase para formar luz visível, cuja intensidade equivale à quantidade de bases incorporadas na sequência. O método de sequenciação Illumina ocorre numa superfície sólida, após o processo de amplificação dos produtos de PCR. É um método de sequenciação por síntese, consistindo na adição de bases marcadas com fluorescência, catalisada pela polimerase, com terminador reverso (Figura 8) ⁷⁵.

O conceito de sequência-assinatura, como as sequências da molécula de rRNA da menor subunidade dos ribossomas, subjacente ao *barcoding*, decorre da definição filogenética de espécie e permite a identificação bacteriana através da análise de sequências de nucleótidos. O conjunto de produtos de PCR obtido pode ser clonado e sequenciado, ou submetido a uma variedade de métodos de criação de perfil genético de uma comunidade ou de apenas um isolado ⁷².

Tendo em consideração as exigências dos fabricantes de cerveja para a deteção precoce de alterações na estrutura da comunidade microbiana e identificação rápida e específica dos microrganismos presentes, foram desenvolvidas inúmeras aplicações de métodos baseados em reações de PCR, como a eletroforese em gradiente de temperatura (TGGE, do inglês *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) e a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE, do inglês *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) ^{8,69}. Estas duas técnicas permitem comparar a composição microbiológica da cerveja, ao longo do tempo ou antes e depois de um processo de limpeza, permitindo ainda a distinção entre diferentes espécies de *Saccharomyces* ⁶⁹.

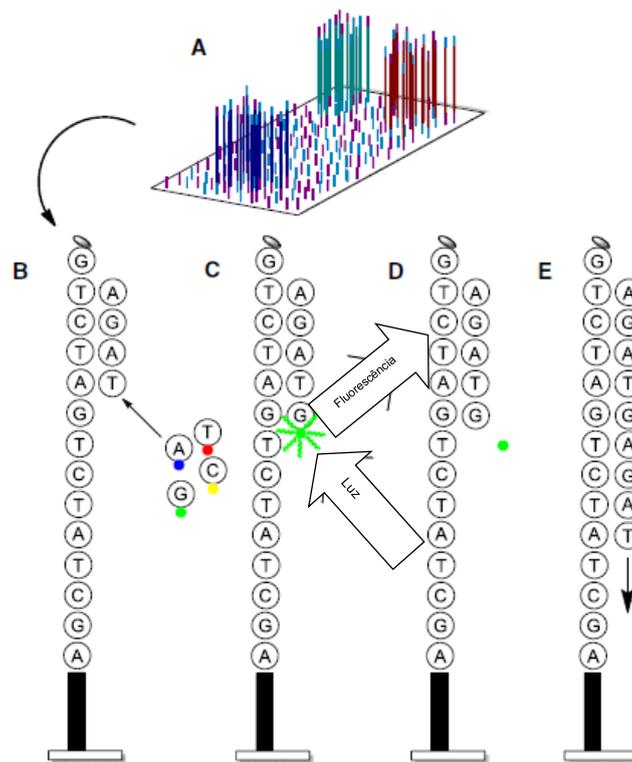


Figura 8. Procedimento de sequenciação por síntese (Illumina). Adaptado da referência ⁷⁵.

Os métodos biomoleculares podem aplicar-se também à quantificação e à identificação de espécies, à tipagem de estirpes e à avaliação de relações clonais que permitam inferir sobre fontes e vias de contaminação ⁶⁹. Os processos baseados em PCR podem ser realizados em tempo real, permitindo a detecção e quantificação de espécies individuais ou de populações bacterianas com precisão, bem como bactérias totais em ecossistemas bacterianos complexos ⁷³. A sequenciação do gene 16S rRNA é atualmente o método mais expedito e económico para a identificação de microrganismos isolados, principalmente bactérias ⁷⁶. Este é um gene conservado no domínio *Bacteria*, permitindo assim a caracterização de comunidades bacterianas complexas ⁷⁰. No caso dos fungos, normalmente são frequentemente usadas sequências dos genes 18S ou 23S rRNA ou da região ITS (do inglês, *Internal Transcribed Spacer*). No entanto, nem sempre é possível usar o diagnóstico molecular como rotina devido ao seu custo elevado e à necessidade de equipamentos e recursos humanos especializados. Estas análises são normalmente realizadas por entidades externas, traduzindo-se em grandes tempos de espera para a obtenção dos resultados. No entanto, estas técnicas independentes de cultivo, apresentam vantagens ao nível da sua reprodutibilidade e sensibilidade ⁷⁶. Além disso, permitem a

distinção entre espécies diferentes contendo características fenotípicas idênticas, e mesmo entre estirpes da mesma espécie ⁷³.

As novas metodologias de sequenciação, designadas como metodologias de sequenciação avançada (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*) vieram revolucionar a aplicação de métodos moleculares à caracterização de comunidades microbianas complexas ⁷⁷. A elevada capacidade analítica tornou possível a sequenciação de genomas completos ou a identificação exaustiva dos taxa representados na comunidade, mesmo aqueles cuja abundância relativa é tão baixa que seriam indetetáveis por outros métodos ^{75,78}. Estas metodologias já foram adotadas na análise de amostras de cerveja, por Roos e co-autores ⁵⁵, por Manzano e co-autores ⁶⁹, entre outros ^{55,69}.

I.5. Objetivo do estágio

A realização do estágio na empresa Essência D'Alma teve como objetivo geral adquirir algum conhecimento da realidade do mundo empresarial, em particular numa microcervejaria. Durante o estágio, participou-se em diversas atividades na cervejaria. Estas debruçavam-se no acompanhamento do processo de produção, higienização e limpeza dos equipamentos e áreas de trabalho, enchimento e rotulagem de barris e garrafas. Além disso, realizou-se análises ao pH, °Brix e potencial alcoólico das cervejas das cubas e análises à viabilidade das leveduras, permitindo uma monitorização eficiente ao nível do controlo de qualidade dos produtos e das leveduras.

A componente laboratorial do trabalho foi orientada para o objetivo específico de caracterizar as comunidades microbianas associadas aos diferentes tipos de cervejas “Sour” armazenadas em barricas de madeira de carvalho, que se encontram em fases distintas do processo fermentativo. Pretendeu-se compreender a relação entre a estrutura e composição do microbioma, com as condições de maturação em barricas de madeira e com as características de cada tipo de cerveja, na perspetiva da deteção precoce de contaminantes e de agentes de deterioração, do controlo do processo de produção e da estabilidade do produto final. Para a caracterização microbiológica seguiram-se as duas abordagens, dependente e independente de cultivo.

II. Materiais e Métodos

II.1. Amostragem

A caracterização microbiológica incidiu sobre as cervejas do tipo “Sour”, em fase de acidificação, contidas em barricas de madeira de carvalho. Estas tinham capacidades de 225, 300 e 500 L. Na Tabela 3 estão identificados os tipos de cerveja que foram analisados, bem como os respetivos lotes e datas de armazenamento. Os tipos e estilos de cerveja produzidos na Essência D’Alma encontram-se detalhados no Anexo I. No Anexo II, é apresentado o fluxograma correspondente ao processo de produção da cerveja “Sour” na empresa. A data de armazenamento corresponde ao dia em que a cerveja foi colocada na barrica, tida como a data de início da fermentação. À data da colheita, as cervejas encontravam-se em fase de maturação.

II.2. Avaliação de parâmetros da fermentação (em cuba)

De modo a caracterizar o grau de maturação das cervejas, procedeu-se à determinação do pH, grau Brix e potencial alcoólico, como parâmetros descritores da evolução do processo fermentativo. Estes parâmetros foram determinados nas cubas de fermentação, imediatamente antes de serem transferidas para as barricas (valores obtidos a partir dos registos da cervejaria) e no momento da amostragem (data de colheita). O pH foi determinado com um potenciómetro (Hanna edge™ Tablet pH Meter Kit). O grau Brix e o potencial alcoólico foram estimados com recurso a um refratómetro eletrónico (HI96800 Digital Refractometer), sendo esses os valores considerados para a análise.

Tabela 3. Descrição do conteúdo e lote de cada barrica analisada, assim como o lote e a data de armazenamento da cerveja na mesma, e volume correspondente.

Cerveja	Nº barrica	Lote da cerveja	Volume da barrica (L)	Data de armazenamento	Data de colheita	Tempo de fermentação
Extra	21	B055EX	225	09/07/2019	04/02/2020	~7 meses
	22	B055EX	225	09/07/2019	04/02/2020	~7 meses
	25	B055EX	225	09/07/2019	04/02/2020	~7 meses
Trigo	2	B119TB + B035TB	200 + 100	06/11/2019	19/02/2020	~3 meses
	5	B119TB + B128TB	150 + 75	28/11/2019	19/02/2020	~3 meses
	7	B128TB	225	28/11/2019	19/02/2020	~3 meses
Rubi	9	A092SL	225	09/07/2019	04/02/2020	~7 meses
	11	A092SL	225	09/07/2019	04/02/2020	~7 meses
	13	A092SL	225	09/07/2019	04/02/2020	~7 meses
Baltic Porter	10	B011BP	225	10/04/2019	06/12/2019	~8 meses
	12	B011BP	225	09/07/2019	06/12/2019	~5 meses
Preta	16	B044LP	500	09/07/2019	06/12/2019	~5 meses

II.3. Colheita de amostras para análises microbiológicas

A colheita das amostras foi efetuada diretamente nas barricas armazenadas à temperatura ambiente, nas instalações da cervejaria Essência D'Alma, utilizando material estéril descartável ou material previamente esterilizado no autoclave, no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ambiental do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. Com uma seringa esterilizada ligada a um tubo, retirou-se uma amostra de 30-40 mL de cada barrica, para o cultivo dos microrganismos. Para a realização da análise independente de cultivo, foi necessário colher 250-300 mL de cada barrica. As amostras foram transferidas para frascos esterilizados, devidamente etiquetados. De seguida, foram mantidos no frio (4 °C) durante um período de, aproximadamente, 4 dias, até serem transportados para o laboratório onde se procedeu à análise.

II.4. Análises microbiológicas dependentes de cultivo

A abordagem dependente de cultivo foi usada para a quantificação de grupos de microrganismos relevantes, por sementeira em meios específicos ⁷¹. Usaram-se diferentes meios de cultura, adaptados a cada grupo de microrganismos, para determinar a concentração de bactérias e fungos.

As amostras foram diluídas em série (10^{-1} e 10^{-2}), usando o soluto de Ringer (Merck) como líquido de diluição. Para a determinação do total de bactérias mesófilas aeróbias, alíquotas de 1 mL em triplicado foram semeadas por incorporação em *Plate Count Agar* (PCA, BioLab, Hungria). Para quantificação de bactérias lácticas, procedeu-se à sementeira por incorporação em triplicado, no meio *Wallerstein Laboratory Differential Agar* (WLD Agar, Merck) adicionado de cicloheximida (Merck). As culturas de bactérias totais e de bactérias lácticas foram incubadas durante 3 dias a 30 °C ⁷⁹. O teor de fungos totais (bolores e leveduras) foi determinado por sementeira à superfície de alíquotas de 0,2 mL (5 réplicas), em meio *Yeast Glucose Chloramphenicol Agar* (YGCA, BioLab, Hungria) ou *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* (RBCA, Liofilchem, Itália) ^{80,81}. O teor de leveduras de cerveja foi determinado por sementeira à superfície de 0,2 mL (5 réplicas), em *Wallerstein Laboratory Nutrient Agar* (WLN Agar, Merck) ⁸². As culturas de fungos e leveduras de cerveja foram incubadas durante 5 dias a 25 °C. A concentração final foi calculada a partir da média da contagem de colónias características na diluição mais conveniente, corrigida para o tamanho da alíquota e para o fator de

diluição. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC.mL⁻¹)⁵⁵.

II.5. Análises independentes de cultivo

A análise independente de cultivo incidiu apenas sobre 2 tipos de cervejas, com características distintas, “Rubi” e “Extra”. A cerveja Extra é uma *Doppelbock Lager* (8%) e Rubi é uma *Märzen Lager* (6,3%) (Anexo I). As amostras (~250 mL) foram recolhidas de forma idêntica à descrita para as análises dependentes de cultivo, em barricas correspondentes a cerca de 7 meses de armazenamento. As amostras foram recolhidas assepticamente com uma seringa, a partir de 3 barricas de um mesmo lote de Extra (Barricas #21, #22 e #25) e de um mesmo lote de Rubi (Barricas #9, #11 e #13), e de seguida transferidas para garrafas de vidro estéril e mantidas a 4 °C até à sua utilização. Posteriormente, as amostras foram transportadas para o laboratório, para procedimentos de extração de DNA. No momento da colheita, foram também medidos os parâmetros físico-químicos relacionados com a fermentação, como descrito no item II.2.

II.5.1. Extração de DNA metagenómico e sequenciação

Um total de 250 mL de cerveja foi concentrado por centrifugações sucessivas de alíquotas de 50 mL (centrífuga Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 R) a 13000 g durante 15 minutos, em tubos de centrifugação Falcon. O sobrenadante foi descartado e o sedimento guardado no congelador a -20 °C.

A extração de DNA foi efetuada a partir do sedimento, usando o NZY Soil gDNA Isolation Kit, e seguindo o protocolo do fabricante⁸³. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose (0,8%) (Fisher BioReagents, USA). A amplificação por PCR de sequências de genes 16S e 18S de rRNA com *primers* universais foi efetuada para confirmar a presença de bactérias e fungos, respetivamente. Para a amplificação de sequências de rRNA 16 S foram usados os *primers* 16S F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') e 1492R (5'-CGG CTA CCT TGT TAC GAC TT-3')⁸⁴. A mistura de reação foi constituída por água (10,5 µL), MasterMix Thermofisher (12,5 µL), Albumina sérica bovina (BSA) 12 mg/mL (0,5 µL), *primers* F 10 µM (0,25 µL), *primers* R 10 µM (0,25 µL) e DNA (1 µL) num volume total de 25 µL. O protocolo de PCR consistiu numa etapa de desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos

de desnaturação a 95 °C durante 45 segundos, *annealing* a 56 °C durante 45 segundos e extensão a 72 °C durante 90 segundos, e uma extensão final a 72 °C durante 10 min.

Para a amplificação de genes 18S foram usados os *primers* Euk_18Sa (5'–AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT–3') e Euk_18Sb (5'–GAT CCT TCT GCA GGT TCA CCT AC–3')⁸⁵. A mistura de reação foi preparada com água (9,25 µL), MasterMix Thermofisher (12,5 µL), BSA 12 mg/mL (1,25 µL), DMSO (0,5 µL), *primers* F 10 µM (0,25 µL), *primers* R 10 µM (0,25 µL) e DNA (1 µL) num volume final de 25 µL. O protocolo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C durante 2 min, seguida de 38 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 45 segundos, *annealing* a 55 °C durante 1 min e extensão a 72 °C durante 2 min, terminado com uma extensão final a 72 °C durante 10 min. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) com RedSafe DNA.

As amostras foram preparadas para a sequenciação Illumina por amplificação do gene 16S rRNA bacteriano e da região ITS 2 de fungos. O DNA foi amplificado para as regiões hipervariáveis com *primers* específicos, e posteriormente reamplificado num conjunto de reações de PCR de ciclo limitado para adicionar adaptadores de sequenciação e índices duplos. As primeiras reações de PCR foram realizadas para cada amostra usando KAPA HiFi HotStart PCR Kit de acordo com as instruções do fabricante. A mistura de reação foi preparada com 0,3 µM de *primer* direto Bakt_341F 5'–CCTACGGGNGGCWGCAG–3' e *primer* reverso Bakt_805R 5'–GACTACHVGGGTATCTAATCC–3' para bactérias^{86,87}, e do conjunto de *primers* diretos ITS3NGS1_F 5'-CATCGATGAAGAACGCAG-3', ITS3NGS2_F 5'-CAACGATGAAGAACGCAG-3', ITS3NGS3_F 5'-CACCGATGAAGAACGCAG-3', ITS3NGS4_F 5'-CATCGATGAAGAACGTAG-3', ITS3NGS5_F 5'-CATCGATGAAGAACGTGG-3', e ITS3NGS10_F 5'-CATCGATGAAGAACGCTG-3' e *primer* reverso ITS4NGS001_R 5'-TCCTSCGCTTATTGATATGC-3' para fungos⁸⁸, e 12,5 ng de DNA molde num volume total de 25 µL. O protocolo de PCR consistiu de uma desnaturação de 3 minutos a 95 °C, seguida de 25 ciclos de 20 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C (16S) ou a 60 °C (ITS2) e 30 segundos a 72 °C, e de uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. As reações de PCR subsequentes para adição de índices e adaptadores de sequenciação a ambas as extremidades da região-alvo amplificada, foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante⁸⁹. Em todos os procedimentos de amplificação foram incluídos controlos negativos constituídos por

tubos extra, ao quais se adicionaram todos os reagentes usados no procedimento de PCR, exceto DNA. O serviço de sequenciação avançada foi contratado à empresa Genoinseq (Cantanhede, Portugal). Os produtos de PCR foram purificados e normalizados usando SequalPrep 96-well plate kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) ⁹⁰, agrupados e sequenciados em pares no sequenciador Illumina MiSeq® com a química V3, de acordo com as instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, EUA).

II.5.2. Processamento da sequenciação e análises estatísticas

As leituras brutas foram extraídas do sistema Illumina MiSeq® em formato fastq e filtradas por qualidade com PRINSEQ versão 0.20.4 ⁹¹ para remoção dos adaptadores de sequenciação, de leituras <100 bases de fragmentos de ITS2 e <150 bases de fragmentos 16S, e fragmentos com uma qualidade média inferior a Q25 numa janela de 5 bases. As leituras direta e reversa foram fundidas através da sobreposição de leituras emparelhadas com AdapterRemoval versão 2.3.0 ⁹², recorrendo a parâmetros padrão.

A aplicação ITSx versão 1.1.2 ⁹³ foi usada para extrair a sub-região fúngica ITS2 altamente variável das leituras mescladas. Para a geração de OTU (do inglês, *Operational Taxonomic Unit*), identificação taxonómica, diversidade de amostra e cálculo de índices de abundância foi usado o pacote QIIME2 versão 2020.2.0 ⁹⁴. Os IDs de amostra foram atribuídos às leituras mescladas e convertidos para o formato Fasta. As leituras mescladas quiméricas foram detetadas e removidas com a ferramenta Vsearch ⁹⁵, uma implementação de UCHIME ⁹⁶ contra o banco de dados Greengenes versão 13.8 ⁹⁷ para o gene 16S rRNA e o banco de dados UNITE / QIIME ITS versão 8.2 ⁹⁸ para ITS. As OTUs foram selecionadas com um limite de similaridade de 97%, usando a estratégia de referência aberta e as unidades com menos de duas leituras foram removidos da tabela de OTU. Uma sequência representativa de cada OTU foi selecionada para a atribuição de níveis taxonómicos usando um classificador *plugin* q2-feature ⁹⁹, e o classificador Naïve Bayes pré-treinado, com base nas sequências completas de OTUs de SILVA 138, no caso do 16S rRNA. Para sequências de DNA de fungos ITS2, foi aplicada a base de dados dinâmica UNITE v. 8.2 ⁹⁸.

A cobertura de sequenciação foi avaliada pela análise das curvas de rarefação Chao1. As abundâncias relativas dos grupos funcionais em cada amostra foram calculadas como a abundância cumulativa de OTUs atribuídas a cada grupo funcional. A análise das tabelas de abundância foi realizada utilizando R v4.0 ¹⁰⁰ e o pacote phyloseq ¹⁰¹. Os

gráficos foram gerados com o pacote ggplot2 ¹⁰². A diversidade alfa, índices chao1, dominância, equitabilidade, *goods coverage*, espécies observadas, índices de Shannon-Wiener e Simpson foram calculados como descritores da diversidade e riqueza das comunidades fúngicas e bacterianas nas diferentes amostras. Diferenças estatísticas em índices de diversidade alfa entre os estilos Extra e Rubi foram determinadas pelo teste ANOVA unidirecional. A diversidade beta foi avaliada por análise multidimensional de escala (MDS, do inglês *MultiDimensional Scaling*) baseada em distâncias de dissimilaridade em matrizes de Bray Curtis. As OTUs partilhadas entre as amostras de cerveja foram representadas num diagrama de Venn ¹⁰³. A composição das comunidades foi expressa como abundâncias relativas ao nível do género.

III. Resultados e Discussão

III.1. Parâmetros de evolução da fermentação

De modo a avaliar a evolução do processo fermentativo, mediram-se os valores do pH, grau Brix e potencial alcoólico no início da fermentação e no momento da amostragem, em algumas das barricas das quais se procedeu à colheita de amostras para análises microbiológicas, após alguns meses de maturação (Tabela 4).

Tabela 4. Valores do °Brix, potencial alcoólico e pH inicial de cada amostra de cerveja analisada.

Cerveja	Nº barrica	Lote da cerveja	°Brix inicial	Potencial alcoólico inicial	pH inicial	Data de recolha	°Brix	Potencial alcoólico	pH
Extra	21	B055EX	10,8	6,0	4,42	04/02/2020	11,0	6,1	3,69
	22	B055EX	10,8	6,0	4,42	04/02/2020	11,1	6,1	3,68
	25	B055EX	10,8	6,0	4,42	04/02/2020	11,0	6,1	3,70
Trigo	2	B119TB+B035TB	6,7	3,7	3,96	19/02/2020	6,2	3,4	3,06
	5	B119TB+B128TB	6,6	3,6	4,15	19/02/2020	6,2	3,4	3,19
	7	B128TB	6,5	3,6	4,14	19/02/2020	6,2	3,4	3,21
Rubi	9	A092SL	7,7	4,2	4,65	04/02/2020	6,8	3,7	3,37
	11	A092SL	7,7	4,2	4,65	04/02/2020	6,6	3,6	3,35
	13	A092SL	7,7	4,2	4,65	04/02/2020	7,5	4,1	3,55
Baltic Porter	10	B011BP	13,1	7,2	4,15	06/12/2019	13,4	7,3	3,66
	12	B011BP	13,1	7,2	4,15	06/12/2019	13,3	7,3	3,68
Preta	16	B044LP	6,9	3,8	4,13	06/12/2019	6,3	3,5	3,70

Nas amostras da cerveja Baltic Porter recolhidas, tanto o °Brix como o potencial alcoólico aumentaram ligeiramente, em ambas. O °Brix mede a quantidade de açúcares por 100 g de cerveja ¹⁰⁴. Isto quer dizer que, quando se deu início a fermentação, havia menor quantidade de açúcares relativamente à data de recolha. De acordo com as medições, o teor alcoólico potencial baixou ligeiramente, o que não seria de esperar, visto que este parâmetro é normalmente determinado pela multiplicação do valor do °Brix obtido por um fator de conversão entre 0,55 a 0,65, que varia consoante a espécie de levedura, entre outros fatores ¹⁰⁴. Contudo, neste caso, o potencial alcoólico foi obtido por medição no refratómetro, podendo ter havido um erro na medição. Outro cenário possível é, a bebida que esteve anteriormente na barrica ser de teor alcoólico elevado e isso influencia o comportamento dos microrganismos na própria cerveja, além de a Baltic Porter ser uma cerveja com teor alcoólico elevado, possuindo 8% de álcool (v/v) (Anexo I). Como os açúcares vão ser consumidos na fermentação, quanto maior for a concentração consumida, menor será a quantidade de açúcares disponível e maior será a quantidade de etanol que se forma no processo fermentativo. No caso da cerveja Preta, os parâmetros correspondem a cerca de metade da Baltic Porter e verifica-se uma descida quer no °Brix quer no potencial alcoólico. Relativamente ao pH, este desceu em todas as amostras, devido à presença de determinados microrganismos nas barricas que tornam a bebida contida mais ácida, formando compostos que conferem acidez. A descida foi idêntica quer na Baltic Porter quer na Preta, porque além de terem um pH inicial praticamente igual, o valor final foi muito semelhante.

As 3 barricas de cervejas Rubi (barricas 9, 11 e 13) eram idênticas quanto ao lote de cerveja e ao volume da barrica. O °Brix baixou, embora a descida tenha sido mais pronunciada nas barricas 9 e 11, indicando que houve um maior consumo de açúcares por parte dos microrganismos. O mesmo aconteceu com o potencial alcoólico que sofreu uma descida mais expressiva nas barricas 9 e 11 e uma diminuição mínima na barrica 13. O pH desceu pelo menos 1 grau em todas as amostras. Todas as cervejas são naturalmente ácidas. No caso da Rubi, é menos ácida que as restantes analisadas, sendo que o aumento da acidez resulta de um crescimento de espécies bacterianas, nomeadamente associadas à formação de ácido láctico. Em termos de aspeto (Figura 9) é possível observar que a cerveja recolhida da barrica 11 apresentava um aspeto mais baço e turvo do que a das barricas 9 e 13. Isto pode ser explicado pelo maior teor de “borra” (sedimento) presente na cerveja da barrica 11, o que aumenta a sua turbidez. Esta cerveja pode ter transportado mais “borra”, por duas razões: devido à bebida alcoólica que estava anteriormente contida

na barrica, ou quando se fez a transferência da cerveja da cuba para a barrica, o que poderá ter arrastado consigo mais sedimento.

As 3 cervejas Extra (barricas 21, 22 e 25) correspondiam também a um mesmo lote de produto e a barricas de igual volume. O °Brix aumentou ligeiramente, assim como o potencial alcoólico. Ambos os parâmetros da fermentação apresentaram valores que correspondem a cerca do dobro dos registados na cerveja Rubi. Seria expectável que o °Brix diminuísse, devido ao consumo de açúcares por parte das leveduras. No entanto, o valor aumentou, o que pode explicado pela bebida anterior que estava nas barricas de Extra, e que era vinho moscatel. Este tipo de vinho é tradicionalmente feito a partir de uvas colhidas tardiamente ou uvas secas. O processo de fermentação é interrompido para preservar a doçura do vinho e este sofre um envelhecimento oxidativo, provocando a oxidação dos polifenóis e um escurecimento gradual da cor do vinho ¹⁰⁵. Sendo um vinho tradicionalmente doce, pode ser por esse motivo que o °Brix tenha aumentado. O pH diminuiu como era de esperar, devido ao processo de acidificação acelerado pela madeira da barrica e pela microflora presente.

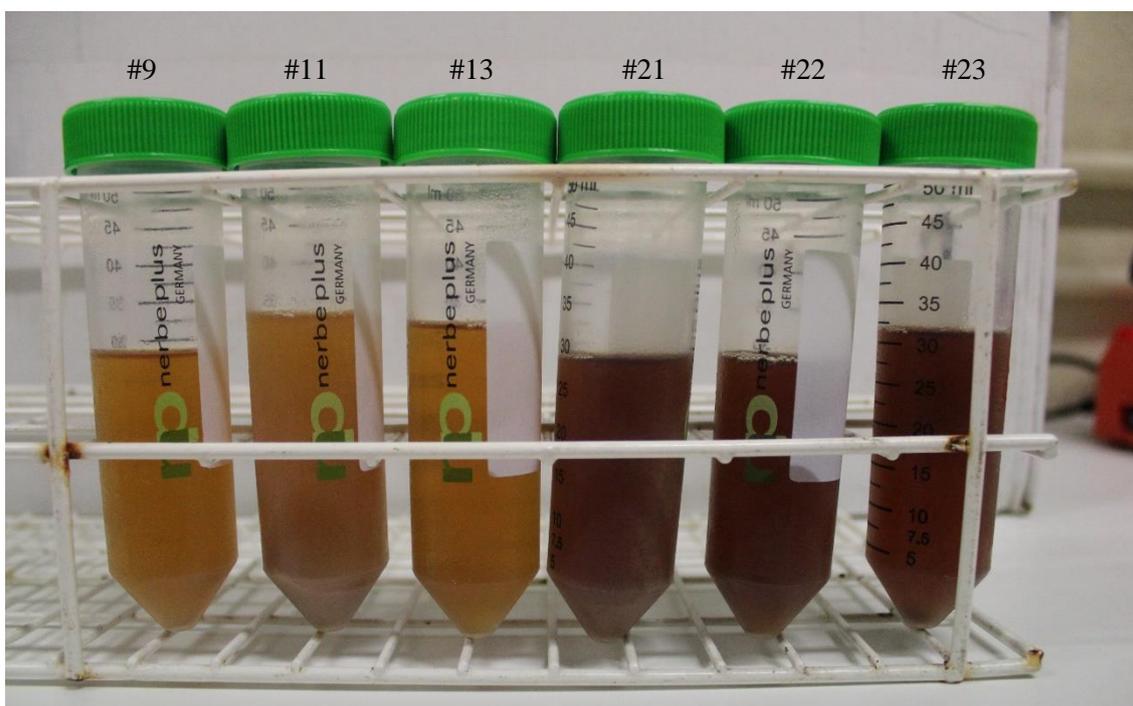


Figura 9. Amostras de cervejas Rubi (Barricas #9, #11 e #13) e Extra (Barricas #21, #22 e #23).

As barricas 2, 5 e 7 correspondiam a diferentes lotes de cerveja Trigo. Todas as amostras apresentaram valores idênticos de grau Brix e potencial alcoólico, valores esses que desceram face aos parâmetros iniciais de forma praticamente idêntica devido aos

valores finais e iniciais serem semelhantes. O pH baixou, registrando-se uma descida superior na barrica 2, o que pode ser explicado pelo facto de nesta barrica haver um lote de cerveja (B035TB) misturado com o lote B119TB. Isto pode ter acidificado mais a bebida, além do processo de acidificação tradicional feito a partir da microflora presente. A cerveja Trigo contida nas barricas 5 e 7 correspondem a lotes diferentes, sendo que a 5 diz respeito a uma mistura de dois lotes (B119TB+B128TB). No entanto, nas medições realizadas obtiveram praticamente o mesmo pH inicial e a descida em ambas as amostras foi idêntica. Estas amostras demonstraram ser ligeiramente menos ácida que a Trigo da barrica 2, o que nos indica que pode haver diferenças nas propriedades organoléticas das cervejas entre estilos idênticos de lotes diferentes.

A transferência da cerveja para barricas de madeira de carvalho enchidas até à sua capacidade máxima, tem como objetivo acelerar o processo de acidificação iniciado ainda na cuba, resultando a cerveja de tipo “Sour”. No entanto, não se pretende que todas acidifiquem. No caso da cerveja Extra, pretende-se apenas que a maturação assegure o desenvolvimento de um sabor distinto, mais forte do ponto de vista do teor alcoólico. São usadas barricas que tenham anteriormente servido para o armazenamento de outras bebidas, como vinho do Porto, whisky, moscatel, ou outras, e que por isso, podem conter vestígios de depósitos anteriores. Deste modo, o seu teor alcoólico da cerveja armazenada pode aumentar havendo também modificações no sabor. Durante o período de maturação da bebida, em contacto com a madeira, ocorrem diversos processos físicos e químicos, dos quais pode resultar a extração de compostos voláteis e fenólicos da madeira, responsáveis pela atribuição de notas aromáticas, sabor e cor à bebida ¹⁰⁶. No entanto, há também o risco de acidificação excessiva.

III.2. Quantificação de microrganismos

Os resultados da quantificação de bactérias aeróbias mesófilas totais e bactérias lácticas, fungos totais e leveduras de cerveja são apresentados na Figura 10, para todas as amostras em que se fez a abordagem dependente de cultivo.

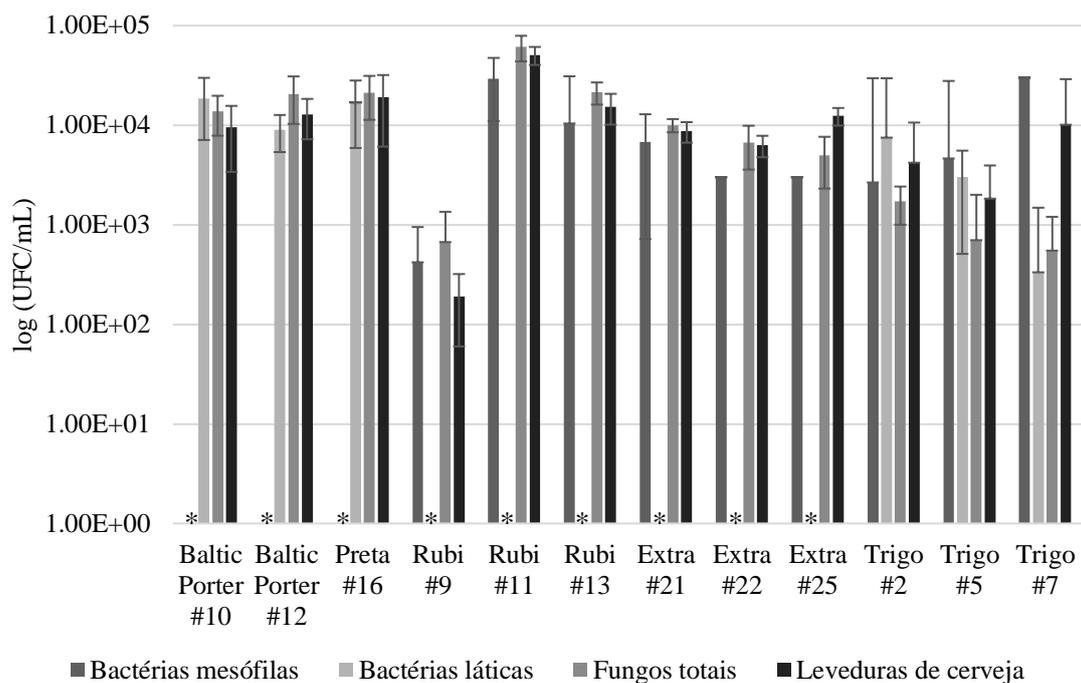


Figura 10. Representação do teor de bactérias mesófilas aeróbias totais, bactérias lácticas, fungos totais e leveduras de cerveja em amostras correspondentes a diferentes estilos de cervejas tipo “Sour”, determinados por contagem de colônias após sementeira em meios de cultura adequados. Os valores representam a média de 3 (bactérias) ou 5 (fungos) réplicas analíticas e as barras de erro representam o desvio padrão. * – não determinado por problemas de contaminação.

A cerveja Rubi apresentou a maior concentração de bactérias aeróbias mesófilas. No entanto os resultados foram heterogêneos, com valores de $2,9 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ e de $1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹, nas barricas 11 e 13, respetivamente, e um valor bastante inferior ($4,2 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹) na barrica 9. A diferença é estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$), e pode ter resultado de uma diferença pontual na profundidade a que foi feita a colheita de líquido nesta barrica. A cerveja Extra apresentou um teor de bactérias mesófilas situado no intervalo $3,0 - 6,8 \times 10^3$ UFC mL⁻¹, ligeiramente superior ao teor destes microrganismos determinado na Trigo ($2,7 - 4,6 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹).

Apenas foi possível obter resultados do teor de bactérias lácticas na amostra Trigo ($3,3 \times 10^2 - 7,5 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹), Baltic Porter ($9,0 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ na barrica 12 e $1,8 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ na barrica 10) e Preta ($1,7 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹). Estas últimas, com concentrações de bactérias idênticas, apresentam também características sensoriais semelhantes, embora a Baltic Porter tenha um teor alcoólico mais elevado, confirmado pelos parâmetros indicadores da fermentação. De realçar que quer nas bactérias lácticas quer nas bactérias aeróbias mesófilas foram utilizadas apenas 3 réplicas uma vez que foi semeado 1 mL de amostra em cada placa de meio.

Para análise de fungos totais (bolors+leveduras), houve necessidade de alterar o meio de cultura, motivada por limitações de disponibilidade de material no laboratório. Assim sendo, foi usado o meio YGCA nas amostras de Baltic Porter e Preta e o meio RBCA nas amostras Rubi, Extra e Trigo. No entanto, ambos os meios são adequados à enumeração de fungos em matrizes alimentares^{107,108}, pelo que esta descontinuidade no procedimento não terá provavelmente tido um impacto significativo nos resultados quantitativos. Não foram detetadas colónias de bolors, pelo que as contagens totais correspondem a leveduras e indicam que, a estarem presentes, os bolors estarão representados em concentrações muito baixas. As cervejas Baltic Porter ($1,4-2,1 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹) e a Preta ($2,1 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹) registaram, globalmente, os teores mais elevados. Os teores mais baixos correspondem à cerveja Trigo ($5,50 \times 10^2-1,71 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹). Na cerveja Rubi, observou-se diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, $p < 0,05$) entre barricas, ($6,7 \times 10^2-5,1 \times 10^4$ UFC mL⁻¹), tendo o teor máximo sido registado na barrica 11. Esta heterogeneidade coincide com a observada no teor de bactérias aeróbias mesófilas o que reforça a hipótese de ser consequência de uma variação inadvertida do procedimento de amostragem. Por sua vez, a cerveja Extra registou uma concentração destes organismos situada entre $5,0 \times 10^3-1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹, correspondendo à amostra da barrica 25 e 21, respetivamente.

As leveduras de cerveja foram também quantificadas em meio WLN. Este meio é particularmente indicado para este tipo de produto alimentar, cobre melhor os requisitos das leveduras e permite a distinção visual de alguns dos géneros mais relevantes (e.g. *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*) pelas características das colónias¹⁰⁹. Tal como os teores de bactérias aeróbias mesófilas e fungos totais, a cerveja Rubi apresentou também variabilidade entre barricas (ANOVA, $p < 0,05$), quanto ao teor de leveduras de cerveja ($1,9 \times 10^2-5,1 \times 10^4$ UFC mL⁻¹). Na cerveja Extra, foi determinado um teor de leveduras inserido no intervalo $6,3 \times 10^3-1,2 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹. Nos restantes estilos, as concentrações de leveduras foram semelhantes, dentro da gama $1,8 \times 10^3-1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ (Trigo) a $1,9 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ (Preta). Este resultado indica que as características distintivas dos diferentes estilos são mais definidas pelo tipo de leveduras do que pela sua abundância. Na cerveja Trigo, o teor de leveduras em meio WLN foi superior ao teor de fungos totais (bolors e leveduras) em meio RBCA, o que é explicado pelo crescimento mais rápido das leveduras de cerveja em meio WLN. Quer nos fungos totais quer nas leveduras, semearam-se 0,2 mL em cada placa, daí que foram semeadas 5 réplicas para cada amostra.

Em geral, a concentração de bactérias e fungos foi mais homogênea entre as barricas de Extra, mas significativamente diferente (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras de Rubi, o que, para além do eventual efeito do procedimento de colheita, pode estar relacionado com uma pressão seletiva mais fraca de teor de açúcar e de potencial alcoólico na cerveja Rubi. As cervejas com menor potencial alcoólico são as Trigo, Rubi e a cerveja Preta, todas com um teor inferior a 5%. As Extra e as Baltic Porter apresentam um teor alcoólico acima de 6%. O teor alcoólico funciona como fator seleção, reduzindo o crescimento de leveduras selvagens ¹¹⁰, o que pode também contribuir para a maior heterogeneidade entre barricas dos estilos com menor teor alcoólico, como é o caso da cerveja Rubi. A cerveja “Extra” apresentou teores de microrganismos dentro da média da concentração obtida para cada um dos outros estilos. Esta cerveja não é considerada verdadeiramente uma cerveja “Sour”, sendo incluída na gama *Harmonização* das cervejas da Essência D’Alma (Anexo I).

III.3. Estrutura e composição das comunidades microbianas

As amostras analisadas por sequenciação avançada corresponderam a lotes únicos dos estilos Extra (Barricas #21, #22 e #25) e Rubi (Barricas #9, #11 e #13). A Rubi é uma cerveja da gama Normal (Anexo I), que através do estágio em barricas deverá desenvolver os sabores e características típicas de uma cerveja de tipo “Sour”, contrariamente à Extra, da gama Harmonização, que se pretende que adquira aromas e sabores diferenciados. Embora não apresente as características típicas de “Sour”, esta cerveja também acidifica e apresenta uma microflora interessante do ponto de vista da compreensão do processo cervejeiro.

III.3.1. Diversidade e abundância fúngica

O número de OTUs fúngicas nos conjuntos de sequências, variou de 483 a 911 em Extra e de 475 a 854 nas obtidas na cerveja Rubi (Tabela 5). As curvas de rarefação tendem para um patamar de saturação, embora não seja perceptível, indicando que o esforço de sequenciação foi suficiente para cobrir a maior parte da diversidade de fungos, nestas amostras de cerveja (Figura 11).

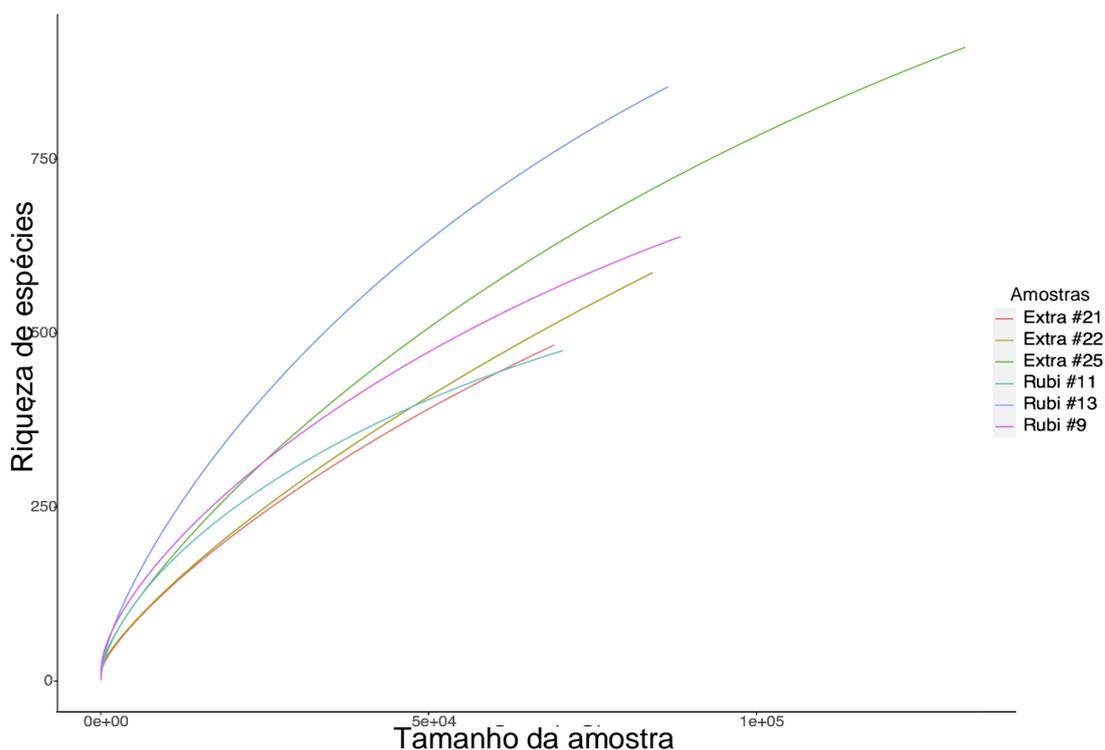


Figura 11. Curvas de rarefação da riqueza de OTUs em função do esforço de sequenciação das comunidades de fungos das amostras de cerveja a um nível de similaridade de 97%.

O número de OTUs corresponde ao número de sequências correspondentes a categorias taxonômicas. O índice Chao1 é um estimador da riqueza de espécies a partir da abundância dos dados, sejam as espécies muito ou pouco abundantes ¹¹¹. O número de OTUs e valores de Chao1 indicou que a riqueza das espécies era globalmente maior no estilo Extra. Os valores dos índices de diversidade foram bastante variáveis entre as diferentes barricas de Rubi. No entanto, em média, também apontam para uma maior diversidade nas comunidades associadas à cerveja Extra. O índice de diversidade Shannon revela o número de espécies que seria expectável encontrar na comunidade, se todas as espécies tivessem a mesma abundância (equitatividade máxima) ¹¹². O índice de Simpson reflete a probabilidade de 2 indivíduos selecionados de uma comunidade pertencerem à mesma espécie ¹¹³. Quanto maior o valor do índice, maior o número de espécies, e conseqüentemente, a diversidade ¹¹². A análise ANOVA mostrou um efeito significativo do estilo de cerveja (Extra ou Rubi) no número de OTUs ($p = 0,0406$), mas não nos índices Chao1 ($p = 0,187$), Shannon ($p = 0,266$) ou Simpson ($p = 0,362$).

Tabela 5. Estimativa da riqueza de espécies e diversidade de comunidades de fungos em barricas de cervejas Extra e Rubi.

Amostra	OTUs ^a	Chao1 ^b	Shannon ^c	Simpson ^d
Extra #21	483	998	2.0	0.80
Extra #22	587	1432	2.3	0.84
Extra #25	911	1407	2.5	0.85
Rubi #11	475	649	1.3	0.48
Rubi #13	854	1279	2.0	0.71
Rubi #9	639	967	2.7	0.88

^a OTUs: Operational Taxonomic Units

^b Chao1: Estimador da riqueza de espécies

^c Índice de biodiversidade de Shannon (>0, quanto maior mais diverso)

^d Índice de diversidade de Simpson (0-1; 0 = mais simples)

Após tratamento do conjunto de dados e análise das sequências, foram identificadas até ao género as 27 OTUs com uma abundância relativa $\geq 1\%$. Apenas 33% destas foram classificadas ao nível de espécie, pelo que análise da composição taxonómica foi realizada ao nível do género (Figura 12). As OTUs com abundância relativa $\geq 1\%$ foram associadas às leveduras *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Pichia*, *Walleimia*, *Zygosaccharomyces* e *Debaromyces* e aos bolores *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (Figura 12).

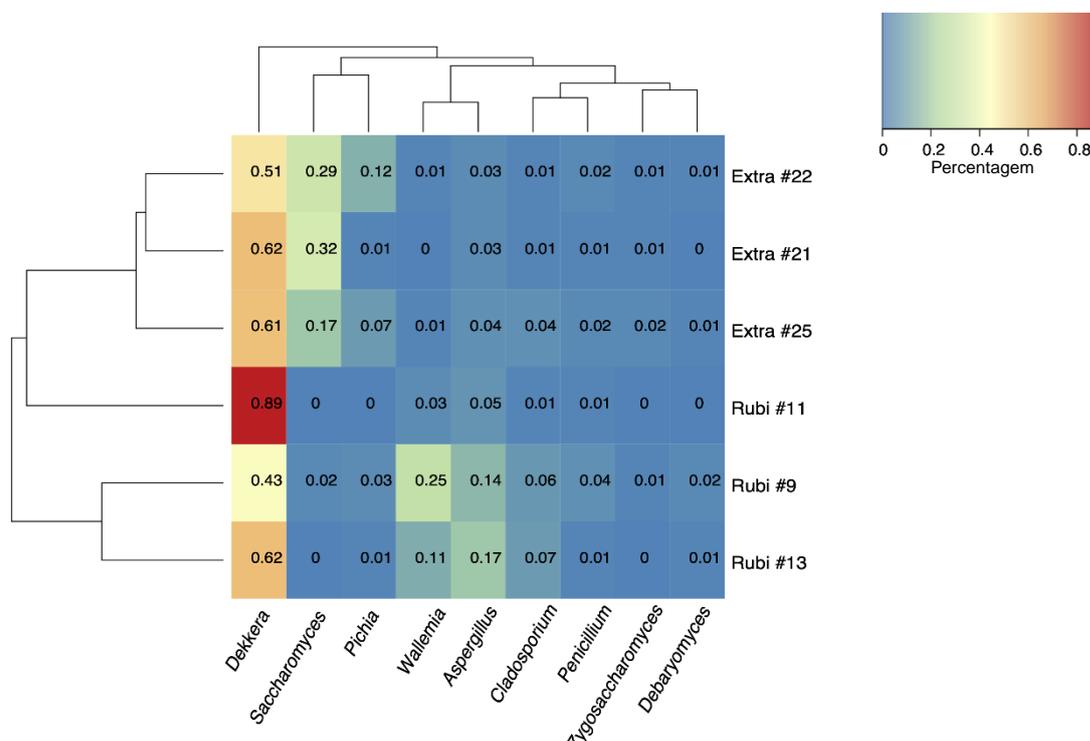


Figura 12. Mapa da composição comunitária fúngica de amostras de cerveja com base na distância Bray-Curtis calculada a partir de abundâncias OTU fundidas ao nível do género.

O Filo *Ascomycota*, representado por *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Pichia*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Zygosaccharomyces*, *Aspergillus* e *Debaromyces* (Anexo III) foi predominante em todas as amostras. Foi ainda detetada a presença de *Wallemia* spp., do Filo *Basidiomycota*. Não foi possível associar espécies a todas as OTUs provavelmente devido à baixa similaridade das sequências obtidas com as sequências de referência na base de dados utilizada (BLAST).

As comunidades de fungos associadas às barricas de cerveja Extra, mostraram-se estruturalmente mais semelhante entre si do que as comunidades associadas às barricas de cerveja Rubi (Figura 12). Como muitas vezes observado na cerveja artesanal fermentada espontaneamente, a comunidade de fungos foi dominada por leveduras não-*Saccharomyces*^{114,115}. *Dekkera* foi o género mais abundante em ambos os estilos de cerveja (Figura 12), sendo representado pelas espécies *D. bruxellensis*, *D. anomala* e *D. custersiana* (Anexo III). A OTU1 *Dekkera bruxellensis* foi predominante (>20%) exceto na Rubi #11. *Dekkera* designa o estado teleomorfo (sexuado) de *Brettanomyces*, que é comum nos frutos, mas considerado um contaminante no vinho, sidra e na cerveja industrial¹¹⁶. A predominância de *Dekkera* na comunidade de leveduras é, no entanto, um traço comum das comunidades microbianas de fungos da cerveja artesanal de tipo “Sour”, envolvidas nas fermentações espontâneas^{115,117}. *Dekkera/Brettanomyces* é predominante nos últimos meses de fermentação⁴⁹. Devido à sua capacidade de produzir ésteres a partir de proteínas e de fermentar a celobiose da madeira, a sua atividade é muito relevante durante a maturação, contribuindo para sabores frutados e para um perfil sensorial do produto final, mais complexo^{116,118}. A comunidade fúngica da barrica Rubi #11 mostrou uma estrutura diferente das comunidades às outras barricas de Rubi (Figura 13), na medida em que apresenta uma grande abundância (73%) da OTU19 *Dekkera custersiana*. Além disso, apresenta uma abundância da OTU1 *Dekkera bruxellensis* mais baixa (6%). Considerando que na barrica 11 foi também registado um teor excepcionalmente elevado de fungos totais, a diferença na estrutura e composição da comunidade em comparação com as outras barricas de Rubi pode indicar um efeito de inoculação a partir de microrganismos associados à bebida anteriormente contida na barrica 11 ou um efeito indireto da transferência de compostos da madeira, durante o tempo de contacto com a cerveja.

A OTU3 *Saccharomyces cerevisiae* foi também muito abundante (15-27%) nas cervejas Extra mas muito pouco representada nas cervejas Rubi, tal como as OTU17 e OTU18, correspondentes a outras estirpes da mesma espécie (Anexo III). Durante os

primeiros meses de fermentação da cerveja *lambic*, as espécies de *Saccharomyces* produzem ácidos gordos, bem como ésteres e álcoois primários, contribuindo para o aroma destas cervejas ⁴⁹. *Pichia* foi encontrada, ainda que com baixa abundância relativa, nos dois tipos de cerveja. A OTU4 *Pichia membranifaciens* foi detetada em todas as amostras, com maior abundância nas barricas 22 e 25 de cerveja Extra. *Pichia* é muito tolerante ao etanol e degrada xilose e a celulose, o que explica a sua frequência no microbioma da cerveja armazenada em barricas ¹¹⁴. Embora minoritário, o género *Zygosaccharomyces*, particularmente a espécie *Z. bisporus* (OTU25), registou maior frequência em cerveja Extra do que em Rubi. *Zygosaccharomyces* é comum em cervejas artesanais ¹¹⁹. Algumas espécies metabolizam maltose e maltotriose durante a fermentação alcoólica e geram sabores frutados muito valorizados ¹²⁰.

Na abordagem dependente de cultivo não tinham sido detetadas colónias de bolores, devido aos microrganismos poderem ter necessitado de mais tempo para crescer nos respetivos meios de cultura. Contudo, as análises independentes de cultivo revelaram a presença de representantes os géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Wallemia*, ainda que com baixa abundância relativa. Observou-se maior abundância relativa de *Cladosporium* e *Wallemia* em cerveja Rubi, particularmente na barrica 9, com frequências de 4% e 20%, respetivamente. *Wallemia* é um bolor pouco comum em cerveja, tendo no entanto sido detetada em vinho de arroz chinês ¹²¹, e em cervejas comerciais ¹²². Os bolores estão presentes nos grãos de cereais ⁶⁶, e estão associados ao desenvolvimento de sabores estranhos e à deterioração de cervejas industriais ¹²². O contacto com a madeira das barricas e com vestígios das bebidas anteriormente contidas, é um dos fatores determinantes do carácter distintivo das cervejas de tipo “Sour” ⁵⁵. Os fungos degradadores de materiais lenhocelulósicos ⁵⁵, como é o caso de *Penicillium*, podem realmente contribuir para a hidrólise e sacarificação de compostos da madeira, aumentando o potencial alcoólico e a claridade da cerveja, além de atribuir características particulares ao sabor final ¹²³.

A análise de escala multidimensional (MDS) consiste na representação de um conjunto de objetos como pontos num espaço multidimensional de forma que os pontos análogos a objetos idênticos estejam próximos uns dos outros, enquanto aqueles correspondentes a objetos diferentes estejam distantes entre si ¹²⁴. As comunidades de fungos com base em Bray-Curtis (Figura 13) permitiu o agrupamento de amostras por estilo de cerveja (Extra e Rubi), indicando diferenças na estrutura e composição das comunidades de fungos associadas a cada estilo. As comunidades de fungos das três

barricas de Extra (21, 22 e 25) agrupam claramente, confirmando a sua maior similaridade comparativamente com as comunidades associadas às barricas de cerveja Rubi (Figura 13), que podem ser explicadas por diferenças na proporção de *Dekkera* e dos bolores *Cladosporium* e *Penicillium* (Figura 12). Tal como já referido para a variabilidade das contagens de microrganismos, o menor teor em álcool da cerveja Rubi não é tão restritivo para o crescimento de microrganismos, podendo haver um potencial maior efeito da inoculação da cerveja com microrganismos presentes na madeira ou nos vestígios das bebidas anteriormente contidas em cada barrica.

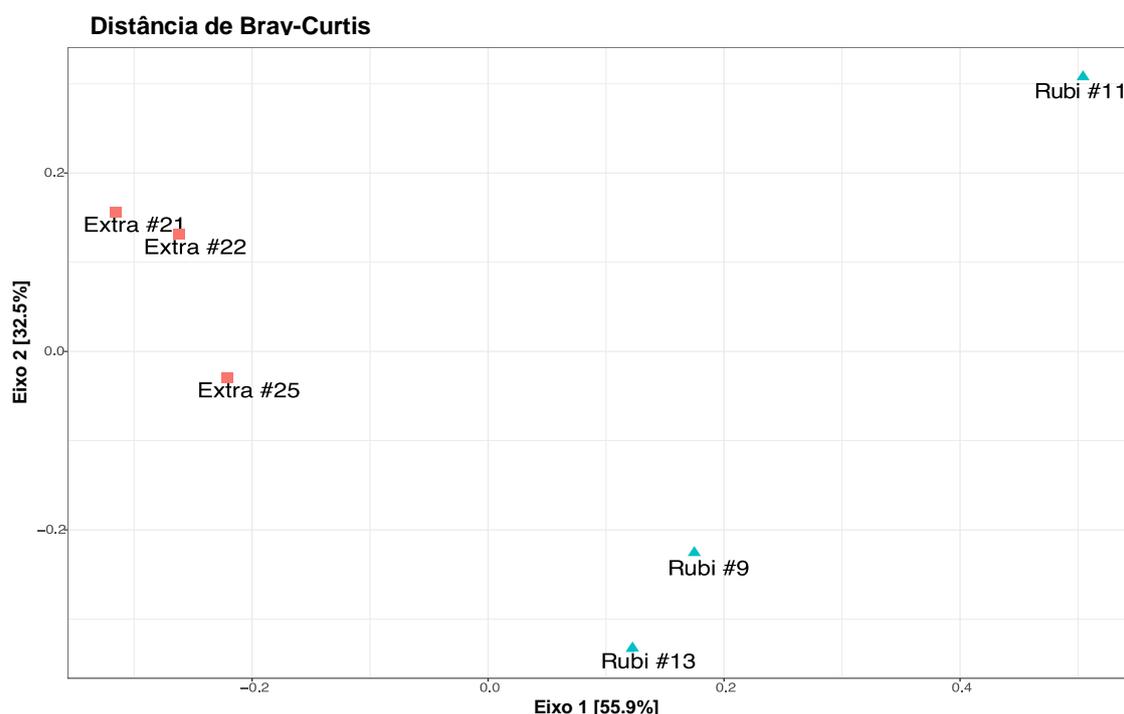


Figura 13. Análise de escala multidimensional baseada na matriz de distância Bray-Curtis em pares das comunidades fúngicas (as duas primeiras coordenadas são mostradas, representando 88,4% da variação total).

Algumas estirpes com frequência $\geq 1\%$ foram encontradas exclusivamente num dos estilos de cerveja, indicando ter um efeito relevante nas características sensoriais distintas. As estirpes exclusivas de Extra pertencem aos géneros *Dekkera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Cladosporium*, e as estirpes exclusivas de Rubi pertencem aos géneros *Dekkera*, *Aspergillus* e *Wallemia* (Anexo III). Ao nível de género, *Zygosaccharomyces* e *Aspergillus* ocorrem como *taxa* específicos dos estilos Extra e de Rubi, respetivamente. Isso pode resultar de uma menor tolerância de *Aspergillus*, exclusivo para Rubi, ao etanol ¹²⁵, ou de uma inoculação com efeito do conteúdo anterior das barricas de Extra (vinho moscatel) com *Zygosaccharomyces* ¹²⁶. Entre as OTUs

comuns estão representados os géneros de leveduras mais comuns em cervejas de tipo “Sour”, *Dekkera*, *Saccharomyces* e *Pichia*, mas também bolores dos géneros *Cladosporium*, *Penicillium* e *Wallemia* (Figura 14).

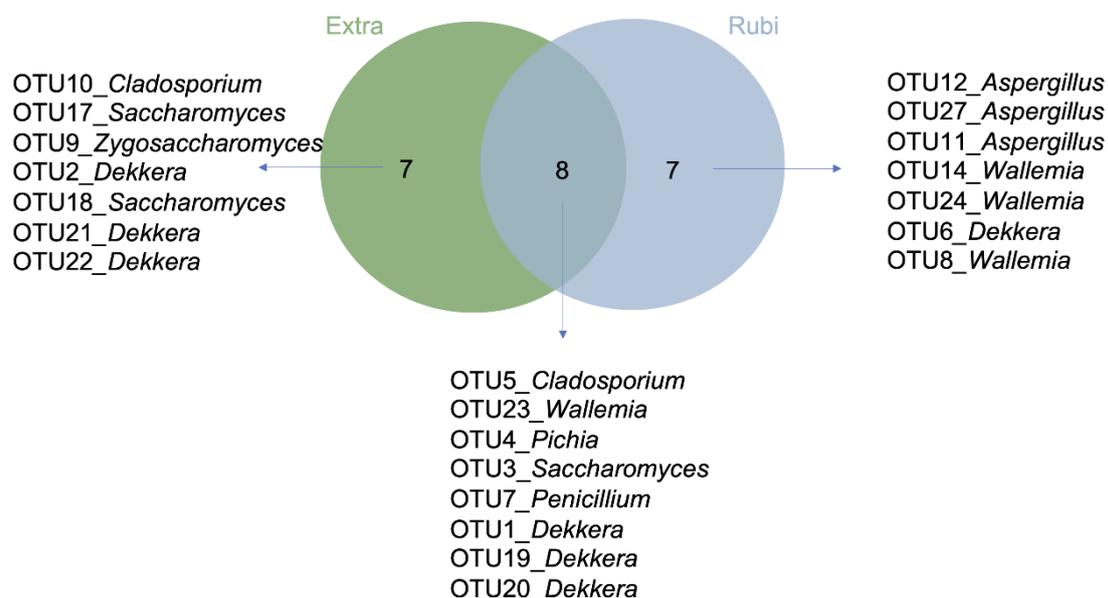


Figura 14. Diagrama de Venn de OTUs fúngico em abundâncias superiores a 1% nos dois tipos de cerveja analisados. Os números indicam quantas OTUs foram partilhadas ou exclusivas nas amostras.

III.3.2. Diversidade e abundância bacteriana

O número de OTUs bacterianas variou de 1046 a 1200 em Extra e de 815 a 845 relativamente aos conjuntos de dados obtidos na cerveja Rubi (Tabela 6).

Tabela 6. Estimativa da riqueza de espécies e diversidade de comunidades de bactérias em barricas de cervejas Extra e Rubi.

Amostra	OTUs ^a	Chao1 ^b	Shannon ^c	Simpson ^d
Extra #21	1046	1984	0.4	0.07
Extra #22	1200	2394	1.3	0.52
Extra #25	1144	2233	1.1	0.33
Rubi #11	815	1497	0.9	0.46
Rubi #13	845	1478	1.0	0.44
Rubi #9	833	1828	1.1	0.53

^a OTUs: Operational Taxonomic Units

^b Chao1: Estimador da riqueza de espécies

^c Índice de biodiversidade de Shannon (>0, quanto maior mais diverso)

^d Índice de diversidade de Simpson (0-1; 0 = mais simples)

As curvas de rarefação mostram uma tendência para a saturação, indicando que o esforço de sequenciação permitiu aceder a uma fração significativa da diversidade bacteriana (Figura 15). O número de OTUs e os índices de riqueza e diversidade, apontam para comunidades bacterianas mais ricas e diversas na cerveja Extra. No entanto, a análise ANOVA não conseguiu demonstrar um efeito significativo do estilo de cerveja (Extra ou Rubi) nos indicadores de riqueza e diversidade da comunidade (ANOVA, $p > 0,05$).

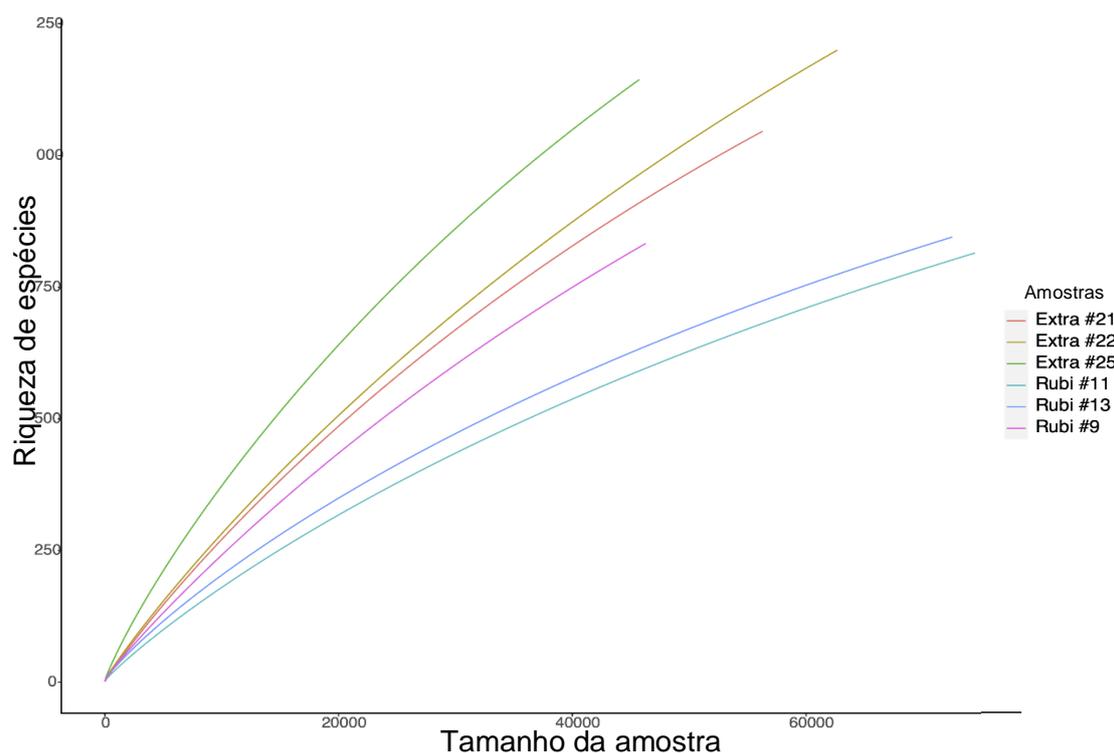


Figura 15. Curvas de rarefação da riqueza de OTUs em função do esforço de sequenciação das comunidades de bactérias das amostras de cerveja a um nível de similaridade de 97%.

Após o tratamento de dados, foram identificados 7 OTUs com uma abundância relativa $\geq 1\%$, tendo sido possível associá-las, a totalidade, aos géneros *Lactobacillus* (*L. acetotolerans*, *L. buchneri*, *L. kimchicus*), *Pediococcus* (*P. damnosus*) e *Acetobacter* (*A. malorum*, *A. pasteurianus*) (Figura 16 e Anexo III). O género *Pediococcus* foi claramente dominante ($>68\%$) particularmente na cerveja Extra (Figura 16).

A OTU1, correspondente à espécie *Pediococcus damnosus*, foi predominante em todas as amostras, nos dois estilos de cerveja (Anexo III). No entanto, ao contrário do que se observou na comunidade de fungos, as comunidades de bactérias mostraram ser mais variáveis entre as barricas de cerveja Extra do que entre as barricas de Rubi. Na barrica

Extra 22 observou-se uma concentração elevada (22%) de *Acetobacter malorum*, pertencente ao grupo das bactérias do ácido acético (AAB), estando esta espécie muito pouco representada ou mesmo ausente das restantes amostras (Anexo III). Como aeróbias estritas, as AAB desenvolvem-se à superfície do líquido aproveitando o ar dentro das barricas ¹²⁷. Esta alteração pode ter resultado de exposição do conteúdo da barrica ao ar, ou contaminação a partir da madeira ou de resíduos da bebida contida anteriormente. A comunidade da barrica Extra 21, pelo contrário, foi totalmente dominada por *Pediococcus*.

Na cerveja Rubi, a composição das comunidades bacterianas foi bastante semelhante nas diferentes barricas. Além de *Pediococcus damnosus*, destaca-se *Lactobacillus acetotolerans*, com uma abundância de pelo menos 20% nas 3 amostras (Anexo III). *Lactobacillus acetotolerans* foi recentemente identificada como uma bactéria de deterioração de cerveja, frequentemente encontrada em cervejarias do sul da China ¹²⁸. À semelhança das bactérias do ácido láctico (LAB), *L. acetotolerans* produz ácido láctico, mas também ácido acético e diacetilo como produtos finais da fermentação. Um teor elevado de diacetilo confere um sabor amanteigado indesejável e uma sensação oleosa no palato ^{128,129}.

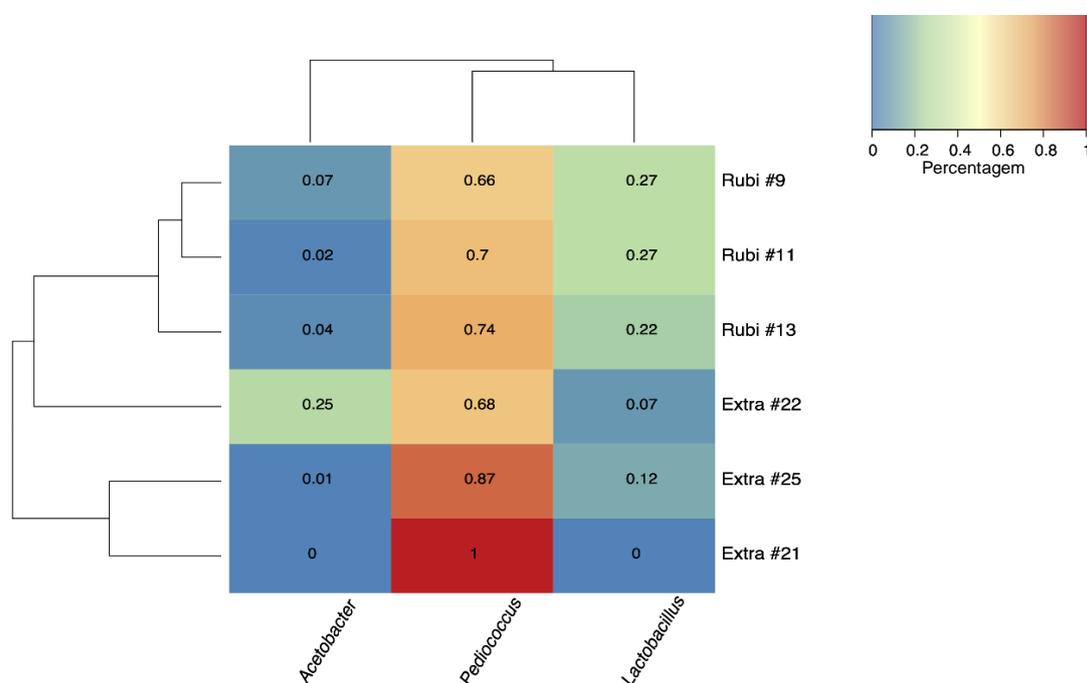


Figura 16. Mapa da composição comunitária bacteriana de amostras de cerveja com base na distância Bray-Curtis calculada a partir de abundâncias OTU fundidas ao nível do Género.

De acordo com as tabelas do Anexo III, *Firmicutes* foi o Filo bacteriano dominante em todas as amostras representadas pelo Género *Lactobacillus* e *Pediococcus*. LAB (*Firmicutes*) e AAB (*Proteobacteria*) são os principais intervenientes na acidificação da cerveja durante o período relativamente longo de armazenamento em barricas de madeira ¹³⁰, e as espécies identificadas nesta análise podem ser consideradas comuns em diferentes cervejas artesanais ácidas ¹²⁷. No entanto, a proporção entre LAB e AAB é crítica pois a produção excessiva de ácido acético e acetato de etilo, gera um sabor desagradável ¹³¹. Enquanto o ácido láctico produzido pelas LAB é considerado macio e apresenta um paladar doce-azedo, o ácido acético produzido pelas AAB tem uma acidez mais intensa, assemelhando-se ao vinagre ⁶⁰.

As LAB aparecem geralmente após quatro meses de fermentação em barricas, durante a fase de acidificação, que se caracteriza por um aumento na concentração de ácido láctico, ácido acético e dos respetivos ésteres ⁵³. Em geral, a contribuição das espécies de *Lactobacillus* é principalmente a produção de ácido láctico, com menor impacto no sabor. No entanto, *L. buchneri* liberta metabolitos que demonstram um efeito positivo nas propriedades sensoriais da cerveja “Sour” ¹³². *P. damnosus* (anteriormente *P. cerevisiae*) é a espécie de *Pediococcus* mais comum em cervejas ácidas, sendo mais tolerante ao lúpulo e ao baixo pH do que *Lactobacilli* ¹³¹, e muito persistente em barricas de madeira ⁵⁵. *Pediococcus* produzem diacetilo, atribuindo um sabor amanteigado indesejável. No entanto, esse efeito é tolerável na cerveja artesanal porque algumas leveduras não-*Saccharomyces* degradam o diacetilo ¹²⁰. As bactérias do ácido acético do género *Acetobacter*, e particularmente a espécie *A. pasteurianus*, também são características de microbiomas de cerveja *lambic* e ácida ¹²⁷. Como organismos aeróbios estritos, eles desenvolvem-se na superfície aproveitando o ar existente dentro das barricas ¹³¹. *A. pasteurianus* ocorre desde os primeiros estágios de maturação em barricas de madeira, mas a abundância relativa aumenta com o tempo de maturação ¹³³. A presença excessiva de AAB pode estar relacionada com a porosidade das barricas, decorrente de maior tempo de uso, que as torna mais permeáveis ao oxigénio e permite o maior desenvolvimento de AAB aeróbias ⁵⁵.

A análise de escala multidimensional (MDS) das comunidades bacterianas baseadas na distância de Bray-Curtis (Figura 17) permitiu o agrupamento das comunidades por estilo de cerveja (Extra e Rubi). Esta análise revelou diferenças significativas dentro de cada estilo e entre estilos diferentes, na composição das comunidades bacterianas. Existem conjuntos definidos, #22-#25 e #11-#13

correspondentes aos estilos Extra e Rubi, respectivamente, indicando comunidades com composição e estrutura tendencialmente definidas e distinta, nos dois estilos de cerveja. No entanto, para cada um dos estilos, uma das barricas apresentou uma comunidade diferente que, considerando que as 3 barricas de cada estilo correspondem ao mesmo lote (cuba), pode indicar um efeito direto da própria barrica no microbioma que terá também efeito na evolução e nas características finais do produto ¹³⁴. Estudos realizados a amostras de cervejas *lambic* maturadas em barricas de carvalho, em que se realizou sequenciação avançada, permitiram concluir que o microbioma identificado na cerveja refletia o microbioma existente nas barricas ¹³⁵.

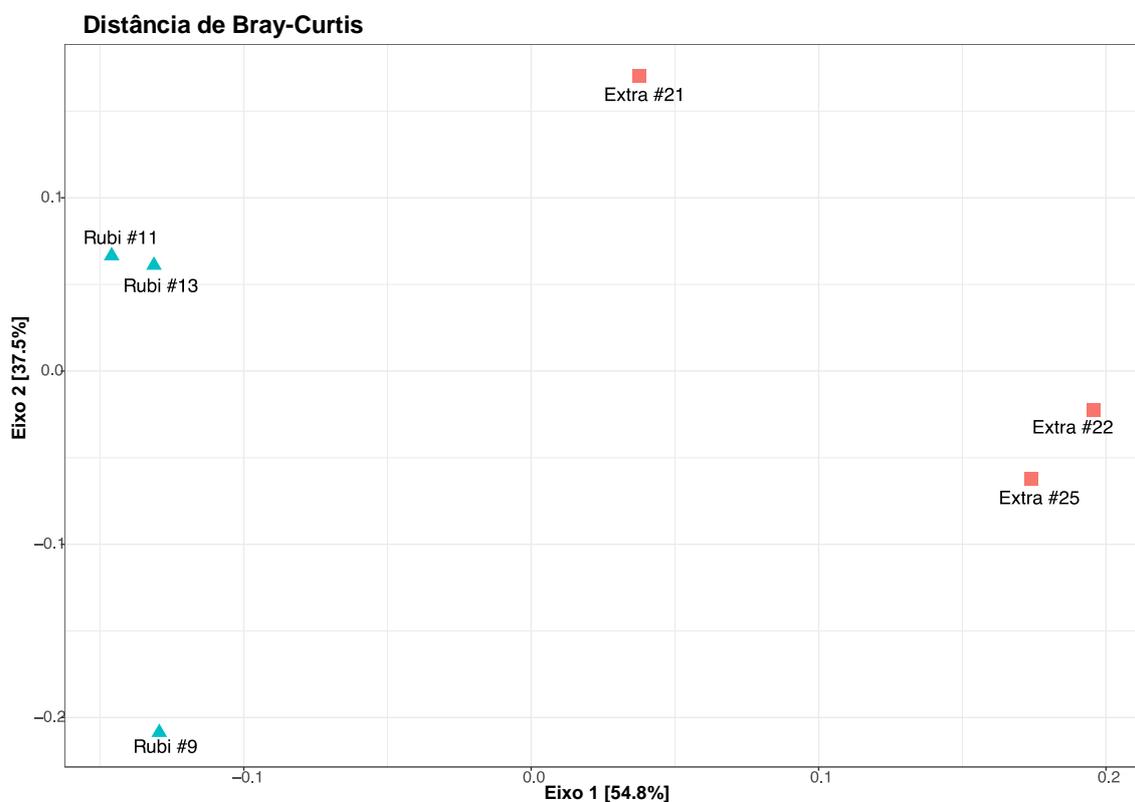


Figura 17. Análise de escala multidimensional baseada na matriz de distância Bray-Curtis em pares das comunidades bacterianas (as duas primeiras coordenadas são mostradas, representando 88,4% da variação total).

O padrão de agrupamento resultante da análise MDS baseada na totalidade de OTUs (Figura 17), é diferente do padrão de similaridade definido com base nas OTUs com frequência $\geq 1\%$ (Figura 16), o que indica que a variação intra-estilo pode estar relacionada com representantes da comunidade minoritários ou raros. As OTUs representadas com mais de 1% de abundância relativa são, na quase totalidade, comuns a

ambos os estilos de cerveja (Figura 18). *Lactobacillus kimchicus* é a única que apenas foi detetada num dos estilos (Rubi).

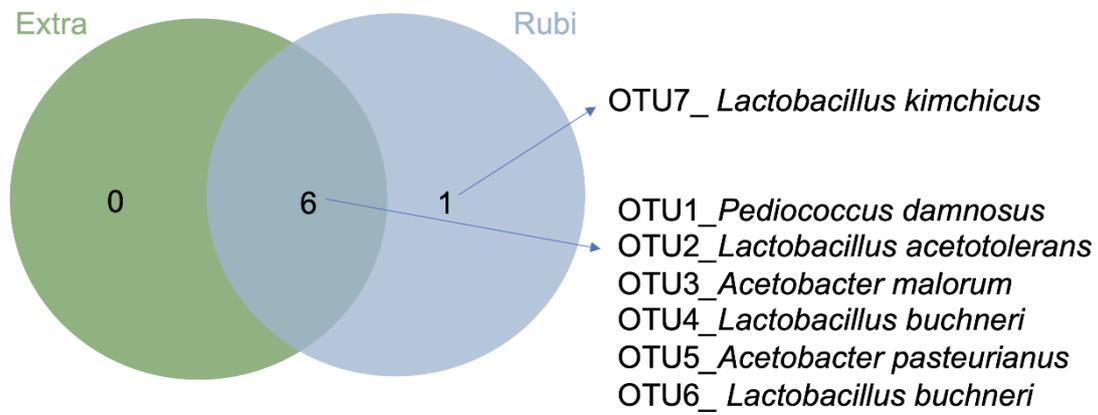


Figura 18. Diagrama de Venn de OTUs bacterianos em abundâncias superiores a 1% nos dois tipos de cerveja analisados. Os números indicam quantas OTUs foram partilhadas ou exclusivas nas amostras.

IV. Conclusão

Este trabalho incidiu sobre cervejas de tipo “Sour”, durante a fase de armazenamento em barricas, e teve como estratégia a caracterização das comunidades microbianas por métodos tradicionais, mas também aplicando os novos métodos de análise molecular de comunidades mistas por sequenciação avançada.

As análises dependentes de cultivo permitiram detetar e quantificar alguns dos grupos de microrganismos característicos da cerveja. No entanto, dada a natureza particular das cervejas “Sour” e o facto de envolverem fermentações espontâneas operadas por diferentes leveduras e bactérias existentes no meio ambiente, a contagem de colónias não tem a resolução suficiente para a identificação dos microrganismos mais relevantes em cada fase de maturação nem para a deteção de particularidades em cada comunidade microbiana que possam ser relacionadas com as características do produto final.

Uma perspetiva integrativa dos resultados fornece algumas pistas para a complexidade organoléptica e diversidade da cerveja artesanal e para a ampla gama de fatores que podem afetar a dinâmica das comunidades microbianas e, em última análise, os traços distintivos de cada estilo particular.

Extra é mais forte em termos de corpo e álcool, apresentando teores microbianos mais estáveis e comunidades fúngicas mais semelhantes, dominadas por *Dekkera*, que pode contribuir para os sabores frutados, característicos das cervejas Doppelbock. Embora minoritárias, as leveduras *Saccharomyces* estão bem representadas nas comunidades de fungos do estilo Extra. A cerveja Rubi, tem um carácter mais leve, em termos de corpo e álcool. Apresentou variação significativa entre barricas, em termos de carga microbiana, conforme descrito pela contagem de colónias, e de composição da comunidade fúngica. *Dekkera* foi ainda dominante, mas *Saccharomyces* apresentou menor abundância relativa do que na cerveja Extra. Por outro lado, os bolores foram relativamente mais abundantes na comunidade fúngica dos barris Rubi e podem contribuir para a clareza do produto final. O contato com as barricas de madeira parece ter um efeito importante na comunidade fúngica, tendo sido identificados grupos com capacidade para degradar celulose e hemicelulose.

As comunidades de bactérias foram dominadas por bactérias lácticas com uma representação significativa de bactérias do ácido acético, como é característico das cervejas ácidas. No entanto, a estrutura das comunidades bacterianas foi mais variável

dentro de cada estilo, indicando que as comunidades bacterianas e fúngicas estão respondendo a fatores de regulação distintos, durante o processo de maturação. A ausência de *Enterobacteriaceae* e a dominância de LAB e *Dekkera* são compatíveis com cervejas em fase adiantada de maturação.

A realização do estágio na empresa Essência D'Alma e o acompanhamento do processo de produção da cerveja foram determinantes na compreensão da importância dos microrganismos, nomeadamente leveduras e LAB, na definição das características distintas de cada tipo de cerveja. Embora tivesse sido inicialmente planeada uma abordagem mais abrangente, e a realização de análises microbiológicas num maior número de amostras e tipos de cerveja, o trabalho presencial teve de ser interrompido em consequência da pandemia de COVID-19. No entanto, foi possível a caracterização e identificação dos principais agentes de fermentação de dois estilos de cerveja, o que representa um elemento inovador do trabalho. Uma vez que o processo de fermentação envolve comunidades autóctones e que estas não tinham sido até ao momento, identificadas, os resultados representam um avanço no conhecimento que a própria empresa passa a deter, sobre o processo de produção artesanal.

Referências bibliográficas

1. Ross, R. P., Morgan, S. & Hill, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* **79**, 3–16 (2002).
2. Kaur, P., Ghoshal, G. & Banerjee, U. C. Traditional bio-preservation in beverages: Fermented beverages. in *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages: Volume 15: The Science of Beverages* 69–113 (Elsevier Inc., 2019).
3. Esslinger, H. M. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets.* (2009).
4. Kunze, W. *Technology: Brewing and Malting.* (VLB Berlin, 2004).
5. Willaert, R. The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation. *Handb. Food Prod. Manuf.* 443–506 (2007).
6. Vaughan, A., O’Sullivan, T. & Van Sinderen, D. Enhancing the microbiological stability of malt and beer - A review. *J. Inst. Brew.* **111**, 355–371 (2005).
7. Kleyn, J. & Hough, J. The Microbiology of Brewing. *Annu. Rev. Microbiol.* **25**, 583–608 (1971).
8. Rodhouse, L. & Carbonero, F. Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **0**, 1–12 (2019).
9. Bamforth, C. W. Progress in Brewing Science and Beer Production. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **8**, 161–176 (2017).
10. Jernigan, D. H. The global alcohol industry: an overview. **104**, 6–12 (2009).
11. The Brewers of Europe. Beer Statistics in 2019 and previous years. *Eur. Beer Trends* 36 (2019).
12. Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S. & Secondi, L. Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. *Food Qual. Prefer.* **41**, 214–224 (2015).
13. Ascher, B. B. Global Beer: the Road To Monopoly. *Am. Antitrust Inst. Bernard Ascher* 1–127 (2012).
14. Mastanjević, K. *et al.* Craft brewing – is it really about the sensory revolution? *Kvas. Prum.* **65**, 13–16 (2019).
15. De Keukeleire, D. Fundamentals of Beer and Hop Chemistry. *Quim. Nova* **23**, 108–112 (2000).
16. Olšovská, J. *et al.* *Humulus Lupulus* L. (Hops) - a Valuable Source of Compounds With Bioactive Effects for Future Therapies. *Mil. Med. Sci. Lett.* **85**, 19–30 (2016).
17. Fillaudeau, L., Blanpain-Avet, P. & Daufin, G. Water, wastewater and waste management in brewing industries. *J. Clean. Prod.* **14**, 463–471 (2006).
18. Eumann, M. & Schildbach, S. 125th anniversary review: Water sources and treatment in brewing. *J. Inst. Brew.* **118**, 12–21 (2012).
19. Hill, A. E. Traditional methods of detection and identification of brewery

- spoilage organisms. in *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* 271–286 (Elsevier Ltd, 2015).
20. Lee, B. H. *Fundamentals of Food Biotechnology*. (Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015, 2015).
 21. Arendt, E. K. & Zannini, E. Barley. in *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries* 155–201 (2013).
 22. Bamforth, C. W. Barley and malt starch in brewing: A general review. *Tech. Q. - Master Brew. Assoc.* **40**, 89–97 (2003).
 23. Jin, Y. L., Speers, A., Paulson, A. T. & Stewart, R. J. Effects of β -glucans and environmental factors on the viscosities of wort and beer. *J. Inst. Brew.* **110**, 104–116 (2004).
 24. Fangel, J. U. *et al.* Tracking polysaccharides through the brewing process. *Carbohydr. Polym.* **196**, 465–473 (2018).
 25. Hrnčič, M. K., Španinger, E., Košir, I. J., Knez, Ž. & Bren, U. Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. *Nutrients* **11**, 1–37 (2019).
 26. Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K. & Becker, T. *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. *J. Inst. Brew.* **120**, 289–314 (2014).
 27. Faria-Oliveira, F., Puga, S. & Ferreira, C. Yeast: World's Finest Chef. *Intech* 13 (2016) doi:<http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
 28. Walker, G. M. & Stewart, G. G. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* **2**, 1–12 (2016).
 29. Bokulich, N. A. & Bamforth, C. W. The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 157–172 (2013).
 30. Monerawela, C. & Bond, U. The hybrid genomes of *Saccharomyces pastorianus*: A current perspective. *Yeast* **35**, 39–50 (2018).
 31. Nevoigt, E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 379–412 (2008).
 32. Speers, A. & Forbes, J. Yeast: An overview. in *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* 3–9 (Elsevier Ltd, 2015).
 33. Keersmaecker, J. De. The Mystery of Lambic Beer. *Sci. Am.* **275**, 74–80 (1996).
 34. Cocolin, L., Campolongo, S., Gorra, R., Rolle, L. & Rantsiou, K. *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity during the brewing process of an artisanal beer: A preliminary study. *J. Inst. Brew.* **117**, 352–358 (2011).
 35. Holbrook, C. J. Brewhouse operations. in *The Craft Brewing Handbook* 65–109 (Elsevier LTD., 2020). doi:10.1016/b978-0-08-102079-1.00003-5.
 36. Buglass, A. J. *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects. Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical*

- and Nutritional Aspects* vols 1–2 (2010).
37. Bamforth, C. W. *Brewing: New Technologies*. Woodhead Publishing Limited (2006).
 38. Boulton, C. A. Fermentation. in *The Craft Brewing Handbook* 111–152 (Elsevier LTD., 2020).
 39. Nghiem, N. P. *et al.* Production of ethanol from winter barley by the EDGE (enhanced dry grind enzymatic) process. *Biotechnol. Biofuels* **3**, 1–10 (2010).
 40. Rachwał, K., Waśko, A., Gustaw, K. & Polak-Berecka, M. Utilization of brewery wastes in food industry. *PeerJ* **8**, 1–28 (2020).
 41. Kappler, S., Krahl, M., Geissinger, C., Becker, T. & Krottenthaler, M. Degradation of iso- α -acids during wort boiling. *J. Inst. Brew.* **116**, 332–338 (2010).
 42. Krogerus, K. & Gibson, B. R. 125th anniversary review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. *J. Inst. Brew.* **119**, 86–97 (2013).
 43. Liu, S. Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. in *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* 355–374 (Elsevier Ltd, 2015).
 44. Humia, B. V. *et al.* Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review. *Molecules* **24**, (2019).
 45. Takahashi, M., Kita, Y., Kusaka, K., Mizuno, A. & Goto-Yamamoto, N. Evaluation of microbial diversity in the pilot-scale beer brewing process by culture-dependent and culture-independent method. *J. Appl. Microbiol.* **118**, 454–469 (2015).
 46. Freeman, G. J. Reducing microbial spoilage of beer using filtration. in *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* 241–251 (Elsevier Ltd, 2015).
 47. Storgårds, E., Tapani, K., Hartwall, P., Saleva, R. & Suihko, M. L. Microbial attachment and biofilm formation in brewery bottling plants. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **64**, 8–15 (2006).
 48. Paternoster, A. *et al.* The performance of beer packaging: Vibration damping and thermal insulation. *Food Packag. Shelf Life* **11**, 91–97 (2017).
 49. Hofmann, R. & Fischer, J. *Beer packaging: Microbiological hazards and considerations*. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* (Elsevier Ltd, 2015).
 50. Panda, H. *Handbook on Small & Medium Scale Industries (Biotechnology Products)*. (Asia Pacific Business Press Inc., 2017).
 51. Lund, M. N., Hoff, S., Berner, T. S., Lametsch, R. & Andersen, M. L. Effect of pasteurization on the protein composition and oxidative stability of beer during storage. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 12362–12370 (2012).
 52. Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H. & Derdelinckx, G. The chemistry of beer aging - A critical review. *Food Chem.* **95**, 357–381 (2006).

53. Spitaels, F. *et al.* The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLoS One* **9**, (2014).
54. Bokulich, N. A., Bamforth, C. W. & Mills, D. A. Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS One* **7**, (2012).
55. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, 1–18 (2019).
56. De Roos, J. & De Vuyst, L. Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *J. Sci. Food Agric.* **99**, 25–38 (2019).
57. Dysvik, A. *et al.* Microbial Dynamics in Traditional and Modern Sour Beer Production. *Appl. Environ. Microbiol.* **86**, (2020).
58. Ciosek, A., Rusiecka, I. & Poreda, A. Sour beer production: impact of pitching sequence of yeast and lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* **126**, 53–58 (2020).
59. Bokulich, N. A., Bergsveinson, J., Ziola, B. & Mills, D. A. Mapping microbial ecosystems and spoilage-gene flow in breweries highlights patterns of contamination and resistance. 1–21 (2015).
60. Bossaert, S., Crauwels, S., Rouck, G. De, Lievens, B. & Service, E. The power of sour – A review: Old traditions, new opportunities. *BrewingScience* **72**, 78–88 (2019).
61. Sakamoto, K. & Konings, W. N. *Beer spoilage bacteria and hop resistance. International Journal of Food Microbiology* vol. 89 (2003).
62. Suzuki, K. 125th anniversary review: Microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *J. Inst. Brew.* **117**, 131–155 (2011).
63. Vriesekoop, F., Krahl, M., Hucker, B. & Menz, G. 125th Anniversary review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *J. Inst. Brew.* **118**, 335–345 (2012).
64. Suzuki, K. Gram-positive spoilage bacteria in brewing. in *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* 141–173 (Elsevier Ltd, 2015).
65. Paradh, A. D. Gram-negative spoilage bacteria in brewing. in *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* vol. 5 175–194 (Elsevier Ltd, 2015).
66. Noots, I., Delcour, J. A. & Michiels, C. W. From field Barley to Malt: Detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Crit. Rev. Microbiol.* **25**, 121–153 (1999).
67. Wolf-Hall, C. E. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 89–94 (2007).
68. Van Der Aa Kühle, A. & Jespersen, L. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *Int. J. Food Microbiol.* **43**, 205–213 (1998).

69. Manzano, M. *et al.* Craft Beer Microflora Identification Before and After a Cleaning Process. **117**, 343–351 (2011).
70. Turvey, M. E., Weiland, F., Keller, E. J. & Hoffmann, P. The changing face of microbial quality control practices in the brewing industry: Introducing mass spectrometry proteomic fingerprinting for microbial identification. *J. Inst. Brew.* 373–387 (2017).
71. Fry, J. C. Culture-Dependent Microbiology. *Microb. Divers. Bioprospecting* 80–87 (2014).
72. Nocker, A., Burr, M. & Camper, A. K. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microb. Ecol.* **54**, 276–289 (2007).
73. Carraro, L. *et al.* Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. *Res. Microbiol.* **162**, 231–239 (2011).
74. Reuter, J. A., Spacek, D. V. & Snyder, M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol. Cell* **58**, 586–597 (2015).
75. Morey, M. *et al.* A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Mol. Genet. Metab.* **110**, 3–24 (2013).
76. Guest, S., Section, E., Al, E. T. & Of, O. Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. **100**, 31–35 (2017).
77. Pettersson, E., Lundeberg, J. & Ahmadian, A. Generations of sequencing technologies. *Genomics* **93**, 105–111 (2009).
78. Mardis, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* **24**, 133–141 (2008).
79. *Plate Count Agar. Biolab Diagnostics Laboratory Inc.* vol. 33 http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU342_SPA.pdf (2015).
80. *Yeast Glucose Chloramphenicol Agar. Liofilchem* (2016).
81. *Rose Bengal Chloramphenicol Agar. Biolab Diagnostics Laboratory Inc.* (2012).
82. *Wallerstein Laboratory Nutrient Agar. Sigma Aldrich* (2018).
83. Ponte, P. *NZY Soil gDNA Isolation kit by NZY Tech Genes & Enzymes.*
84. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.* **173**, 697–703 (1991).
85. Lee Chang, K. J. *et al.* Biodiscovery of new Australian thraustochytrids for production of biodiesel and long-chain omega-3 oils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 2215–2231 (2012).
86. Herlemann, D. P. R. *et al.* Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* **5**, 1571–1579 (2011).
87. Klindworth, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1–11 (2013).

88. Tedersoo, L. *et al.* Global diversity and geography of soil fungi. *Science* (80-.). (2014).
89. Ribosomal, P. & Gene, R. N. A. *16S Metagenomic Sequencing Library*. (2013).
90. Comeau, A. M., Douglas, G. M. & Langille, M. G. I. Microbiome Helper: a Custom and Streamlined Workflow for Microbiome Research. *mSystems* **2**, 1–11 (2017).
91. Schmieder, R. & Edwards, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* **27**, 863–864 (2011).
92. Schubert, M., Lindgreen, S. & Orlando, L. AdapterRemoval v2: Rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC Res. Notes* **9**, 1–7 (2016).
93. Bengtsson-Palme, J. *et al.* Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol. Evol.* **4**, 914–919 (2013).
94. Bolyen, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* (2019).
95. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**, 1–22 (2016).
96. Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. & Knight, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200 (2011).
97. DeSantis, T. Z. *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5069–5072 (2006).
98. Abarenkov, K. *et al.* UNITE QIIME release for Fungi. Version 04.02.2020. *UNITE Community* (2020).
99. Bokulich, N. A. *et al.* Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* **6**, 1–17 (2018).
100. R Core Team. A language and environment for statistical computing. *R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria*. (2014).
101. McMurdie, P. J. & Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* **8**, (2013).
102. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Second Edition*. Springer. Media vol. 35 (2016).
103. Bardou, F. *et al.* Long Noncoding RNA Modulates Alternative Splicing Regulators in Arabidopsis. *Dev. Cell* **30**, 166–176 (2014).
104. Considine, J. A. & Frankish, E. Essential Analyses. in *A Complete Guide to Quality in Small-Scale Wine Making* 137–154 (2014).

105. Perestrelo, R., Silva, C., Pereira, J. & Câmara, J. S. Wines: Madeira, Port and Sherry Fortified Wines - The Sui Generis and Notable Peculiarities. Major Differences and Chemical Patterns. in *Encyclopedia of Food and Health* 534–555 (2015).
106. Wyler, P., Angeloni, L. H. P., Alcarde, A. R. & Cruz, S. H. Effect of oak wood on the quality of beer. *Inst. Brew. Distill.* **121**, 62–69 (2015).
107. Aşkun, T., Eltem, R. & Taşkin, E. Comparison of Rose-Bengal Chloramphenicol Agar and Dichloran Glycerol Agar (DG18) for Enumeration and Isolation of Moulds from Raisins. *J. Appl. Biol. Sci.* **1**, 71–75 (2007).
108. Pacin, A. M. *et al.* Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. *Mycopathologia* **156**, 87–92 (2003).
109. Loureiro, V. & Malfeito-Ferreira, M. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 23–50 (2003).
110. López, M. G., Roche, E. & Rodríguez, E. Contaminant microbiota in craft beers. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **9**, 1181–1186 (2020).
111. Reese, A. T. & Dunn, R. R. Drivers of Microbiome Biodiversity: A Review of General Rules, Feces, and Ignorance. *Am. Soc. Microbiol.* **9**, 1–14 (2018).
112. Magurran, A. E. Diversity Indices and Species Abundance Models. in *Ecological Diversity and Its Measurement* (Springer, 1988).
113. Brower, J. E. & Zarr, J. H. *Field and Laboratory Methods of General Ecology*. W. C. Brown Publishers (1984).
114. Eecke, H. Ver, Lambert, J., Fetter, L., Stout, G. & Spindler, M. Purposeful *Pichia* pitching: Analyzing beer deliberately fermented with *Pichia*, a yeast genus that may be unknowingly prevalent in barrel-aged beer. in *2017 SIMB Annual Meeting and Exhibition* (2017).
115. Shayevitz, A., Harrison, K. & Curtin, C. D. The Science of Beer Barrel-Induced Variation in the Microbiome and Mycobiome of Aged Sour Ale and Imperial Porter Beer Barrel-Induced Variation in the Microbiome and Mycobiome of Aged Sour Ale. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1–8 (2020).
116. Kochláňová, T. Non-*Saccharomyces* Yeasts and Their Importance in the Brewing Industry. *Kvas. Prum.* **62**, 198–205 (2016).
117. Tyakht, A. *et al.* Characteristics of bacterial and yeast microbiomes in spontaneous and mixed-fermentation beer and cider. *Food Microbiol.* **94**, 1–12 (2021).
118. Basso, R. F. & Alcarde, A. R. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Res. Int.* (2016).
119. Michel, M. *et al.* Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Inst. Brew. Distill. Publ.* (2016).
120. Methner, Y., Hutzler, M., Matoulkov, D., Jacob, F. & Michel, M. Screening for the Brewing Ability of Different Non-*Saccharomyces* Yeasts. *Fermentation* **5**, 1–23 (2019).

121. Wang, C., Tang, J. & Qiu, S. Profiling of Fungal Diversity and Fermentative Yeasts in Traditional Chinese Xiaoqu. **11**, 1–11 (2020).
122. Sobel, J., Henry, L., Rotman, N. & Rando, G. BeerDeCoded: the open beer metagenome project [version 2; peer review: 2 approved, 1 approved with reservations]. *F1000 Res.* 1–20 (2019).
123. Nigam, D., Asthana, M. & Kumar, A. *Penicillium*: A Fungus in the Wine and Beer Industries. in *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* 187–200 (Elsevier B.V., 2018).
124. Zhang, Z. & Takane, Y. Multidimensional Scaling. in *International Encyclopedia of Education* 304–311 (2010).
125. Ma, L. *et al.* Modulation of Fatty Acid Composition of *Aspergillus oryzae* in Response to Ethanol Stress. (2019).
126. Berber, N., Aissaoui, R., Bekada, A. M. A. & Coarer, M. Isolation and Molecular Identification (PCR-Delta and PCR-RFLP-ITS) of the yeast from Black muscat grape cultivated in El malah (Wilaya of Ain Temouchent, Algeria). *Adv. Environ. Biol.* **10**, 55–61 (2016).
127. Bossaert, S. *et al.* Description of the temporal dynamics in microbial community composition and beer chemistry in sour beer production via barrel ageing of finished beers. *Int. J. Food Microbiol.* **339**, (2020).
128. Deng, Y. *et al.* An improved plate culture procedure for the rapid detection of beer-spoilage lactic acid bacteria. *Inst. Brew. Distill.* **120**, 127–132 (2018).
129. Liu, J. *et al.* Draft genome sequence and annotation of *Lactobacillus acetotolerans* BM-LA14527, a beer-spoilage bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, 1–5 (2016).
130. Tenhovirta, S. The effects of Lactic Acid Bacteria species on properties of Sour beer. (2019).
131. Bossaert, S., Crauwels, S., De Rouck, G. & Lievens, B. The power of sour – A review: Old traditions , new opportunities. 1–27 (2019).
132. Dysvik, A. *et al.* Pre-fermentation with lactic acid bacteria in sour beer production. *Inst. Brew. Distill.* **125**, 342–356 (2019).
133. Roos, J. De, Verce, M., Aerts, M., Vandamme, P. & De Vuyst, L. Temporal and Spatial Distribution of the Acetic Acid Bacterium Communities throughout the Wooden Casks Used for the Fermentation and Maturation of Lambic Beer. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, 1–15 (2018).
134. Shayevitz, A. M. Do Oak Barrels Contribute To The Variability of The Microbiome of Barrel-Aged Beers? (Oregon State University, 2018).
135. Snauwaert, I. *et al.* Microbial diversity and metabolite composition of Belgian red-brown acidic ales. *Int. J. Food Microbiol.* **221**, 1–11 (2016).

Anexos

Anexo I – Informações gerais sobre os produtos criados e comercializados pela Essência D’Alma

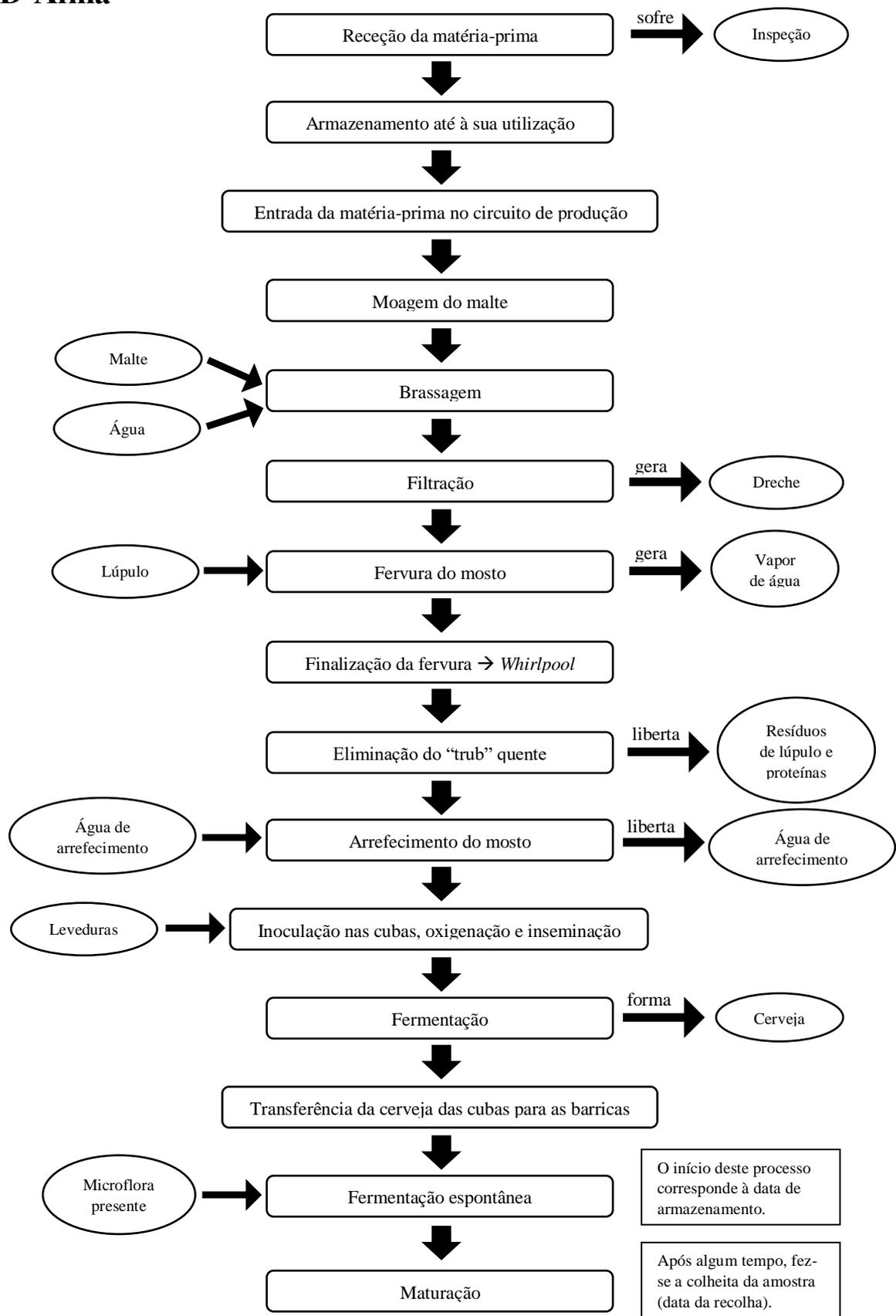
Gama Original						
Cerveja	Tipo	Estilo	% Álcool	PLATO *	IBU *	Características (aroma, amargor, cor, sabor)
Loira	<i>Lager</i>	<i>German Pilsner</i>	4,5	12,1°	25	Aroma intenso a malte; amargor médio; cor dourada clara e límpida; sabor a cereais
Rubi	<i>Lager</i>	<i>Märzen</i>	6,3	12,1°	22	Aroma com notas de caramelo; espuma clara; sabor a cereais e caramelo; travo final a lúpulo
Trigo	<i>Ale</i>	<i>Wheat Beer</i>	5,2	12,8°	14	Aroma com notas de banana e cravinho; cor ligeiramente dourada; turbidez pronunciada
Preta	<i>Lager</i>	<i>Dark Lager</i>	4,9	12,4°	23	Notas de café e malte torrado; espuma clara; sabor a malte; travo amargo final pronunciado
Gama Harmonização						
Orgânica	<i>Ale</i>	<i>American Pale Ale (APA)</i>	5,1	11,5°	33	Aroma frutado de citrinos e maracujá; amargor pronunciado; corpo leve e macio
Thartaruga	<i>Ale</i>	<i>Indian Pale Ale (IPA)</i>	6,7	15,5°	38	Aroma intenso a frutas tropicais; amargor pronunciado; corpo intenso
Extra	<i>Lager</i>	<i>Doppelbock</i>	8,0	18,7°	25	Notas de malte e caramelo; corpo pronunciado; presença quase imperceptível de lúpulo
Nautika	<i>Lager</i>	<i>Baltic Porter</i>	7,0	21,5°	37,7	Notas de caramelo, chocolate e café; amargor moderado; espuma espessa; cor bronzeada
Ginja	<i>Lager</i>	<i>Fruited Beer</i>	6,5	15,4°	25	Aroma a ginja e frutos vermelhos; sabor suave e ligeiramente adocicado

Sidras					
Sidra	Estilo	% Álcool	Notas de prova		
Maçã	<i>Hard Dry Cider</i>	5,9	Contém a doçura natural da maçã, equilibrada com a frescura da sua acidez.		
Pêra	<i>Hard Dry Cider</i>	5,9	Contém a doçura natural da pêra, equilibrada com a frescura da sua acidez.		
Especial, sem álcool					
Cerveja	Tipo	% Álcool	Notas de prova		
Vadia 100 Maracujá	<i>Lager</i>	< 0,5	Aroma a maracujá e a lúpulo. Paladar combina a doçura do malte com a acidez da fruta.		
Edições limitadas					
Cerveja	Estilo	% Álcool	PLATO *	IBU *	Características
Oak Aged Doppelbock	<i>Sour</i>	8,0	18,7°	23	Contêm ingredientes diferenciadores como especiarias e frutos, e sofrem envelhecimento e maturação em barricas de carvalho.
Portuguese Grape Lager	<i>Portuguese Grape Lager</i>	7,9	20,8°	34	
Ginja Oak Aged Sour	<i>Fruited Sour</i>	6,9	15,6°	14	

* PLATO: Unidade de medida que indica a concentração da massa da solução composta por sacarose.

* IBU (do inglês, *International Bitterness Unit*): Unidade que indica o amargor da cerveja. Por exemplo, um valor de IBU mais elevado traduz-se numa cerveja mais amarga.

Anexo II – Processo de produção de cerveja *Sour* na Essência D’Alma



Anexo III – Tabelas com as OTUs e os níveis taxonômicos

1. Abundância relativa de cada OTU fúngica sequenciada.

	Extra #21	Extra #22	Extra #25	Rubi #11	Rubi #13	Rubi #9
otu1	0.2665366226	0,229586	0.3007937097	0.0646398531	0,5305734	0.2408882013
otu2	0.2141327623	0,1468242	0.1689192196	0.0034356119	0,000120043	0.0060669488
otu3	0.2765685958	0,2591986	0.1559379868	0.0028728824	0,001170415	0.0209764754
otu4	0.0087559767	0,1178605	0.0673540539	0.0036133160	0,007487658	0.0260272103
otu5	0.0045759878	0,007108201	0.0233810548	0.0082632390	0,06419279	0.0592589222
otu6	0,0000000000	0,0000589892	0.0009939915	0.0968783320	0,000825293	0.1022432543
otu7	0.0111173037	0,01632527	0.0165269639	0.0068712238	0,007337605	0.0361286800
otu8	0.0021266610	0,005250041	0.0095245160	0.0242714133	0,08953679	0.1975550196
otu9	0.0021999941	0,01027887	0.0207996439	0.0004590688	0,000645229	0.0079173682
otu10	0.0022733273	0,003731068	0.0153401083	0.0006811989	0,002715964	0.0052175760
otu11	0.0028306591	0,00115029	0.0018099548	0.0030802038	0,01527542	0.0112541900
otu12	0.0012613300	0,000811102	0.0021956828	0.0013179718	0,004981769	0.0153493804
otu13	0.0006159984	0,001120795	0.0024478896	0.0013623978	0,005401918	0.0079022008
otu14	0.0005279986	0,000412925	0.0018841332	0.0023990049	0,01197425	0.0253901806
otu15	0.0002053328	0,000309693	0.0001483569	0.0005775382	0,003991417	0.0053995844
otu16	0.0002786659	0,000412925	0.0005192493	0.0030505864	0,007757754	0.0040951904
otu17	0.0156052917	0,01296288	0.0071953119	0.0001332780	0,0000300107	0.0010162139
otu18	0.0243466017	0,01822767	0.0115124991	0.0001332780	0,000240085	0.0010768834
otu19	0.0312545833	0,0610391	0.0597581782	0.7270761758	0,08565041	0.0699519194
otu20	0.0223372738	0,02999602	0.0323566501	0.0398797536	0,1344927	0.0923692952
otu21	0.0826024464	0,05030306	0.0604109487	0.0013031631	0,0000150053	0.0016077414
otu22	0.0234226042	0,0155879	0.0204287516	0.0003109821	0	0.0002881801
otu23	0.0016426623	0,005058326	0.0135894963	0.0034208032	0,01173417	0.0152280414
otu24	0.0001613329	0,000737365	0.0017061049	0.0026211349	0,01005357	0.0264670641
otu25	0.0037986565	0,003893289	0.0041243231	0.0002221301	0,000765272	0.0003488496
otu26	0.0008213311	0,001740182	0.0001631926	0.0003850255	0,002175772	0.0082055482
otu27	0.0000000000	0,0000147473	0.0001780283	0.0007404336	0,000855304	0.0117698806

2. Afiliação taxonômica ao nível de Filo, Classe, Ordem, Família, Género e Espécie para todas as OTUs fúngicas encontradas, com uma ocorrência superior a 1% nas amostras.

	Filo	Classe	Ordem	Família	Género	Espécie
otu1	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Pichiaceae</i>	<i>Dekkera</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
otu2	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Pichiaceae</i>	<i>Dekkera</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
otu3	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae*</i>
otu4	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Pichiaceae</i>	<i>Pichia</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
otu5	<i>Ascomycota</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Cladosporiaceae</i>	<i>Cladosporium</i>	NI
otu6	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Pichiaceae</i>	<i>Dekkera</i>	<i>Dekkera anomala</i>
otu7	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>	NI
otu8	<i>Basidiomycota</i>	<i>Wallemiomycetes</i>	<i>Wallemiales</i>	<i>Wallemiaceae</i>	<i>Wallemia</i>	NI
otu9	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>	NI
otu10	<i>Ascomycota</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Cladosporiaceae</i>	<i>Cladosporium</i>	NI
otu11	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	NI
otu12	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	NI
otu13	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>	NI
otu14	<i>Basidiomycota</i>	<i>Wallemiomycetes</i>	<i>Wallemiales</i>	<i>Wallemiaceae</i>	<i>Wallemia</i>	NI
otu15	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	NI
otu16	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	NI
otu17	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae*</i>
otu18	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae*</i>
otu19	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Pichiaceae</i>	<i>Dekkera</i>	<i>Dekkera custersiana</i>
otu20	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	NI
otu21	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Pichiaceae</i>	<i>Dekkera</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
otu22	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Pichiaceae</i>	<i>Dekkera</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
otu23	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Debaryomycetaceae</i>	<i>Debaryomyces</i>	NI
otu24	<i>Basidiomycota</i>	<i>Wallemiomycetes</i>	<i>Wallemiales</i>	<i>Wallemiaceae</i>	<i>Wallemia</i>	NI
otu25	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
otu26	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Pichiaceae</i>	<i>Dekkera</i>	<i>Dekkera custersiana</i>
otu27	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	NI

NI – Não Identificado

* – Identificados por blast against database: refseq_rna

3. Abundância relativa de cada OTU bacteriana sequenciada.

	Extra #21	Extra #22	Extra #25	Rubi #11	Rubi #13	Rubi #9
otu1	0,9960978	0,6800858585	0,8666140306	0,7028573	0,74433969	0,6576822
otu2	0,0003651217	0,0001141735	0,0003251051	0,2727397	0,20101851	0,2699454
otu3	0,003103535	0,2151485397	0,0130506467	0,02351440	0,03590026	0,06895444
otu4	0,0002282011	0,0530678419	0,0939553677	0,0007291287	0,00000000	0,002775611
otu5	0,00009128044	0,0384536341	0,0009753152	0,00006835581	0,00470259	0,00006881681
otu6	0,0001141005	0,0131299523	0,0250795346	0,00009114109	0,00000000	0,0005734734
otu7	0,0000000000	0,0000000000	0,0000000000	0,0000000000	0,01403895	0,0000000000

d) Afiliação taxonômica ao nível de Filo, Classe, Ordem, Família, Género e Espécie para todas as OTUs bacterianas encontradas, com uma ocorrência superior a 1% nas amostras.

	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Género	Espécie
otu1	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>
otu2	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acetotolerans</i> *
otu3	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Acetobacterales</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter malorum</i> *
otu4	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
otu5	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Acetobacterales</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
otu6	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
otu7	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus kimchicus</i> *

* – Identificados por blast against database: refseq_rna

Anexo IV – Manuscrito para publicação

Comparative analysis of microbial communities of two sour beers

João Costa², Isabel N. Sierra-Garcia¹, Angela Cunha^{1*}

¹CESAM and Department of Biology, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

²Department of Chemistry, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

*corresponding author: acunha@ua.pt

Angela Cunha ORCID: 0000-0002-9118-3521

Isabel Sierra-Garcia ORCID: 0000-0001-6373-2901

Running title

Sour beer microbiomes

Keywords

Acetic acid bacteria, brewing yeasts, craft beer, Illumina, lactic acid bacteria, microbiome

Abstract

The manufacturing process of craft beer involves a wide variety of spontaneous microorganisms that contribute to the distinctive characteristics of each style. The objective of this work was the characterization of microbiomes of Doppelbock and Märzen lagers, maturing in wooden barrels, in order to understand the interacting relations between the microbiota and beer traits.

Microbial load was assessed by colony-counts and the bacterial and fungal microbiomes were analyzed by Illumina sequencing of 16S rRNA genes of prokaryotes and the ITS 2 spacer of fungi (eukaryotes). Fungal communities were dominated by the yeast *Dekkera*, while the bacterial communities were dominated by lactic acid (*Lactobacillus* and *Pediococcus*) and acetic acid (*Acetobacter*) bacteria, pointing to a late maturation stage. The Doppelbock barrels presented more rich and diverse fungal communities. The Märzen barrels were more variable in terms of structure and composition of fungal and bacterial communities, with occurrence of exclusive taxa of fungi (*Aspergillus* sp.) and bacteria (*L. kimchicus*).

The composition of the microbiomes indicates that the wood barrels used for the maturation represent a relevant driver of the composition of the microbiota and that minority bacterial taxa, differently represented in the microbiome of each barrel, may underlie the variability between barrels and ultimately, the distinctive traits of each style.

1. Introduction

Beer is a drink that results from the activity of selected yeasts on a wort, typically prepared from malted barley and water, to which hops are added to provide a bitter-floral taste (De Keukeleire 2000). Depending on the fermenting processes and on sensory traits, beers are categorized as ales, produced by “high” fermentation, or lagers, produced by “low” fermentation (Salanță et al. 2020). In ales, the fermentation occurs at a higher temperature and is carried out by *Saccharomyces cerevisiae* that tends to concentrate on the surface of the vessel (Bokulich et al. 2012). The fermentation of lagers is usually carried out by *Saccharomyces pastorianus*, which results from a genetic hybridization between *S. cerevisiae* and *S. eubayanus* (Monerawela and Bond 2018; Nevoigt 2008). In

this case, the fermentation process takes place at low temperatures and the yeasts deposit in the bottom of the vat (Bokulich and Bamforth 2013; Walker and Stewart 2016).

Lambic beers differ from ales and lagers, since the fermentation process occurs spontaneously, involving mainly strains of autochthonous yeasts (Spitaels et al. 2014; Walker and Stewart 2016). However, in some beers of this style, pure starter cultures of *Brettanomyces bruxellensis* (teleomorph *Dekkera bruxellensis*) are used (Walker and Stewart 2016). Craft breweries preserved this traditional practice and given the growing interest of consumers in the uniqueness of organoleptic characteristics, of craft beers (Aquilani et al. 2015), new malts, hops and additives have been exploited to achieve rich and complex flavours and aromas, that can include coffee notes, fruits, flowers and spices (Mastanjević et al. 2019).

Sour beers represent a category of beer that is intentionally allowed to develop an acidic or slightly sour taste during a long period of maturation (Bossaert et al. 2019). To speed up the acidification process, the beer is transferred from the brewing vessels to oak wooden barrels where a succession of microorganisms will progressively define the chemical and sensorial profile of the final product (Dysvik et al. 2020). There are four stages in the fermentative process of sour beer, to which different groups of microorganisms are associated (Rodhouse and Carbonero 2019). The initial phase, designated as *Enterobacteriaceae*, corresponds approximately to the first two months of maturation, during which *Enterobacteriaceae* bacteria decline, while small amounts of alcohol are formed and the pH drops due to the production of low concentrations of organic acids, such as acetic, lactic and formic acid (Bossaert et al. 2020). The first fermentative yeast to appear is *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), usually two weeks after boiling the wort, still in the *Enterobacteriaceae* phase (Bossaert et al. 2020). Yeasts of the genus *Saccharomyces* carry out the main fermentation in the following months,

corresponding to the fermentative phase (Rodhouse and Carbonero 2019). The acidification phase is characterized by the activity of lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria (AAB) and the increase in the concentration of lactic acid, acetic acid and the corresponding esters. It occurs after about 4 months of maturation and corresponds to a marked decrease in pH, with consequent inactivation of *Saccharomyces* (Spitaels et al. 2014). In the final stage of fermentation, *Brettanomyces* spp. become dominant, playing a major role in the development of characteristic flavors and aromas (Bossaert et al. 2019). Although lambic beers host a diverse microbiome in the early stages of fermentation, diversity and quantity of microorganisms reach stability in mature sour beer (Spitaels et al. 2014).

For the maturation, barrels that had previously contained other drinks are usually preferred (Spitaels et al. 2014). The contact provided by wood with the new drinks allows the extraction of various compounds, such as phenolics and tannins, involved in the formation of multiple flavors, during maturation. The barrels are normally reused in spontaneous lambic brewing processes, representing also a seedbank of microorganisms that will contribute to the development of complex microbiomes during maturation and to the development of the particular traits of lambic sour beer styles (De Roos et al. 2019).

The growing demand for craft beer has been motivating research on the microbiomes of lambic sour beer. A deeper understanding of the relations between microorganisms and organoleptic traits is critical for the control of the brewing processes and for the selection of the most adequate strains for pitching (Ciosek et al. 2020).

The objective of this work was to characterize the microbial communities of two craft sour beer styles, in order to understand how the development of distinctive traits during maturation in barrels can be related with the presence and relative abundance of particular fungal and bacterial taxa.

2. Materials and methods

Sampling

For this study, 2 sour beer styles manufactured by the craft brewery Essência D'Alma (Ossela, Portugal) were selected, which owns the Vadia brand. According to information of the brewery (<https://www.cervejavadia.pt/pt/gamas/#gamas>), Extra is a Doppelbock Lager (8%) and Rubi is a Märzen Lager (6.3%).

At the moment of sampling, both styles had been fermenting in oak wooden barrels (225 L) for approximately 7 months. Samples were aseptically collected with a syringe, from 3 barrels of the same lot of Extra (barrels #21, #22 and #25) and Rubi (barrels #9, #11 and #13), transferred to sterile glass bottles and kept at 4 °C until processing.

Fermentation parameters

In order to characterize the degree of maturation of the beer lots, pH, brix and potential alcohol were determined at the moment of sampling from the barrels. pH was measured with a potentiometer (Hanna edge™ Tablet pH Meter Kit). Brix level and alcohol potential were estimated with an electronic refractometer (HI96800 Digital Refractometer).

Quantification of bacteria and fungi

A culture-dependent analysis was used to determine the concentration of bacteria and fungi. Samples were serially diluted in Ringer solution (Merck) and plated in solid media. For the determination of total aerobic mesophilic bacteria, triplicate 1-mL aliquots were pour-plated in Plate Count Agar (BioLab, Hungary). Total fungi and brewing yeasts were quantified by spread-plating 5 replicates of 0.2 mL aliquots on Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Liofilchem, Italy) and WLN Agar (Merck, USA), respectively.

Cultures were incubated at 25 °C for 5 days. The final concentration was calculated as the average colony counts in the plates of the most suitable dilutions, corrected for the aliquot size and dilution factor. Results were expressed as colony forming units per mL (CFU mL⁻¹).

DNA extraction and sequencing

Cells corresponding to a total volume of 250 mL of beer were concentrated by successive centrifugations of 50-mL aliquots, at 13,000 g, for 15 min (Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16). The supernatant was discarded and the pellet was used for DNA extraction with the NZY Soil gDNA Isolation Kit (NZytech), according to the manufacturer's protocol.

Analysis of bacterial and fungal diversity was based on Illumina sequencing of the hypervariable region V3-V4 of the 16S rRNA genes of prokaryotes and the ITS 2 region between the 5.8S and 28S rRNA genes of fungi (eukaryotes). The DNA was amplified for the hypervariable regions with specific primers and further re-amplified in a limited-cycle PCR reaction to add sequencing adapters and dual indexes. First PCR reactions were performed for each sample using KAPA HiFi HotStart PCR Kit according to manufacturer suggestions and 0.3 µM of PCR primers and 12.5 ng of template DNA in a total volume of 25 µL. The forward primer Bakt_341F 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' and the reverse primer Bakt_805R 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' were used for prokaryotes (Herlemann et al. 2011; Klindworth et al. 2013) and a pool of forward primers ITS3NGS1_F 5'-CATCGATGAAGAACGCAG-3', ITS3NGS2_F 5'-CAACGATGAAGAACGCAG-3', ITS3NGS3_F 5'-CACCGATGAAGAACGCAG-3', ITS3NGS4_F 5'-CATCGATGAAGAACGTAG-3', ITS3NGS5_F 5'-CATCGATGAAGAACGTGG-3', and ITS3NGS10_F 5'-

CATCGATGAAGAACGCTG-3' and reverse primer ITS4NGS001_R 5'-TCCTSCGCTTATTGATATGC-3' was used for fungi (Tedersoo et al. 2014). The PCR conditions involved a 3 min denaturation at 95 °C, followed by 25 cycles of 98 °C for 20 s, 55 °C (bacterial region)/60 °C (fungal region) for 30 s and 72 °C for 30 s and a final extension at 72 °C for 5 min. Second PCR reactions added indexes and sequencing adapters to both ends of the amplified target region according to manufacturer's recommendations (Illumina, 2013). Negative PCR controls were included for all amplification procedures. PCR products were one-step purified and normalized using SequalPrep 96-well plate kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) (Comeau et al. 2017) pooled and pair-end sequenced at Genoinseq (Cantanhede, Portugal) in the Illumina MiSeq® sequencer with the V3 chemistry, following the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, USA).

Processing of sequencing data and statistical analyses

Raw reads were extracted from Illumina MiSeq® System in fastq format and quality-filtered with PRINSEQ version 0.20.4 (Schmieder and Edwards 2011) to remove sequencing adapters, reads with less than 100 bases for samples targeting ITS region and 150 for samples targeting 16S rRNA gene and trim bases with an average quality lower than Q25 in a window of 5 bases. The forward and reverse reads were merged by overlapping paired-end reads with AdapterRemoval version 2.3.0 (Schubert et al. 2016) using default parameters. ITSx version 1.1.2 (Bengtsson-Palme et al. 2013) was used on samples targeting the ITS region to extract the highly variable fungal ITS2 subregion from the merged reads. Sequences containing ITS2 subregions with less than 100 bases were discarded. The QIIME2 package version 2020.2.0 (Bolyen et al. 2019) was used for Operational Taxonomic Unit (OTU) generation and taxonomic identification. Chimeric

merged reads were detected and removed using Vsearch (Rognes et al. 2016), an implementation of UCHIME (Edgar et al. 2011) against Greengenes database version 13.8 (DeSantis et al. 2006) for samples targeting 16S rRNA gene and UNITE/QIIME ITS database version 8.2 (Abarenkov et al. 2020) for samples targeting ITS region. OTUs were selected at 97% similarity threshold using the open reference strategy and those with less than two reads were removed from the OTU table. A representative sequence of each OTU was then selected for taxonomy assignment using q2-feature classifier plugin (Bokulich et al. 2015) and the pre-trained Naïve Bayes classifier based on SILVA 138 OTUs full-length sequences in the case of 16S rRNA. While, UNITE dynamic database v. 8.2 (Abarenkov et al. 2020) was applied for fungi ITS2 DNA sequences.

Sequencing coverage was evaluated by rarefaction analysis. Datasets were normalized to the same sequencing depth. The relative abundances of the functional groups in each sample were calculated as the cumulative abundance of OTUs assigned to each functional group. Analysis of the abundance tables were carried out using R v4.0 (R Core Team 2013) and the Phyloseq package (McMurdie and Holmes 2013). Plots were visualized using the ggplot2 package (Wickham 2016). Alpha diversity indices chao1, observed species, Shannon-Wiener Index H' and Simpson were calculated to reflect the diversity and richness of the fungal and bacterial communities. Statistical differences in alpha diversity indexes between both Extra and Rubi type were determined by the one-way ANOVA test. In addition, beta diversity was evaluated using Multidimensional Scaling (MDS) analysis based on Bray Curtis dissimilarity distances matrices. Shared OTUs among the beer samples were shown with a Venn diagram (Bardou et al. 2014). Microbial compositions were expressed as relative abundances at the genus levels.

3. Results and discussion

Descriptors of fermentation and quantification of bacteria and fungi

The values of the parameters related with the fermentation processes are summarized in Table 1. They were determined at the moment of sampling, that is, approximately 7 months after the beginning of the process.

Table 1. Values of pH, brix and potential alcohol determined in the barrels at the moment of sampling.

Style	Lot	Barrel	pH	Brix	Potential alcohol
Extra	B055EX	#21	3.69	11.0	6.1
		#22	3.68	11.1	6.1
		#25	3.70	11.0	6.1
Rubi	A092SL	#9	3.37	6.8	3.7
		#11	3.35	6.6	3.6
		#13	3.55	7.5	4.1

The ranges of pH were 3.68-3.70 in Extra and 3.35-3.55 in Rubi. Values of Brix (11.0-11.1) and potential alcohol (6.1) were also slightly higher in Extra. Before being used for the maturation of this lot of beer, barrels #21, #22 and #25 had previously contained muscat wine (personal communication) and barrels #9, #11 and #13 had contained red wine. At the moment of sampling, the fermentation parameters were coherent with the distinctive traits of two craft lagers, being Extra characterized by higher Plato degree and alcohol content. Extra is sweeter and less sour than Rubi, as the objective of the maturation of the Extra in the barrels is increasing the alcoholic content.

The results of the culture-dependent microbiological analyses are represented in Figure 1. The concentration of total aerobic mesophilic bacteria was $3.0\text{-}6.8 \times 10^3$ CFU mL⁻¹ in Extra and $4.2 \times 10^2\text{-}2.9 \times 10^4$ CFU mL⁻¹ in Rubi. Total abundance of fungi was $5.0\text{-}8.7 \times 10^3$ CFU mL⁻¹ in Extra and $6.7 \times 10^2\text{-}5.1 \times 10^4$ CFU mL⁻¹ in Rubi. All colonies displayed the macroscopic characteristics of yeasts. The concentration of brewing yeasts was $6.3 \times 10^3\text{-}1.2 \times 10^4$ CFU mL⁻¹ in Extra and $1.9 \times 10^2\text{-}5.1 \times 10^4$ CFU mL⁻¹ in Rubi. The concentration of cultivable bacteria and fungi was more homogeneous among Extra barrels but significantly different (ANOVA, $p < 0.05$) among Rubi samples, which may be related with a weaker selective pressure of sugar content and potential alcohol in the later.

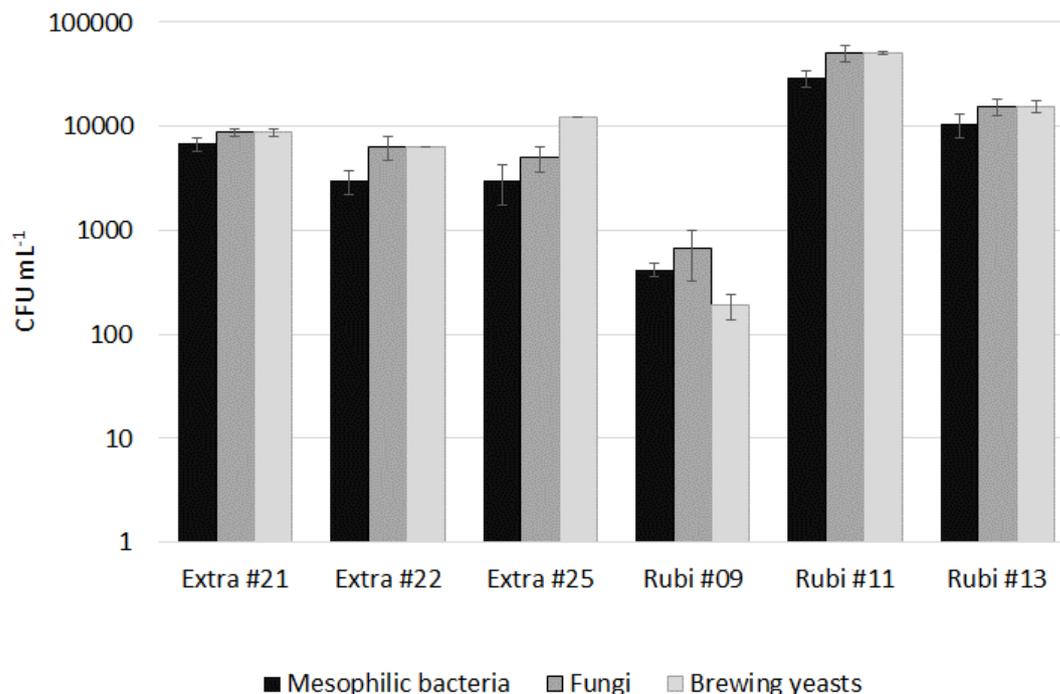


Figure 1. Concentration of total aerobic mesophilic bacteria, fungi and brewing yeasts in bear style Extra (barrels #21, #22 and #25) and Rubi (barrels #9, #11 and #13). Bar represent the average of 3 (bacteria) or 5 (fungi) replicates and bars represent the standard deviation.

Fungal diversity

The number of fungal OTUs ranged from 483 to 911 in Extra and from 475 to 854 in Rubi datasets (Table 2). Rarefaction analyses showed that all the samples tended to approach the saturation plateau, indicating that the sequencing effort was sufficient to cover most of fungal diversity in these beer samples (Figure 2). The number of OTUs and Chao1 values indicated that species richness was overall higher in Extra. Shannon and diversity indices were the highest in Rubi #9 (Shannon 2.7; Simpson 0.88) and the lowest on Rubi #11 (Shannon 1.3; Simpson 0.48). ANOVA analysis showed a significant effect of the style of beer (Extra or Rubi) on the number of OTUs ($p=0.0406$) but not on Chao1 ($p=0.187$), Shannon ($p=0.266$) or Simpson ($p=0.362$) indices.

Table 2. Estimates of species richness and diversity of fungal communities in Extra and Rubi beer barrels.

Sample	OTUs^a	Chao1^b	Shannon^c	Simpson^d
Extra #21	483	998	2.0	0.80
Extra #22	587	1432	2.3	0.84
Extra #25	911	1407	2.5	0.85
Rubi #11	475	649	1.3	0.48
Rubi #13	854	1279	2.0	0.71
Rubi #9	639	967	2.7	0.88

^a OTUs: Operational Taxonomic Units

^b Chao1: Species richness estimator

^c Shannon index of biodiversity (>0 , higher more diverse)

^d Simpson diversity index (0-1; 0 = most simple)

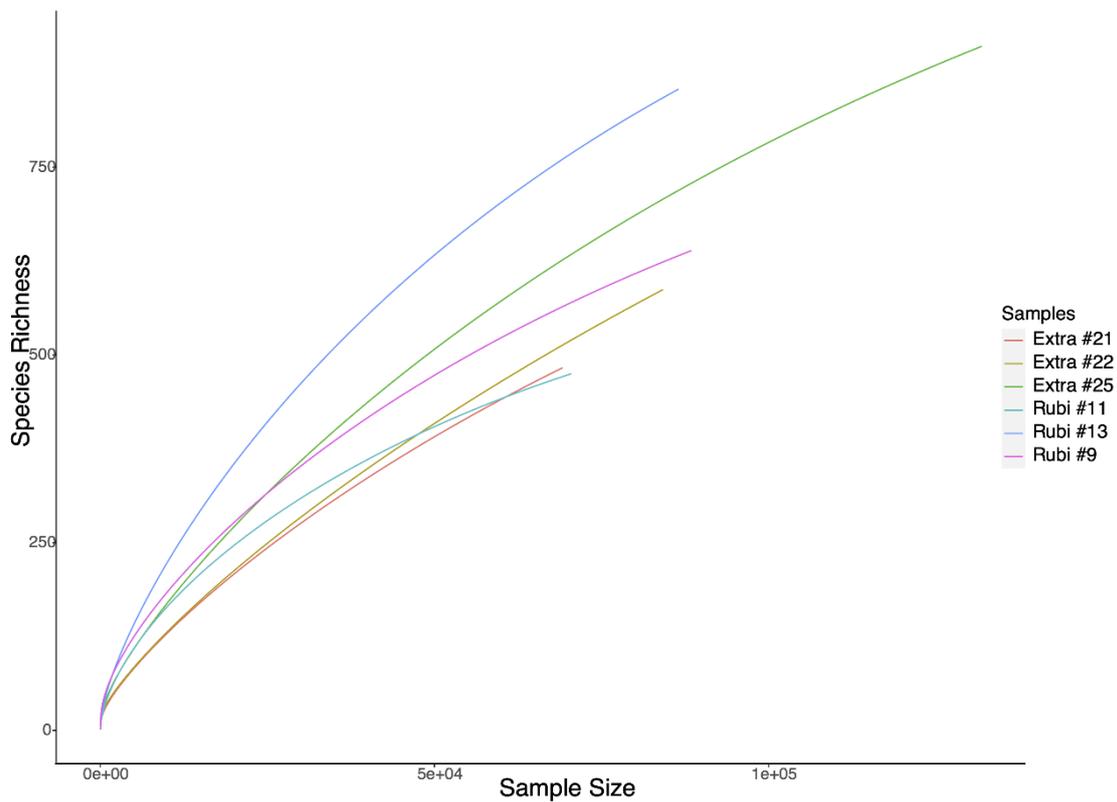


Figure 2. Rarefaction curves of OTU richness as a function of sequencing effort of fungal communities from beer samples at 97% similarity level.

After normalization and filtering, a total of 27 OTUs were identified in relative abundance $\geq 1\%$. Given that only 33% of the OTUs was classified at species level while 100% of the OTUs was assigned at the genus level, further taxonomic composition analyses were performed at genus level. OTUs with a relative abundance $\geq 1\%$ were assigned to the yeast genera *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Pichia*, *Walleimia*, *Zygosaccharomyes* and *Debaromyces* and the molds *Cladosporium*, *Penicillium* and *Aspergillus* (Table S1).

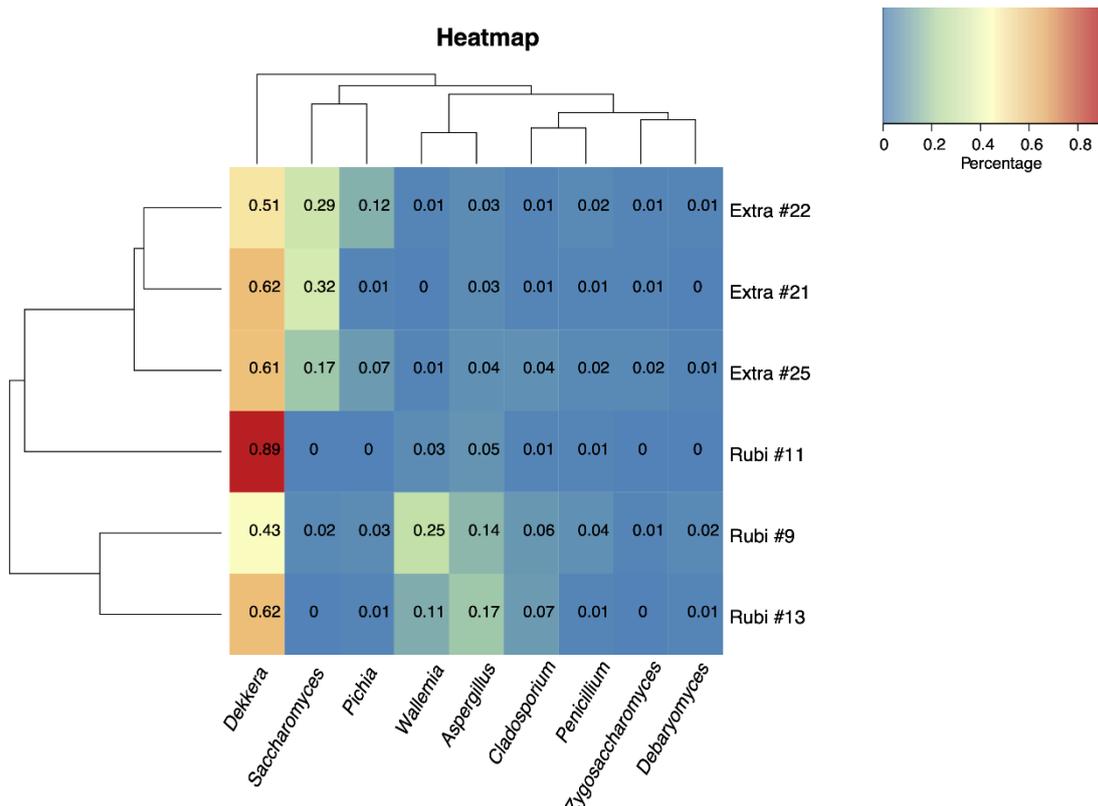


Figure 3. Heatmap of the fungal community composition of beer samples based on Bray-Curtis distance calculated from OTU abundances merged at genus level.

As often observed in spontaneously-fermented craft beer, *Saccharomyces* was not dominant (Shayevitz et al. 2020; Ver Eecke et al. 2017). *Dekkera* was the most abundant genus in both beer styles (Figure 3) being represented by the species *D. bruxellensis*, *D. anomala* and *D. custersiana* (Table S1). *Dekkera* designates the teleomorph state of *Brettanomyces* that is common in fruits, but considered as a contaminant in wine, cider and industrial beer (Kochláňová et al. 2016). However, the dominance of *Dekkera* in the yeast community is a common trait of the mature fungal microbiomes of craft sour beer (Shayevitz et al. 2020; Tyakht et al. 2021). Because of their capacity to produce esters from protein and ferment the cellobiose of wood, their activity is particularly relevant during the maturation phase contributing to the fruity flavors and to a more complex sensorial profile of the final product (Basso et al. 2016; Kochláňová et al. 2016). *Pichia*

are highly tolerant to ethanol and can degrade xylose and cellulose, traits that underlie their abundance in the microbiome of wooden-aged beer (Dysvik et al. 2020; Ver Eecke et al. 2017). *Zygosaccharomyces* is associated with the development of fruity flavors (Methner et al. 2019). *Walleimia*, although less reported in craft beer, was detected in surveys of commercial beers in different European countries (Sobel et al. 2017).

Mold colonies were not observed in the culture-dependent approach but *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* were detected in the culture-independent analysis indicating very low relative abundances. Molds are present in the cereal grains (Noots et al. 1999) and are associated with spoilage and development of off-flavors in industrial beers (Sobel et al. 2017). In particular case of craft beer matured in wood barrels, lignocellulose and hemicellulose degrading fungi (De Roos et al. 2019) can actually contribute to the saccharification of wood compounds, increasing the alcoholic potential and clarity of beer and providing particular imprints to the final flavor (Nigam et al. 2018).

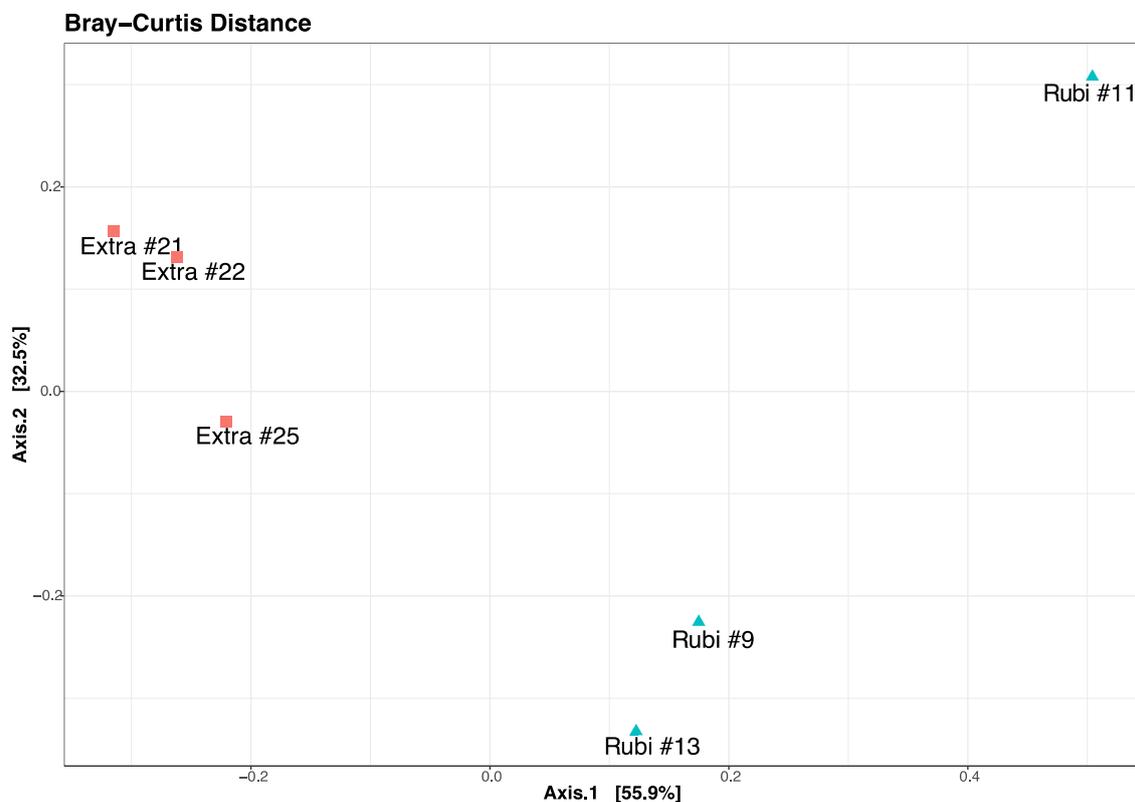


Figure 4. Multidimensional scaling analysis based on pairwise Bray-Curtis distance matrix of the fungal communities (the first two coordinates are shown, representing 88,4% of the total variance).

Multidimensional scaling analysis (MDS) of fungal communities based on Bray-Curtis (Figure 4) allowed clustering of samples by type of beer (Extra and Rubi) indicating that fungal communities are different in the Extra and Rubi types. Fungal communities from the three Extra barrels (21, 22 and 25) were clearly grouped confirming a higher degree of similarity among these communities than among the fungal communities of the Rubi barrels (Figures 4), related with differences in the proportion of *Dekkera* and the molds *Cladosporium* and *Penicillium* (Figure 3). Considering that the presence of molds may be an effect of the contact with the wood from the barrels, the results confirm that changes in the structure and composition of the fungal community represent an important biological mechanism by which the known impact of the wood on the final characteristics of craft beers is exerted (Shayevitz 2018). In this case, the effect was more obvious in Rubi, for which the selective pressure represented by the alcohol content is not so strong. In fact, it was among Rubi samples that the lowest and highest values for community diversity indexes were observed (Table 2).

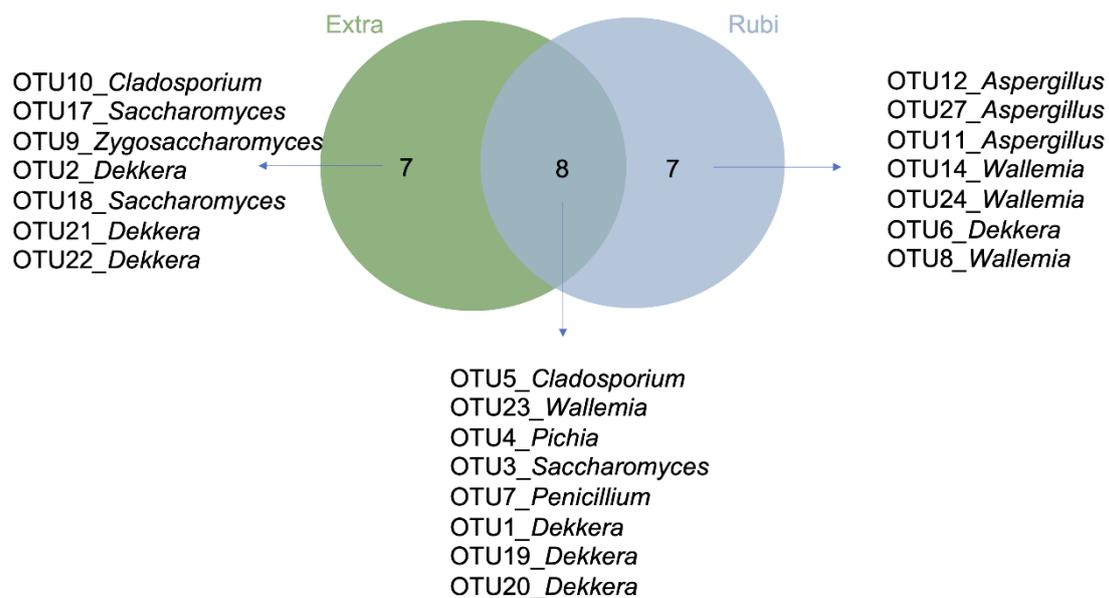


Figure 5. Venn diagram of fungal OTUs at abundances higher than 1% in the two of beer styles. The numbers indicate how many OTUs were shared or exclusive in the samples.

Approximately half the OTUs detected in each style were exclusive to that style (Figure 5). At the genus level, *Zygosaccharomyces* and *Aspergillus* were both style-specific taxa. This may result from a lower tolerance of *Aspergillus*, exclusive to Rubi, to ethanol (Ma et al. 2019) or from an inoculation with effect of the previous content of the Extra barrels (muscat wine) with *Zygosaccharomyces* (Berber et al. 2016).

Bacterial diversity

The number of bacterial OTUs ranged from 1046 to 1144 in Extra and from 815 to 845 in Rubi datasets (Table 3).

Table 3. Estimates of species richness and diversity of bacterial communities in Extra and Rubi beer barrels.

Sample	OTUs^a	Chao1^b	Shannon^c	Simpson^d
Extra #21	1046	1984	0.4	0.07
Extra #22	1200	2394	1.3	0.52
Extra #25	1144	2233	1.1	0.33
Rubi #11	815	1497	0.9	0.46
Rubi #13	845	1478	1.0	0.44
Rubi #9	833	1828	1.1	0.53

^a OTUs: Operational Taxonomic Units

^b Chao1: Species richness estimator

^c Shannon index of biodiversity (>0, higher more diverse)

^d Simpson diversity index (0-1; 0 = most simple)

Although the saturation curves have not reached a plateau, rarefaction analyses indicate that the sequencing effort covered a significant proportion of the diversity of bacterial represented in the beer samples (Figure 6). ANOVA analysis failed to demonstrate a significant effect of the style of beer (Extra or Rubi) on indicators of community richness and diversity (ANOVA, $p > 0.05$).

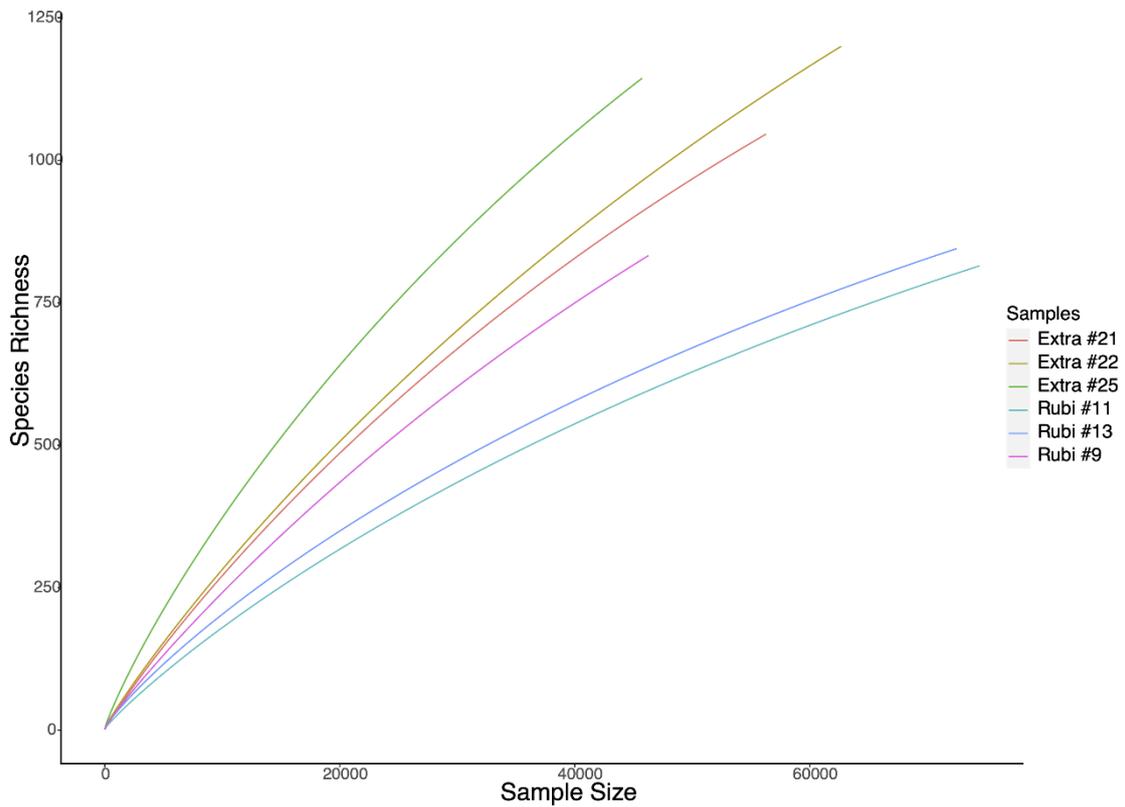


Figure 6. Rarefaction curves of OTU richness as a function of sequencing effort of bacterial communities from beer samples at 97% similarity level.

After normalization and filtering, a total of 7 OTUs were identified in relative abundance $\geq 1\%$. 100% of these OTUs were assigned to the genus level, corresponding to *Lactobacillus* (*L. acetotolerans*, *L. buchneri*, *L. kimchicus*), *Pediococcus* (*P. damnosus*) and *Acetobacter* (*A. malorum*, *A. pasteurianus*) (Table S2 and Figure 7).

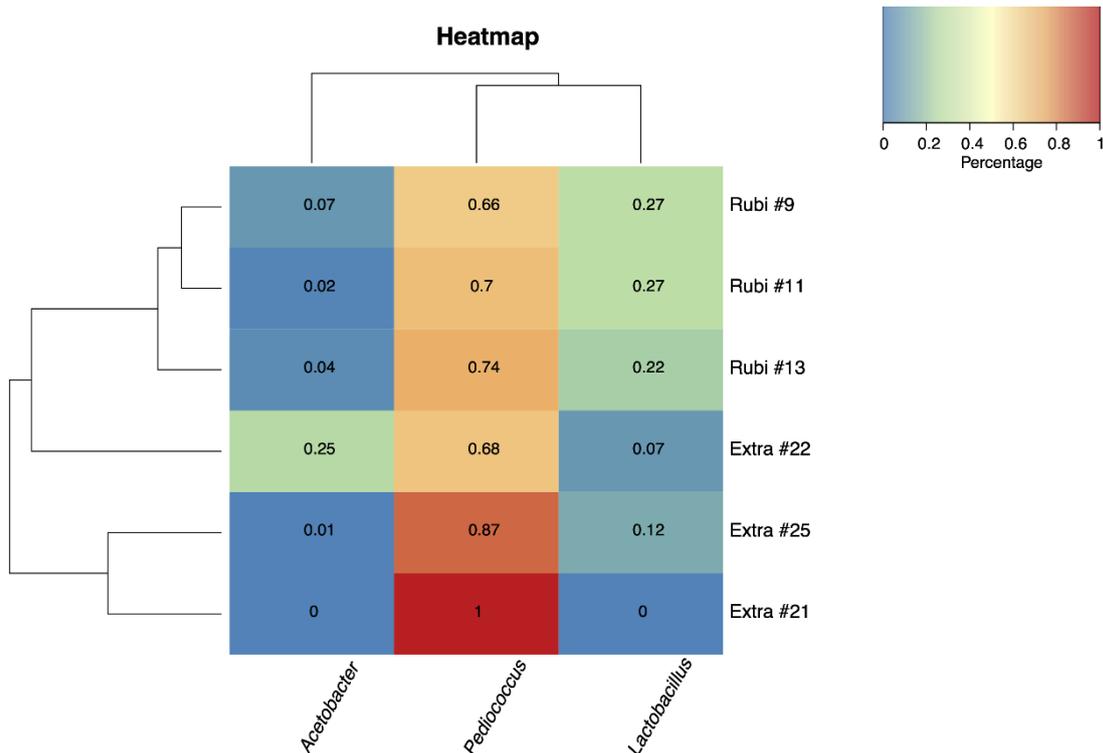


Figure 7. Heatmap of the bacterial community composition of beer samples based on Bray-Curtis distance calculated from OTU abundances merged at genus level.

LAB (*Firmicutes*) and AAB (*Proteobacteria*) are the key players in the acidification of sour beer during the relatively long period of storage in wood barrels (Tenhovirta 2019), and the species identified in this analysis can be considered as common in different craft sour beers (Dysvik et al. 2020). These bacteria appear usually after four months of fermentation in barrels, during the acidification phase, which is characterized by an increase in the concentration of lactic acid, acetic acid and the corresponding esters (Spitaels, et al., 2014). In general, the contribution of *Lactobacilli* is mostly the production of lactic acid, with a minor impact in flavor. However, *L. buchneri* releases metabolites that have a positive effect on sensory properties of sour beer (Dysvik et al. 2019). *P. damnosus* (formerly *P. cerevisiae*) is the most common *Pediococcus* species in sour beers, being more tolerant to hop and low pH than *Lactobacilli* (Bossaert

et al. 2019) and very persistent in wooden barrels (De Roos et al. 2019). *Pediococcus* produce diacetyl, giving an undesirable buttery flavor. Nevertheless, this effect is tolerable in craft beer because some non-*Saccharomyces* yeasts degrade diacetyl (Methner et al. 2019). The acetic acid bacteria of genus *Acetobacter*, and particularly the species *A. pasteurianus* are also characteristic of lambic and sour beer microbiomes (Dysvik et al. 2020). As strict aerobes they develop at the surface taking advantage of the air inside the barrels (Bossaert et al. 2020). *A. pasteurianus* occurs since early stages of maturation in wooden barrels but the relative abundance increases with maturation time (De Roos et al. 2018).

The proportion between LAB and AAB is critical as an excessive production of acetic acid and ethyl acetate, as the later can lead to an unpleasant flavor (Bossaert et al. 2019). Although the proportion of LAB was much higher than the proportion of AAB, the ratio between these two groups was more stable in Rubi. In Extra, a very high proportion of *Acetobacter* was found in the community represented in barrel #22, making it structurally dissimilar from the communities represented in the other Extra barrels (Figure 7).

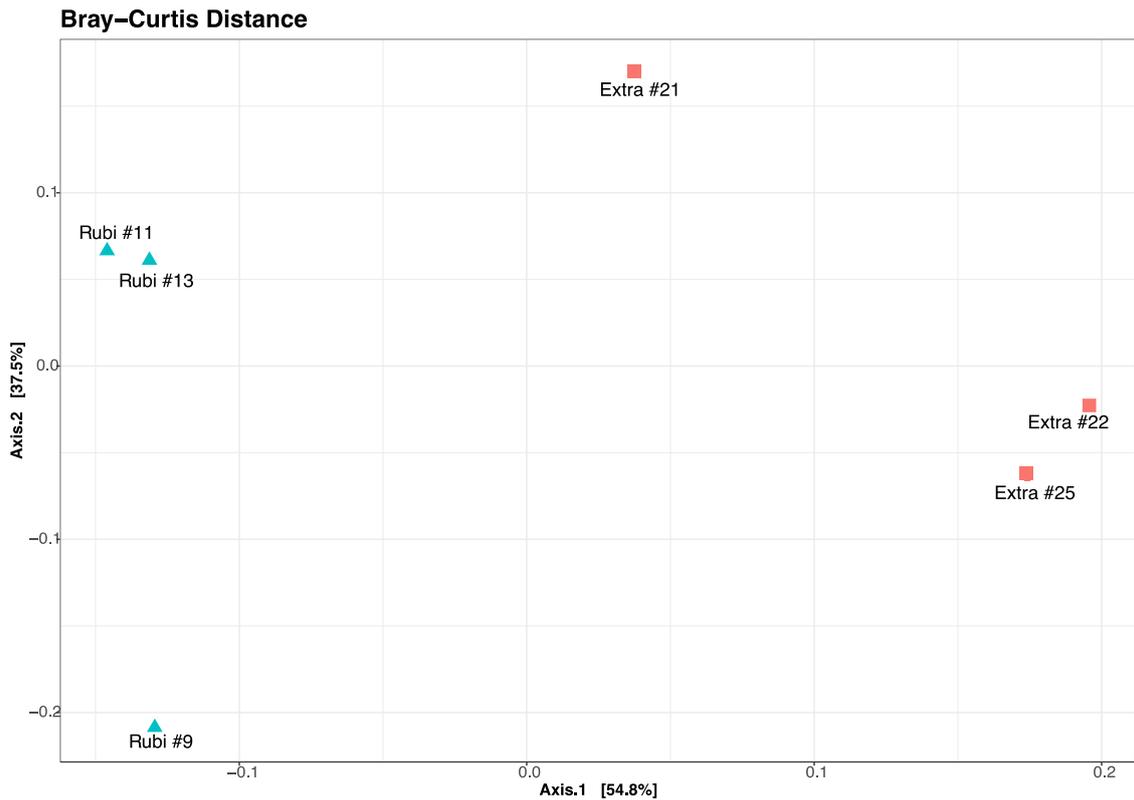


Figure 8. Multidimensional scaling analysis based on pairwise Bray-Curtis distance matrix of the bacterial communities (the first two coordinates are shown, representing 88,4% of the total variance).

Multidimensional scaling analysis (MDS) of bacterial communities based on Bray-Curtis (Figure 8) revealed significant within and between-style differences in the composition of bacterial communities. There are defined clusters, #22-#25 and #11-#13 corresponding to Extra and Rubi styles, respectively, indicating that bacterial communities differ between styles. However, for each of the styles, there was one sample that corresponded to a quite different community (#9 for Rubi style and #21 for Extra style).

Considering the pattern of clustering observed in the multidimensional scaling analysis (Figure 8), it does not match the grouping based on the relative abundance of the most represented genera, as depicted in the heatmap (Figure 7), the intra-style variation

may be related with minority or rare taxa. In fact, the OTUs represented with more than 1% relative abundance were mostly common to both beer styles. Six out of the 7 species identified, were represented in Rubi and Extra and only *L. kimchicus* was exclusive to Rubi (Figure 9).

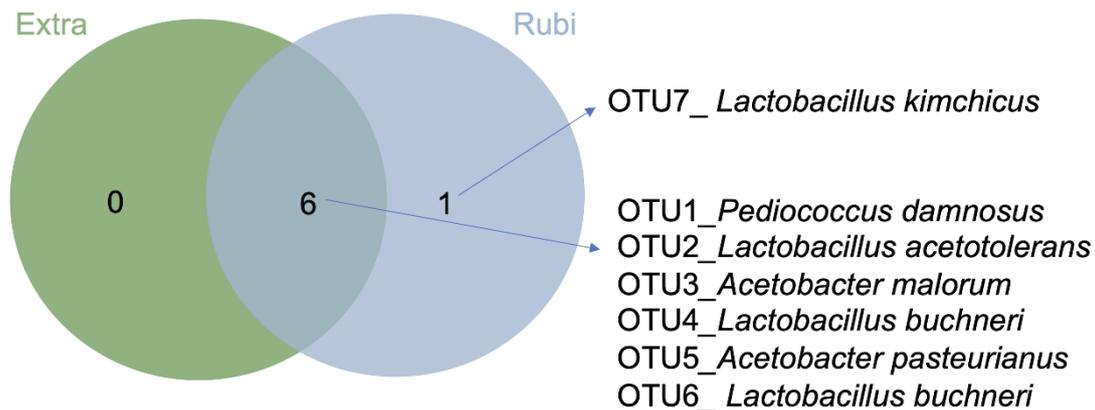


Figure 9. Venn diagram of bacterial OTUs at abundances higher than 1% in the two of beer styles. The numbers indicate how many OTUs were shared or exclusive in the samples.

4. Conclusion

An integrative perspective on the results provides some clues for the organoleptic complexity and diversity of craft beer and for the wide range of factors that may affect the dynamics of microbial communities and ultimately, the distinctive traits of each particular style.

Extra is stronger in terms of body and alcohol. This beer style was characterized by more homogeneous colony counts and more similar fungal communities, dominated by *Dekkera* that may contribute to the fruity flavors, characteristic of Doppelbocks. Although minority, *Saccharomyces* were also well represented in Extra fungal communities. Rubi has a lighter character, in terms of body and alcohol. There was a

significant variation between barrels, in terms of microbial load, as described by colony counts, and composition of the fungal community. *Dekkera* was still dominant but *Saccharomyces* was much less represented. On the other hand, molds were relatively more abundant in the fungal community of Rubi barrels and may contribute to the clarity of the final product. The contact with the wood barrels seems to have an important effect on the fungal community, that includes several cellulose and hemi-cellulose degrading species.

The communities of bacteria were dominated by LAB with a significant representation of AAB, as characteristic of sour beers. However, the structure of bacterial communities was more variable within each style, indicating that bacterial and fungal communities are responding to different drivers, during the maturation process. The absence of *Enterobacteriaceae* and the dominance of LAB and *Dekkera* are traits compatible with nearly mature sour beers.

Acknowledgments

The authors are grateful to *Essência D'Alma* craft brewery and to master brewer Nicolas Billard for the internship opportunity given to João Costa and for providing the beer samples.

Declarations

Funding: Thanks are due to FCT/MCTES for the financial support to CESAM (UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020), through national funds.

Conflicts of interest: There are no conflicts of interest.

Availability of data and material: minimal datasets are provided as supplementary information

Code availability: Not applicable

Authors' contributions: All authors contributed substantially to the conception and design of the work or the acquisition and analysis of data, to the drafting or critical revision of the manuscript and approved the final submitted version.

References

- Abarenkov K, Zirk A, Piirmann T, Pöhönen R, Ivanov F, Nilsson RH, Kõljalg U (2020) UNITE QIIME release for Fungi. Version 04.02.2020. UNITE Community. doi:<https://doi.org/10.15156/BIO/786385>
- Aquilani B, Laureti T, Poponi S, Secondi L (2015) Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences Food quality and preference 41:214-224
- Bardou F et al. (2014) Long noncoding RNA modulates alternative splicing regulators in Arabidopsis Dev Cell 30:166-176
- Basso RF, Alcarde AR, Portugal CB (2016) Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? Food Research International 86:112-120 doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Bengtsson-Palme J et al. (2013) Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS 2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data Methods in ecology and evolution 4:914-919
- Berber N, Aissaoui R, Bekada AMA, Coarer M (2016) Isolation and molecular identification (PCR-Delta and PCR-RFLP-ITS) of the yeast from Black Muscat grape cultivated in El malah (Wilaya of Ain Temouchent, Algeria) Advances in Environmental Biology 10:55-62
- Bokulich NA, Bamforth CW (2013) The microbiology of malting and brewing Microbiol Mol Biol Rev 77:157-172
- Bokulich NA, Bamforth CW, Mills DA (2012) Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale PLoS ONE 7:e35507

- Bokulich NA, Bergsveinson J, Ziola B, Mills DA (2015) Mapping microbial ecosystems and spoilage-gene flow in breweries highlights patterns of contamination and resistance *Elife* 4:e04634
- Bolyen E et al. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 *Nat Biotechnol* 37:852-857
- Bossaert S, Crauwels S, De Rouck G, Lievens B (2019) The power of sour-a review: old traditions, new opportunities *BrewingScience* 72:78-88
- Bossaert S et al. (2020) Description of the temporal dynamics in microbial community composition and beer chemistry in sour beer production via barrel ageing of finished beers *Int J Food Microbiol* 339:109030
- Ciosek A, Rusiecka I, Poreda A (2020) Sour beer production: impact of pitching sequence of yeast and lactic acid bacteria *Journal of the Institute of Brewing* 126:53-58
- Comeau AM, Douglas GM, Langille MG (2017) Microbiome helper: a custom and streamlined workflow for microbiome research *MSystems* 2
- De Keukeleire D (2000) Fundamentals of beer and hop chemistry *Quim Nova* 23:108-112
- De Roos J, Van der Veken D, De Vuyst L (2019) The interior surfaces of wooden barrels are an additional microbial inoculation source for lambic beer production *Appl Environ Microb* 85
- De Roos J, Verce M, Aerts M, Vandamme P, De Vuyst L (2018) Temporal and Spatial Distribution of the Acetic Acid Bacterium Communities throughout the Wooden Casks Used for the Fermentation and Maturation of Lambic Beer Underlines Their Functional Role *Appl Environ Microb* 84:e02846-02817 doi:10.1128/aem.02846-17
- DeSantis TZ et al. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB *Appl Environ Microb* 72:5069-5072
- Dysvik A, La Rosa SL, De Rouck G, Rukke E-O, Westereng B, Wicklund T (2020) Microbial dynamics in traditional and modern sour beer production *Appl Environ Microb*
- Dysvik A, Liland KH, Myhrer KS, Westereng B, Rukke E-O, de Rouck G, Wicklund T (2019) Pre-fermentation with lactic acid bacteria in sour beer production *Journal of the Institute of Brewing* 125:342-356 doi:<https://doi.org/10.1002/jib.569>
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection *Bioinformatics* 27:2194-2200

- Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea *The ISME journal* 5:1571-1579
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies *Nucleic Acids Res* 41:e1-e1
- Kochláňová T, Kij D, Kopecká J, Kubizniaková P, Matoulková D (2016) Non-*Saccharomyces* Yeasts and Their Importance in the Brewing Industry Part I - *Brettanomyces (Dekkera)* *KVASNÝ PRŮMYSL* 62:198–205 doi:10.18832/kp2016024
- Ma L et al. (2019) Modulation of fatty acid composition of *Aspergillus oryzae* in response to ethanol stress *Microorganisms* 7:158
- Mastanjević K, Krstanović V, Lukinac J, Jukić M, Lučan M, Mastanjević K (2019) Craft brewing—is it really about the sensory revolution? *Kvasný Průmysl* 65:13-16
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data *PLoS ONE* 8:e61217
- Methner Y, Hutzler M, Matoulková D, Jacob F, Michel M (2019) Screening for the Brewing Ability of Different Non-*Saccharomyces* Yeasts *Fermentation* 5:101
- Monerawela C, Bond U (2018) The hybrid genomes of *Saccharomyces pastorianus*: a current perspective *Yeast* 35:39-50
- Nevoigt E (2008) Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiol Mol Biol Rev* 72:379-412
- Nigam D, Asthana M, Kumar A (2018) *Penicillium*: A Fungus in the Wine and Beer Industries. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp 187-200
- Noots I, Delcour JA, Michiels CW (1999) From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects *Crit Rev Microbiol* 25:121-153
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing
- Rodhouse L, Carbonero F (2019) Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota *Critical reviews in food science and nutrition* 59:462-473
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics *PeerJ* 4:e2584

- Salanță LC et al. (2020) Non-alcoholic and craft beer production and challenges Processes 8:1382
- Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets Bioinformatics 27:863-864
- Schubert M, Lindgreen S, Orlando L (2016) AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging BMC research notes 9:1-7
- Shayevitz A, Harrison K, Curtin CD (2020) Barrel-Induced Variation in the Microbiome and Mycobiome of Aged Sour Ale and Imperial Porter Beer J Am Soc Brew Chem:1-8
- Shayevitz AM (2018) Do Oak Barrels Contribute To The Variability of The Microbiome of Barrel-Aged Beers? , Oregon State University
- Sobel J, Henry L, Rotman N, Rando G (2017) BeerDeCoded: the open beer metagenome project F1000Research 6
- Spitaels F et al. (2014) The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer PLoS ONE 9:e95384 doi:10.1371/journal.pone.0095384
- Tedersoo L et al. (2014) Global diversity and geography of soil fungi science 346
- Tenhovirta S (2019) The Effects of Lactic Acid Bacteria Species on Properties of Sour Beer
- Tyakht A et al. (2021) Characteristics of bacterial and yeast microbiomes in spontaneous and mixed-fermentation beer and cider Food Microbiol 94:103658 doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103658>
- Ver Eecke H, Lambert J, Fetter L, Stout G, Spindler M Purposeful *Pichia* pitching: Analyzing beer deliberately fermented with *Pichia*, a yeast genus that may be unknowingly prevalent in barrel-aged beer. In: 2017 SIMB Annual Meeting and Exhibition, 2017. SIMB,
- Walker GM, Stewart GG (2016) *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages Beverages 2:30
- Wickham H (2016) ggplot2-Elegant Graphics for Data Analysis. Springer International Publishing Cham, Switzerland