

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

Saulo Barbosa

Aplicação da Tecnologia CRISPR-Cas9 na Melhoria de Características de
Fermentação em Leveduras Cervejeiras

Araraquara

2024

Saulo Barbosa

Aplicação da Tecnologia CRISPR-Cas9 na Melhoria de Características de
Fermentação em Leveduras Cervejeiras

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Especialista em Tecnologia Cervejeira.

Orientador(a): Prof. Dr. Ossamu Hojo
Co-orientador(a): Prof. Ms. Sabrina
Ciane Condi

Araraquara

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

B238a **Barbosa, Saulo**
Aplicação da tecnologia CRISPR-Cas9 na melhoria de características de fermentação em leveduras cervejeiras / Saulo Barbosa. – Araraquara : [s.n], 2024
55 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Lato Sensu – Tecnologia Cervejeira) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química
Orientador: Ossamu Hojo
Coorientador: Sabrina Ciane Condi

1. Fermentação. 2. Levedura. 3. Alimentos geneticamente modificados. 4. DNA. 5. Acido ribonucleico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

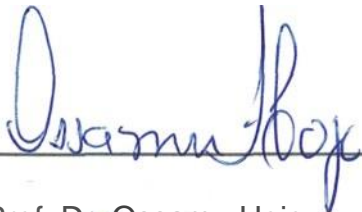
Saulo Barbosa

Aplicação da Tecnologia CRISPR-Cas9 na Melhoria de Características de Fermentação em Leveduras Cervejeiras.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho" como parte dos requisitos para obtenção do título de Especialista em Tecnologia Cervejeira.

Araraquara, 19 de abril de 2024

Banca examinadora



Prof. Dr. Ossamu Hojo



Prof. Dr. João Fernando Sacilotto



Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

Dedico esse trabalho à minha amada esposa, Maiara, exemplo de companheirismo, parceria, dignidade e sobretudo compreensão e amor. Sem você eu não estaria concluindo mais essa etapa de minha vida, obrigado por toda ajuda e por toda compreensão nos momentos de minha ausência dedicados a esse estudo e obrigado por todo sacrifício que você já fez por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Instituto de Química de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela qualidade e realização do primeiro curso do nível de Pós-graduação ofertado por uma Universidade Estadual no Brasil no curso em Tecnologia Cervejeira.

Em seguida, ao fomento do curso obtido através das empresas Ambev, Agrária Malte, Boreal Chopp, Facte, Full Gauge e Biosab Leveduras.

Ao professor Dr. Leinig Antônio Perazolli, pela oportunidade e por gentilmente me acolher nesta primeira turma de Pós-graduação em Tecnologia Cervejeira do IQ UNESP.

Aos docentes Sabrina Ciane Condi e Ossamu Hojo, orientadores desse trabalho, pela confiança, paciência, disponibilidade e conhecimento compartilhado.

Aos professores do departamento de Tecnologia Cervejeira do Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, campus de Araraquara, João Fernando Sacilotto, Gustavo Cordeiro, Rodrigo Marques, Nailton M. Nascimento-Júnior, Elias de Souza M. Filho, por todo conhecimento transmitido, carinho, amizade, humildade, paciência, confiança, disponibilidade, prestatividade, auxílio e estímulo.

Aos professores convidados Alexandre Esber, Edimilson Ferreira Silva, Gerson Bueno Baragão, Hildon Lacerda Bitu, Karen Keller, Noemir Antoniazzi, Patrick Gumpfl e Rubens Mattos por contribuir na construção de meu conhecimento, crescimento acadêmico e por serem exemplos de profissionais em que irei me espelhar.

Aos membros da Banca avaliadora por cooperar e contribuir com o conhecimento e com meu crescimento pessoal e profissional.

Aos demais profissionais do IQ – UNESP que diretamente ou indiretamente contribuíram nesta trajetória.

À minha família, sobretudo meus pais e meus sogros, pelo imenso incentivo, amor e carinho, sou grato por tudo que fizeram por mim.

Aos companheiros e amigos de turma por toda alegria, paciência, amizade, partilha e união como a classe deve ser. Pela diversão, convivência neste período breve, pelo conhecimento e pela ciência que a cerveja mostra ser em nossas vidas.

A todos vocês citados aqui, meus sinceros agradecimentos, e obrigado por transformarem a minha vida.

“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande.”

(DUBOS, 1967b.)¹

¹ DUBOS, R. **Pasteur e a Ciência Moderna**. São Paulo, SP: Edart, 1967b.

RESUMO

Desde a pré-história a cerveja desempenha um papel fundamental na evolução da civilização. Acreditava-se que a fermentação era obra do divino, entretanto, a fermentação pode ser influenciada por diversos fatores dentre eles químico, físico, metabólico etc. Só a levedura é capaz de fazer cerveja; com a contribuição de Pasteur a levedura e a fermentação tornaram-se ingredientes principais na produção de cerveja. Dito isso, com o surgimento de técnicas revolucionárias no campo da genética foi possível manipular leveduras para atender demandas industriais e mercadológica através da CRISPR. Este trabalho visa o levantamento bibliográfico sobre a técnica de edição genética CRISPR-Cas9 como ferramenta bioquímica possível para a melhora das características de fermentação em leveduras usadas na produção de cerveja. Foi realizada pesquisa bibliográfica descritiva, por meio de acervo bibliográfico, base de dados Scopus além de ferramenta de busca Google Acadêmico, foram analisados trabalhos publicados entre 2004 e 2024 e sua seleção se deu por meio dos descritores: CRISPR/Cas9, modificação genética em leveduras cervejeiras, engenharia metabólica em cepas de leveduras industriais, edição de leveduras por sequenciamento genético e legislação envolvendo organismos geneticamente modificados (OGMs). A busca inicial resultou em um número de 220.861 documentos apenas com um descritor sem horizonte de tempo. Assim aplicando-se todos os descritores e refinando os filtros pôde-se obter um número total de 97 artigos para a leitura completa, resultando em 36 trabalhos efetivamente usados nessa pesquisa. Diante das análises dos trabalhos revisados nota-se que a técnica de edição genética CRISPR-Cas9 apresentou certa facilidade, rapidez e baixo custo frente à outras técnicas moleculares, mostra-se muito promissora diante da perspectiva científica, uma vez que possibilita deleções e alterações genéticas significativas em células e microrganismos de interesse industrial e principalmente em leveduras cervejeiras.

Palavras-chave: Fermentação; levedura; modificada; CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

Since prehistoric times, beer has played a fundamental role in the evolution of civilization. It was believed that fermentation was the work of the divine; however, fermentation can be influenced by various factors including chemical, physical, metabolic, etc. Only yeast is capable of making beer; with Pasteur's contribution, yeast and fermentation became main ingredients in beer production. That being said, with the emergence of revolutionary techniques in the field of genetics, it became possible to manipulate yeast to meet industrial and market demands through CRISPR. This work aims to survey the literature on the CRISPR-Cas9 genetic editing technique as a possible biochemical tool for improving fermentation characteristics in yeast used in beer production. A descriptive bibliographic research was conducted, using the Scopus database as well as the Google Scholar search tool. Papers published between 2004 and 2024 were analyzed, and their selection was based on the following descriptors: CRISPR/Cas9, genetic modification in brewing yeasts, metabolic engineering in industrial yeast strains, yeast editing by genetic sequencing, and legislation involving genetically modified organisms (GMOs). The initial search resulted in a total of 220,861 documents with just one descriptor without a time horizon. Thus, by applying all descriptors and refining the filters, a total of 97 articles were obtained for full reading, resulting in 36 studies effectively used in this research. Upon analysis of the reviewed studies, it is noted that the CRISPR-Cas9 genetic editing technique presented a certain ease, speed, and low cost compared to other molecular techniques, proving highly promising from a scientific perspective, as it enables significant genetic deletions and alterations in cells and microorganisms of industrial interest, particularly in brewing yeasts.

Keywords: Fermentation; yeast; modified; CRISPR/Cas9.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma geral de fabricação de cerveja.....	21
Figura 2. Flor de Lúpulo seccionado com destaque para a Lupulina	25
Figura 3. Transformação da glicose no processo fermentativo alcoólico.	27
Figura 4. Gráfico em função do número de pesquisa por território/ país.	32
Figura 5. Gráfico em função do número de trabalhos realizados por ano adotando o descritor Fermentation.	33
Figura 6. Número de trabalhos obtidos limitados ao intervalo de tempo através dos descritores Fermentation AND Yeast AND Modified AND CRISPR/Cas9.....	34
Figura 7. Visão geral de um Locus do sistema CRISPR/Cas.	41
Figura 8. Representação esquemática onde o Locus CRISPR integra o genoma viral como um novo espaçador em seu próprio Locus CRISPR.	44
Figura 9. Mecanismo de atuação da enzima Cas9 na técnica CRISPR/Cas9.	45
Figura 10. Ferramentas e mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas9.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros para alteração de ésteres e álcoois.....	29
Tabela 2. Representação esquemática dos processos de melhorias a que foi submetida, sua especificidade e resultados obtidos.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3MHA	(<i>3-mercaptohexil acetate</i>): acetato de 3-mercaptohexil.
AAT	(<i>alcohol acyltransferase</i>): álcool aciltransferase.
ALDC	(<i>alpha-acetolactate decarboxylase</i>): enzima alfa-acetolactato liase.
ATP	Adenosina trifosfato.
Cas9/sgRNA	Complexo entre enzima Cas9 fundido ao (<i>single guide ribonucleic acid</i>): RNA-guia de fita única.
CIP	(<i>Cleaning in place</i>): limpeza no local.
CNTBio	Comissão Técnica de Biossegurança.
CO ₂	Dióxido de Carbono.
CRISPR	(<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>): Conjunto de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente Interespaçadas.
CRISPR/Cas9	(<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>): Conjunto de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente Interespaçadas integradas à nuclease (<i>cas9</i>) Cas9.
crRNA	(<i>CRISPR-derived RNA</i>): RNA derivado do loco CRISPR.
CSL	(<i>carbon-sulfur-lyase</i>): enzima carbono-enxofre-liase.
CSL	(<i>cysteine S-conjugate beta-lyase enzyme</i>): enzima cisteína S-conjugada a beta-liase.
DMS	Dimetil-sulfeto.
DNA	(<i>deoxyribonucleic acid</i>): ácido desoxirribonucleico.
Dry-hopping	Adição tardia de lúpulos.
DSB	(<i>double-strand breaks</i>): Quebra de fita dupla de DNA.
EUA	Estados Unidos da América.
FLO	Gene Floclulação.
Gist	Palavra levedura em holandês.
GMs	Geneticamente modificadas.
Grist	Conjunto de grãos para compor uma receita de cerveja.
gRNA	RNA-guia.
H ₂ S	Ácido sulfídrico.
HDR	(<i>Homology-Directed Repair</i>): reparo direcionado por homologia.
HR	(<i>Homology Repair</i>): reparo por homologia.
ILV2	(<i>acetolactate synthase</i>): gene que codifica a acetolactato sintase, a primeira enzima na síntese de leucina e valina.
<i>Indels</i>	(<i>Insertions and/or deletions</i>): inserções e/ou deleções.
Kettle-souring	Processo de acidificação controlado da cerveja.
<i>Malte</i>	Processo de conversão enzimática dos grãos amiláceos, principalmente os de cevada.
MEL	Enzima Melibiase que metaboliza o dissacarídeo

	Melibiose.
NHEJ	(<i>Non-Homologous End-Joining</i>): junção de extremidades não homólogas.
Nuc	Atividade nucleásica.
<i>off-flavors</i>	Sabores desagradáveis.
OGMs	Organismos geneticamente modificados.
<i>on-flavor</i>	Sabores agradáveis.
PAM	(<i>Protospacer Adjacent Motif</i>): motivo adjacente ao Protoespaçador.
PCR	Técnica de reação em cadeia da polimerase.
pH	Potencial de hidrogênio.
Rec	Lobo de reconhecimento.
RN16	Resolução Normativa número 16.
RNA	(<i>ribonucleic acid</i>): ácido ribonucleico.
<i>seed</i>	Região localizada aproximadamente ao sítio PAM, no qual é conhecida também como região <i>seed</i> .
sgRNA	(<i>single guide ribonucleic acid</i>): RNA-guia de fita única.
SpCas9	Enzima Cas9 extraída de <i>Streptococcus pyogenes</i> .
Stress	Reação do organismo quando é vivenciado uma situação de ameaça ou perigo.
TIMP	Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão.
tracrRNA	(<i>trans-activating CRISPR-derived RNA</i>): RNA transativador derivado do loco CRISPR.
tracrRNA:crRNA	Complexo entre RNA transativador fusionado com o RNA derivado do lobo CRISPR.
Trub	Palavra alemã que significa sedimento, forma-se um complexo de sedimentos após a etapa de fervura do mosto.
<i>Whirlpool</i>	Método de separação de sedimentos por forças centrípetas através da formação do trub quente.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	15
II. OBJETIVOS:.....	18
II.1 Geral	18
II.2 Específicos	18
III. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
III.1 Produção de cerveja.....	19
III.2 Matérias-primas	21
III.2.1 Água	21
III.2.2 Malte de cevada e adjuntos	22
III.2.3 Lúpulo	24
III.2.4 Levedura	25
III.3. Fermentação.....	26
III.3.1 Problemas na fermentação.....	27
IV. METODOLOGIA	29
V. RESULTADOS	31
VI. DISCUSSÃO.....	34
VI.1 Alterações genéticas de Leveduras como melhorias no processo cervejeiro.....	34
VI.2 A Técnica CRISPR/Cas9.....	38
VI.2.1 Moléculas envolvidas na técnica CRISPR/Cas9	39
VI.2.1.1 Endonuclease Cas9	39
VI.2.1.2 Locus CRISPR.....	40
VI.2.1.3 crRNA e tracrRNA	41
VI.2.1.4 sgRNA	42
VI.2.1.5 Sequência PAM.....	43
VI.2.2 Mecanismo de ação (Cas9/ sgRNA).....	43
VI.2.3 Reparo do DNA.....	45
VI.3 Regulamentação da edição genômica em alimentos no Brasil.....	47
VII. CONCLUSÃO	48
VIII. PERSPECTIVAS	49
IX. REFERÊNCIAS	52

I. INTRODUÇÃO

Desde a pré-história, na realidade de povos nômades ou sedentários, a cerveja desempenhou papel fundamental na mudança comportamental. A descoberta da agricultura e de cultivos de grãos, como a cevada e o trigo, possibilitou que os povos nômades passassem a estabelecer um território fixo viável para sua sobrevivência, o que viabilizou a descoberta de técnicas como a fermentação. Dos povos pré-históricos aos atuais, encontramos relatos de que bebida fermentada, que com a evolução do saber culminou no produto com a fórmula atual conhecida da Cerveja, sempre esteve presente seja em rituais religiosos, celebrações sociais ou até mesmo na prática comercial entre os povos.

Tanto no Oriente Médio quanto na China, há indícios que a prática de fazer cerveja já era bem estabelecida à época em que o homem iniciava a civilização nas primeiras cidades construídas (6.000 a.C.) e que essa prática já era bem-organizada (MORADO, R., 2017).

Durante a maior parte da história a prática da fermentação era considerada misteriosa e divina (WHITE; ZAINASHEFF; 2020). Acreditava-se que a fermentação era obra da divindade e dos deuses.

Na fermentação, sobretudo, os atores principais são as leveduras, entretanto, a bioquímica de uma fermentação pode ser influenciada além da cepa de levedura, por fatores que precisarão ser elucidados adiante como a composição do mosto cervejeiro e o controle preciso dos parâmetros de fermentação (MUXEL, A. A., 2022).

Segundo Muxel (2022), as leveduras exercem o papel principal no processo fermentativo e esse processo pode sofrer influências da cepa, da variedade, das condições operacionais e ambientais, do meio de cultura ou mosto.

Os cervejeiros (mestres cervejeiros) produzem mosto, não cerveja. Só a levedura é capaz de fazer cerveja; diante disso, é afirmado, levedura metaboliza os açúcares e transforma-os em etanol, dióxido de carbono e várias outras substâncias químicas em quantidades muito menores (MOSHER, R., 2020).

Antes que os microscópios permitissem ver as leveduras, ninguém sabia exatamente o que acontecia durante fermentação; na época, a teoria de que as células vivas poderiam realizar fermentação era biológica demais (WHITE; ZAINASHEFF; 2020).

Com a postulação de Pasteur à teoria da geração espontânea baseado na experiência intitulada “pescoço de cisne”, ele não apenas provou o que as leveduras estavam fazendo, mas também teorizou que as bactérias e outras leveduras presentes eram causa dos sabores desagradáveis (*off-flavors*) (WHITE; ZAINASHEFF; 2020).

O papel central que a levedura exerce ao metabolizar um mosto cervejeiro é a produção de compostos de aroma e sabor, isso está bem estabelecido de fato, esses compostos são subprodutos da síntese de elementos necessários ao seu crescimento e metabolismo (MUXEL, A. A., 2022).

Historicamente, a fermentação do mosto cervejeiro é realizada por leveduras do gênero *Saccharomyces*; a espécie e cepa de levedura utilizada neste processo varia de acordo com a finalidade pretendida do cervejeiro, mas de forma clara, esta distinção pode ser feita através de aspectos conduzidos no controle da fermentação, tais como: capacidade de floculação, temperatura ótima de crescimento e a capacidade de utilização de determinados carboidratos (SILVA, 2019).

Diante dessas afirmações e correlacionando com os aspectos modernos pertinentes ao tema sobre fermentação e leveduras, estamos a frente de uma crescente procura por técnicas que envolvam a biologia molecular, bioinformática, engenharia genética atreladas à microbiologia, para uma ampliação e otimização dos processos cervejeiros, desenvolvendo linhagens de leveduras com características desejáveis para a indústria.

Dito isso, o surgimento de técnicas revolucionárias no campo da genética possibilitou promover de forma rápida, precisa e econômica a manipulação precisa em sequências dos genomas através da técnica CRISPR - sequências palindrômicas curtas e repetitivas, agrupadas e inter espaçadas regularmente (MOLINARI *et al.*, 2020).

A técnica CRISPR mais conhecida como técnica de edição de genes, consiste na modificação do código genético de um organismo. Isso é feito por meio da clivagem do DNA através de uma endonuclease chamada Cas9, guiada a partir de uma sequência de RNA, que é capaz de se parear com as bases de uma sequência alvo (AREND; PEREIRA; MARKOSKI; 2017).

A técnica CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) foi descoberta em 1987 por pesquisadores japoneses ao analisarem o genoma da bactéria *Escherichia coli* (BARBOZA, C. M. S. *et al.*, 2019). Nesse sistema,

o reconhecimento do material genético do invasor se concretiza por uma interação de emparelhamento de bases de um RNA guia com o DNA alvo exógeno, seguida pela atividade de enzimas nucleases (CORREIA, 2022).

Este processo envolve a modificação de pequenos fragmentos de DNA que estão presentes no genoma de um microrganismo. Esses fragmentos são caracterizados por serem repetidos em várias partes do genoma e por possuírem uma sequência palindrômica. Além disso, esses fragmentos repetidos são separados regularmente por outros fragmentos de DNA que também estão localizados na mesma região do genoma desse microrganismo. Com isso, a tecnologia CRISPR/Cas9, torna-se facilmente programável para reconhecer e clivar sítios específicos de um gene alvo e, portanto, passível de ser usada para edição de genomas (QUADROS, *et al.*, 2018).

Essa abordagem tem sido revelada extremamente vantajosa para a indústria cervejeira, pois em teoria, é possível modificar qualquer gene de interesse; modificar com precisão a sequência do genoma de qualquer organismo de forma mais rápida, mais precisa, mais barata e altamente eficiente comparado com outras técnicas (QUADROS, *et al.*, 2018).

Sendo assim, este sistema de alteração genética, mostra-se em destaque e, portanto, de muita valia dentro do cenário científico, industrial e principalmente o cervejeiro. O meio científico acoplado a iniciativa privada (setor industrial) tem incorporado essa técnica para aprimorar significativamente seus produtos, aprimorar processos de produção e explorar novas fronteiras em termos de características organolépticas, que anteriormente não puderam ser alcançadas utilizando as cepas tradicionais de origens. Isso representa um avanço substancial, possibilitando a resolução de desafios e a criação de cervejas com sabores e perfis sensoriais mais distintos e desejáveis, ao mesmo tempo em que impulsiona a eficiência e a qualidade na indústria cervejeira (BIZAJ, E. *et al.*, 2012).

II. OBJETIVOS:

II.1 Geral

O presente trabalho tem como objetivo principal fazer o levantamento bibliográfico sobre a técnica de edição genética CRISPR-Cas9 como ferramenta bioquímica possível para a melhoria das características de fermentação em leveduras usadas na produção de cerveja.

II.2 Específicos

Como objetivos específicos pode-se citar:

- Descrição de melhorias no processo para obtenção de cerveja;
- Análise da ferramenta de melhoramento e edição de material genético através do sistema CRISPR/Cas9;
- Regulamentação de técnicas de edição de material genético no Brasil

III. REVISÃO DA LITERATURA

III.1 Produção de cerveja

Cerveja é uma bebida de cor amarelo palha à preto escuro e profundo, oriundo da reação enzimática da quebra do amido extraído dos grãos de cevada ou adjuntos cervejeiros, em açúcares fermentáveis e/ou fermentescíveis originando então uma reação de fermentação, podendo ser alcoólica ou não. Por definição segundo o decreto N. 9.902, de 08 de julho de 2019, art. 36 define:

Cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro (BRASIL, 2019).

No livro “*O GUIA OXFORD DA CERVEJA*” de (OLIVER, G.; MENDES, I.; FILHO, W. G. V., 2020), cerveja é uma bebida alcoólica derivada de uma fermentação direta de açúcares liberados pelo amido dos grãos.

Vale ressaltar que a cerveja é uma bebida milenar, que permeou entre diversos povos e culturas, e que desde a sua origem até os dias atuais, vem passando e vivenciando constante aperfeiçoamento e melhorias, seja em sua técnica de obtenção através da evolução e revoluções industriais por meio de novas tecnologias para o processamento e a transformação da matéria-prima em bebida; ou então, por meio de evolução tecnológica dos insumos utilizados na fabricação da bebida mediante a novas descobertas científicas, otimizando e melhorando a performance dos produtores e do produto. Oliver, Mendes e Filho (2020), ainda descrevem o papel revolucionário que a cerveja possui, sua democratização como bebida e a sua atribuição na evolução da civilização desde a pré-história até o impulsionamento de pesquisas, modernização e evoluções tecnológicas como a refrigeração mecânica e a pasteurização.

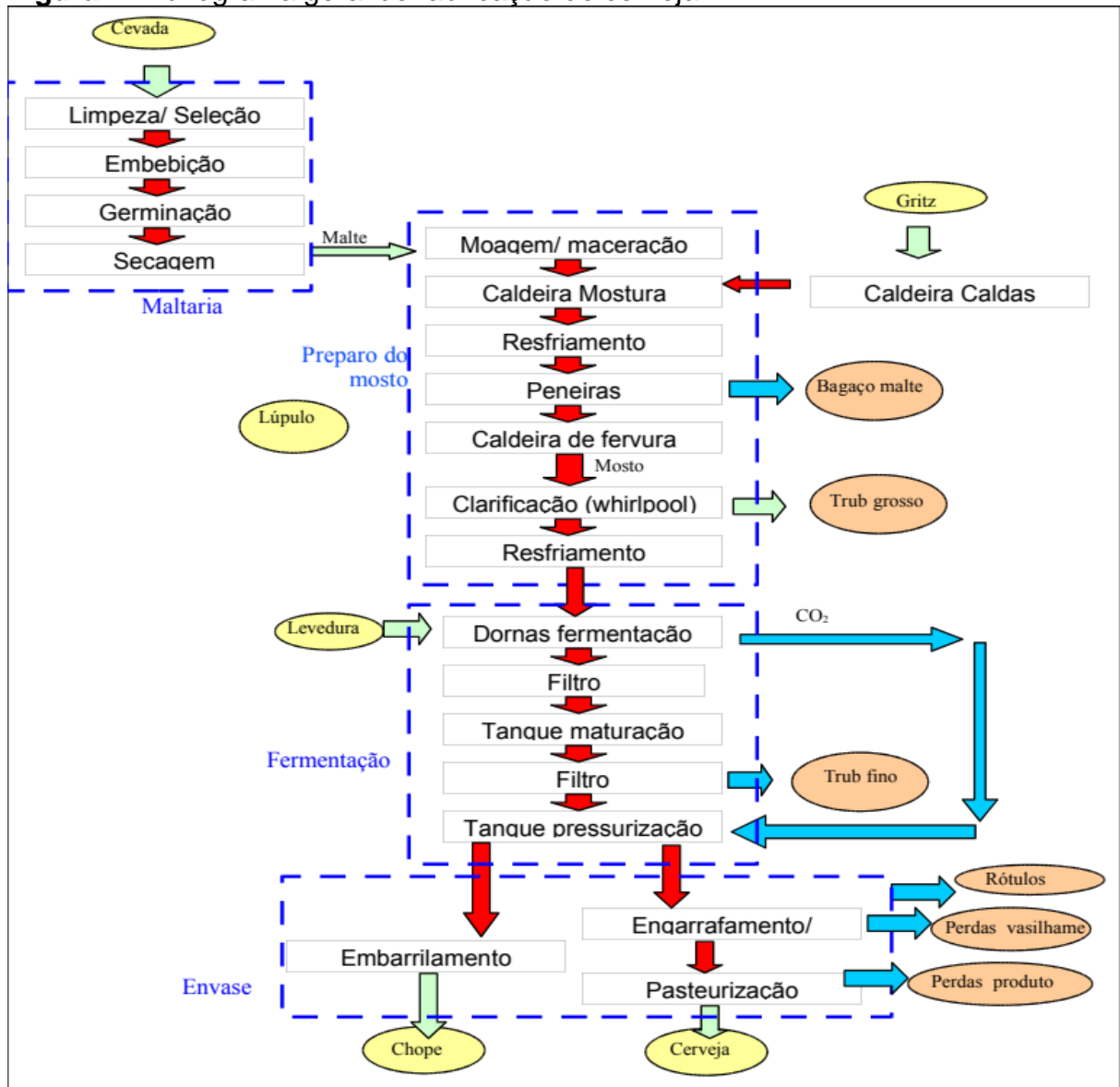
Já (MUXEL, A. A., 2022) narra em seu livro “*QUÍMICA DA CERVEJA*”, que a bebida por ter tanto tempo de história, o tema pode ser discutido em abordagens históricas, filosóficas, religiosas, políticas, econômicas, científicas, sensoriais, entre outras ou apenas ser consumida despreziosamente.

Por outro lado, com toda essa evolução, o setor cervejeiro e a indústria preservam as tradições e os processos envolvendo a produção de cerveja e suas

matérias-primas originárias (água, malte de cevada, lúpulo e levedura), dito isso, a legislação brasileira permite que parte do malte de cevada possa ser substituída por cereais maltados ou não, e por carboidratos de origem vegetal ou não, conhecidos como adjuntos (FILHO, W. G. V., 2010).

O processo para obtenção da cerveja envolve algumas etapas e ingredientes necessários, porém de modo geral, o malte de cevada é recebido e processado (moído), é adicionado com suas cascas mais íntegras possível (o malte é triturado a fim de expor o conteúdo interior, o amido, em contato com o líquido, a água, sem agredir e danificar a sua casca) em contato com a água, a uma temperatura determinada de acordo com a finalidade do produto final (corpo, textura, graduação alcoólica), efetua-se a maceração deste conteúdo e separa-se o mosto dos resíduos de grãos. Após isso, o mosto é submetido à fervura a fim de coagulação de proteínas, correção de cores e sabores, inativação de algumas enzimas e adição de lúpulos. Em seguida, efetua-se a separação do coagulado através de um processo denominado *Whirlpool*, seguidamente, o líquido obtido e resfriado, e destinado para a etapa de fermentação e maturação, posteriormente finalização no qual envolve os processos de filtração, armazenagem e envase como demonstra o fluxograma detalhado na figura abaixo:

Figura 1. Fluxograma geral de fabricação de cerveja



Fonte: (SANTOS; RIBEIRO, 2005).

III.2 Matérias-primas

III.2.1 Água

A água majoritariamente compõe cerca de 90% da composição da cerveja e é obvio dizer que este ingrediente não pode faltar na hora de produzir a cerveja. Torre (2022), detalha, a água representa cerca de 90% em uma cerveja e, por ser tão abundante, é de grande importância conhecê-la e saber como trabalhá-la para que seja a coluna de sustentação da nossa receita na hora de criá-la.

Muito da origem e história dos estilos de cerveja se explica pelas características da água da região de onde surgiram. A propósito, a legislação no Brasil, sob a Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021, estabelece que:

A água para o consumo humano deve ser potável destinada à ingestão, preparação de alimentos e higiene pessoal, independentemente de sua origem; água que atenda ao padrão de potabilidade estabelecido e que não ofereça riscos à saúde; e o padrão de potabilidade deve atender os valores permitidos para os parâmetros de qualidade da água para consumo humano conforme definido (Brasil, 2021).

Para a utilização no processo de fabricação de cerveja, a água passa por algumas denominações e/ classificações como: água cervejeira (utilizada diretamente no processo de fabricação do mosto cervejeiro), água de processo (utilizada em limpeza e desinfecção, CIP, limpeza de tanques e utensílios, dentre outros), e a fonte de origem da água utilizada (superfície, subterrânea, atmosférica, da rede municipal e do mar).

Ao utilizar uma determinada fonte de água, algumas medidas de controle devem ser tomadas pois as características químicas da água podem ter impacto diretamente na cerveja pronta, esses parâmetros são:

- Potabilidade – atender a Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021;
- pH – impacta diretamente processos fundamentais na fabricação de cerveja como na mostura, fervura, na cor do mosto, extração de componentes adstringentes, em ações enzimáticas em geral, na formação do trub quente, impactos na proteção microbiológica da cerveja;
- Dureza da água – medidos em concentração de íons cálcio e magnésio dissolvidos na água, podendo ser dureza temporária ou permanente;
- Alcalinidade – substâncias que são dissolvidas no mosto cervejeiro ou na água cervejeira com capacidade alcalinizante (hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos);
- Íons da água – deve-se efetuar uma análise detalhada aferindo as substâncias e íons dissolvidos na água, os principais são (cálcio, magnésio, ferro, zinco, sódio, potássio, cloreto, sulfato);
- Níveis de Oxigênio dissolvido – principal íon de aspecto negativo para a qualidade final da cerveja. Está diretamente ligado aos níveis de oxidação em várias etapas do processo de fabricação de cerveja.

III.2.2 Malte de cevada e adjuntos

Malte de cevada equivale a fonte de amido disponível no qual sob um processo térmico/ enzimático, disponibilizará fontes de carboidratos susceptíveis a

fermentação. O termo técnico *malte* define a matéria-prima resultante de germinação, sob condições controladas, de qualquer cereal (cevada, arroz, milho, trigo, aveia, sorgo, triticale etc.) (FILHO, W. G. V., 2010).

O grão de cevada, na maltaria, passa por processos de transformação bioquímica envolvendo as seguintes etapas: limpeza dos grãos, maceração, germinação, secagem, finalização.

O processo de malteação tem como objetivo converter ou modificar a estrutura física do grão de cevada e permitir a síntese ou ativação de uma série de enzimas, de modo que o produto final, o malte, seja mais facilmente aproveitado nas etapas subsequentes da fabricação de cerveja (MUXEL, A. A., 2022).

Adjunto cervejeiro compreende em carboidratos não maltados, encontrados na forma de grãos ou de xaropes, que podem ser suplementados ao mosto fornecendo fonte de açúcares fermentescíveis. Os adjuntos mais usuais são o trigo, milho, arroz e aveia. A inclusão de adjuntos na composição do “*grist*” pode alterar as propriedades sensoriais da cerveja podendo ser possível de produzir um novo produto sem precisar alterar a planta de produção cervejeira (MUXEL, A. A., 2022).

De acordo com a Instrução Normativa Nº 65, de 10 de dezembro de 2019, Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejeira:

Adjuntos cervejeiros são as matérias-primas que substituam, em até 45% em peso em relação ao extrato primitivo, o malte ou o extrato de malte na elaboração do mosto cervejeiro; consideram-se adjuntos cervejeiros a cevada cervejeira não malteada e os demais cereais malteados ou não-malteados aptos para o consumo humano como alimento. Também são considerados adjuntos cervejeiros o mel e os ingredientes de origem vegetal, fontes de amido e de açúcares, aptos para o consumo humano como alimento. A quantidade máxima empregada dos adjuntos cervejeiros definidos, em seu conjunto, deve ser menor ou igual a 25% em peso em relação ao extrato primitivo (BRASIL, 2019).

Em resumo, a inclusão do adjunto cervejeiro na composição de matérias-primas para obtenção de cerveja, não apenas pode ser uma alternativa para suplementação da cerveja, visto que pode ser um caminho trivial na busca por redução de custos, atribuição de sabores como no caso das cervejas de massa ou apenas na melhoria e otimização de processo uma vez que ao adicionar o adjunto em sua composição não precisa necessariamente efetuar um aumento na cadeia de processos industriais.

III.2.3 Lúpulo

O lúpulo, *Humulus lupulus* L., é uma planta perene e florida pertencente à família *Cannabaceae*. É a espécie mais difundida e a mais utilizada pelo homem, principalmente em seu emprego na indústria cervejeira, por possuir glândulas secretoras de lupulina (PAVENTI, *et al.*, 2020; DURELLO, SILVA, BOGUSZ JR., 2019).

No interior dos estróbilos das flores de lúpulo, é encontrado glândulas secretoras de lupulina, um tipo de pó resinoso e amarelo, de onde é extraído os principais componentes de interesses para as indústrias, mas majoritariamente de interesse de indústria alimentícia (Cerveja) pois através de suas resinas macias, extraem-se os componentes alfa-ácidos e beta-ácidos que respectivamente compõe os ácidos amargos e os polifenóis contidos na espécie vegetal (SILVA, 2019) como consta na figura 2 abaixo.

Sobre a composição química do lúpulo uma das maneiras de investigá-la é agrupar os metabolitos secundários produzidos pela planta em diferentes frações como, por exemplo, resinas totais, polifenóis, óleos essenciais, proteínas, ceras, esteroides, entre outros. (ALMAGUER, *et al.*, 2014).

É importante destacar que a composição química do lúpulo é complexa e envolve alguns fatores imprescindíveis encontrados em suas inflorescências secas antes das análises de quantificações químicas como é o caso dos diferentes tipos de variedade do lúpulo, o local e as técnicas de cultivo, o grau de maturação no momento da colheita, além de fatores pós-colheita como secagem, peletização e armazenamento (DURELLO, SILVA, BOGUSZ JR., 2019).

Figura 2. Flor de Lúpulo seccionado com destaque para a Lupulina



Fonte: Adaptado de (DURELLO, SILVA, BOGUSZ JR., 2019).

III.2.4 Levedura

As leveduras são microrganismos unicelulares, que pertencem ao reino *Fungi*, ou seja, taxonomicamente, é definida como um fungo pertencente ao gênero *Saccharomyces*; dentro deste gênero existem oito espécies identificadas a partir do sequenciamento de seu genoma (TORRE, L., 2022), possuem forma de reprodução assexuada por brotamento, e exibem metabolismo anaeróbio, no qual resulta-se em excreção de etanol, dióxido de carbono e calor. Da etimologia da palavra levedura, em inglês yeast (bem como seu equivalente holandês, gist), deriva da palavra grega zestos, que significa algo como “ferendo de quente” (KATZ, S. E., 2014).

O gênero *Saccharomyces* deriva duas espécies mais utilizadas dentro do meio cervejeiro que são a *Saccharomyces cerevisiae*, e *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*) (FILHO, W. G. V., 2010), responsáveis respectivamente pelo processo de fermentação e metabolização dos açúcares dos estilos de cervejas Ale e Lager.

Existem algumas diferenças que é preciso ser destacadas entre as duas espécies do gênero *Saccharomyces*. As leveduras *S. uvarum* (*carlsbergensis*) são utilizadas em cervejas Lagers, de baixa fermentação, floculentas, que decantam em sua atividade fermentativa trabalham em uma faixa ideal de temperatura de 8 – 16°C, produzem menores quantidades de subprodutos tornando-as cervejas com menos

complexibilidade e de caráter mais limpo. Na literatura, FILHO, W. G. V., (2010), descreve que esse tipo de espécie (Lager), uma das formas de diferenciação é a capacidade de metabolização do dissacarídeo Melibiose através da enzima alfa-galactosidase (Melibiase); ele detalha também que as cepas Lagers não apresentam crescimento em temperaturas acima de 34°C.

Já as leveduras do tipo Ale, da espécie *cerevisiae*, apresentam comportamento de alta fermentação, na faixa ideal de temperatura entre 18 – 22°C, apresenta formação de floculação em grandes complexos, uma das características é através da formação desses complexos, são adsorvidas pela liberação de CO₂ e são carregadas para a superfície do tanque de fermentação, em geral produzem maiores quantidades de subprodutos de fermentação deixando a cerveja final com características mais complexas em sabor e aroma. Na literatura, FILHO, W. G. V., (2010), descreve que esse tipo de espécie não apresenta o gene MEL, que metaboliza o dissacarídeo Melibiose, e apresenta também, outra característica de diferenciação, que é a sua capacidade de crescer a temperatura de 37°C.

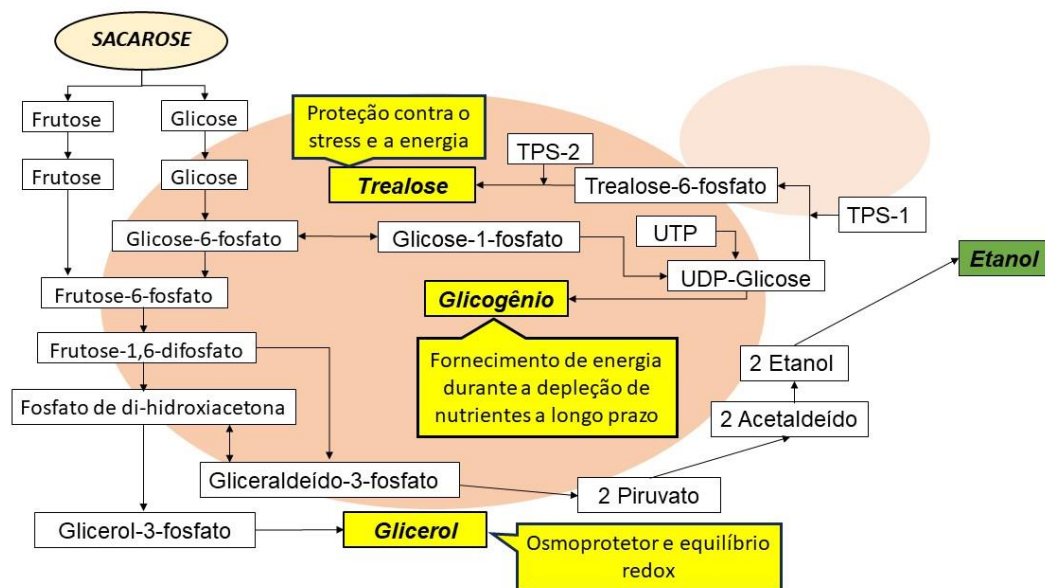
III.3. Fermentação

A capacidade das leveduras de fermentar açúcares em álcool representa o principal processo biotecnológico do mundo (WALKER, WALKER., 2018). Fermentação é a capacidade e a transformação do mosto cervejeiro (açúcares disponíveis no substrato), nos produtos álcool, CO₂ e calor por ação enzimática das leveduras presentes e tendo como produto final (neste caso), cerveja.

Para isso acontecer, uma série de reações bioquímicas estão envolvidas nisso, dentre eles o metabolismo respiratório aeróbio (responsável pela formação e produção de biomassa), e o fermentativo anaeróbio (metabolismo que tem como ação e produto final o etanol e o dióxido de carbono. Os carboidratos envolvidos na fermentação da glicose podem ser endógenos (glicogênio e trealose), como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros) fornecidos à levedura (PACHECO, T. F., 2010).

Na figura abaixo, é demonstrado a principal via metabólica etanólica que é a glicólise cujo objetivo principal da levedura é metabolizar o açúcar, gerando fontes de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato) sendo aderidas em diversas funções fisiológicas, e biossíntese necessária à manutenção da vida, crescimento e multiplicação.

Figura 3. Transformação da glicose no processo fermentativo alcoólico.



Fonte: Adaptado de (ANTONINI; COVRE, 2020).

III.3.1 Problemas na fermentação

Os problemas relacionados com a etapa de fermentação, não só estão ligados aos fatores da biossíntese do mosto como estão ligados diretamente à vários fatores que incluem os processos de obtenção e produção do mosto cervejeiro. Esse substrato, para realizar uma transformação bioquímica com qualidade é necessário o devido controle em etapas como:

- Aeração do mosto (ativação das leveduras através de microbolhas de oxigênio e construção da parede celular), sua dosagem inadequada pode ocasionar uma demora excessiva no início da fermentação (verifica-se o fator de arranque da levedura e a taxa de inóculo adequada via laboratório) e formação de diacetil, seu excesso pode ocasionar em fermentação descontrolada e rápida diante da alta carga de multiplicação de levedura ocasionando em baixa formação de ésteres, perda de extrato, espumamento, e altas taxas de formação de acetaldeído e álcoois superiores (KUNZE, 2004);

- Dosagem e inoculação de levedura: baixa dosagem (maior tempo para iniciar a fermentação, exposição maior do mosto às contaminações), dosagem elevada (alta taxa de fermentação, alta taxa de formação de CO₂, espumamento e maior risco à autólise) (KUNZE, 2004);

- Seleção correta da cepa: a cepa de levedura deve ser escolhida de acordo com as necessidades da fermentação e do produto final, para isso, leva-se em consideração os seguintes atributos: alta ou baixa fermentação, floculação, performance (tempo, capacidade de fermentação), propagação, resistência ao álcool e concentrações de extrato, capacidade de redução de pH, influência na espuma, perfil aromático (KUNZE, 2004);

Após essa parcialidade de possibilidades de problemas surgem os problemas que podem estar relacionados com a bioquímica da fermentação, problemas esses descritos a seguir:

- Controle da fermentação (extrato, temperatura, pH, diacetil, células em suspensão) (KUNZE, 2004);

- Metabolizações e reações bioquímicas (reações ligadas à redução do extrato, mudança de coloração, aumento na formação de álcool, redução de pH, redução de diacetil, formação de ésteres, álcoois superiores, aldeídos e outros subprodutos), formação e retenção de CO₂ (KUNZE, 2004);

- Assimilação de nutrientes do mosto: a assimilação de certos nutrientes do mosto é feita por uma complexa resposta da levedura à mistura complexa presente no meio (SILVA, 2019), dentro disso destacamos a captação de açúcares, compostos nitrogenados, lipídeos e íons metálicos;

- Estocagem de carboidratos como reserva de energia (glicogênio e trealose) atribuídos a eventuais períodos de escassez de nutrientes e/ou, quando a levedura se encontra sob *stress*, a produção destes compostos torna-se necessária na manutenção e sobrevivência, crescimento e perpetuação da espécie (SILVA, 2019).

Os subprodutos formados em caráter metabólico secundário da levedura, influenciam positivamente quanto negativamente no aroma e no sabor da cerveja (*on-flavor* e *off-flavor*). Ainda na literatura escrita por (KUNZE, 2004), é detalhado de forma clara e concisa os fatores que influenciam a produção de subprodutos da fermentação que são: ésteres, álcoois superiores, aldeídos, ácidos orgânicos, diacetil, compostos sulfurados, compostos fenólicos dentre outras reações e formações de compostos.

No entanto, Janish, S. (2021) em sua literatura resume de forma clara quais os parâmetros que podem ou não produzir mais ou menos álcoois e ésteres diante da fermentação conforme na tabela abaixo:

Tabela 1. Parâmetros para alteração de ésteres e álcoois.

Fundamentos	↑ Álcoois e ésteres	↓ Álcoois e ésteres
Temperatura de fermentação mais elevada	↑	
Presença de trub no fermentador		↓
Adicionar nutrientes de levedura no fermentador	↑	
Maior presença de oxigênio no fermentador		↓
Fermentação pressurizada		↓
Taxa de inóculo de levedura elevada	↑	
Fermentação com pH reduzido		↓
Aumento de temperatura em ápice de atividade de fermentação		↓
Redução de temperatura em ápice de atividade de fermentação	↑	
Fermentação de alta densidade	↑	

Fonte: Adaptado de Janish, S. (2021).

IV. METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão bibliográfica descritiva das publicações sobre a técnica de melhoramento e edição de material genético através do sistema CRISPR/Cas9, baseado sobre sua utilização em processos que envolvam fermentação de bebidas mas principalmente em fermentação de cervejas, e também, a fim de discorrer sobre seus mecanismos de atuação por meio de enzimas, por fim, uma breve explanação sobre o aspecto legislativo envolvendo a implementação de produtos alimentícios que utilizam destas técnicas.

Para isso, primeiramente foi adotado uma coleta de dados feita por etapas visando obter um material mais direcionado para cada assunto diante de cada subtítulo detalhado nos objetivos específicos deste trabalho.

Em Revisão da Literatura, adotou-se uma coleta seletiva priorizando obras de caráter físico, obras de literatura e artigos em formato digital para complementar itens não abordados nessas obras. O intuito estabelecido nesta etapa do trabalho, foi de elucidar sobre as características pertinentes a cada ingrediente e como funciona o processo de fabricação de cerveja, conduzindo até a etapa de fermentação pois é nesta fase que é encontrado os objetivos deste presente estudo.

Diante disso, não foi estabelecido intervalo de tempo pois, para cada tópico estabelecido nesta etapa, surgiu-se uma necessidade distinta, sendo assim, as buscas para esta revisão foram por acesso ao acervo bibliográfico físico particular, e pelo meio digital da Unesp por intermédio das bases de dados científicos Scopus, além da ferramenta de busca Google Acadêmico.

Os termos de busca utilizados nesta primeira etapa foram: Cerveja, produção de cerveja, legislação cervejeira, água, malte, lúpulo, levedura, fermentação.

A etapa posterior, onde encontra-se o propósito deste trabalho, adotou-se coleta de material abordando a temática da técnica de melhoramento genético CRISPR. Esta parte foi envolvida os três objetivos específicos do trabalho, por isso as buscas foram direcionadas para atender e alcançar tais objetivos propostos.

Com base nisso as buscas e coletas por materiais científicos foram adotadas através de acervo digital da Unesp utilizando bases de dados científicos Scopus, além da ferramenta de busca Google Acadêmico.

Além disso, para o refino das buscas foi utilizado os seguintes descritores escritos em inglês para ampliar as buscas: Fermentation, yeast, modified, CRISPR-Cas9.

Para esse propósito foi adotado três etapas antes de optar pelo uso do material. A interpretação e a leitura dos títulos do material coletado foi a primeira fase para a exclusão dos trabalhos que não se relacionavam com o tema. Posterior a essa exclusão, foi feita a leitura do resumo dos trabalhos, e em seguida uma seleção mais enfocada diante do tema apresentado, com pontos-chave que se enquadravam à essa pesquisa. Por último, a terceira etapa constitui-se na leitura integral dos trabalhos selecionados diante os objetivos específicos disposto nesse trabalho, sendo excluído o restante dos artigos.

Como critérios de inclusão, foram selecionadas publicações sobre CRISPR/Cas9, modificação genética em leveduras cervejeiras, engenharia metabólica em cepas de leveduras industriais, edição de leveduras por sequenciamento genético e legislação envolvendo organismos geneticamente modificados (OGMs).

Foi abordado nesta etapa da pesquisa temporão intervalo entre 2004 e 2024 pois, nestas datas a concentração de trabalhos e pesquisas relacionadas ao tema foi muito grande e ampla, contudo, os tópicos V.2 e V.3 abordados em Resultados e

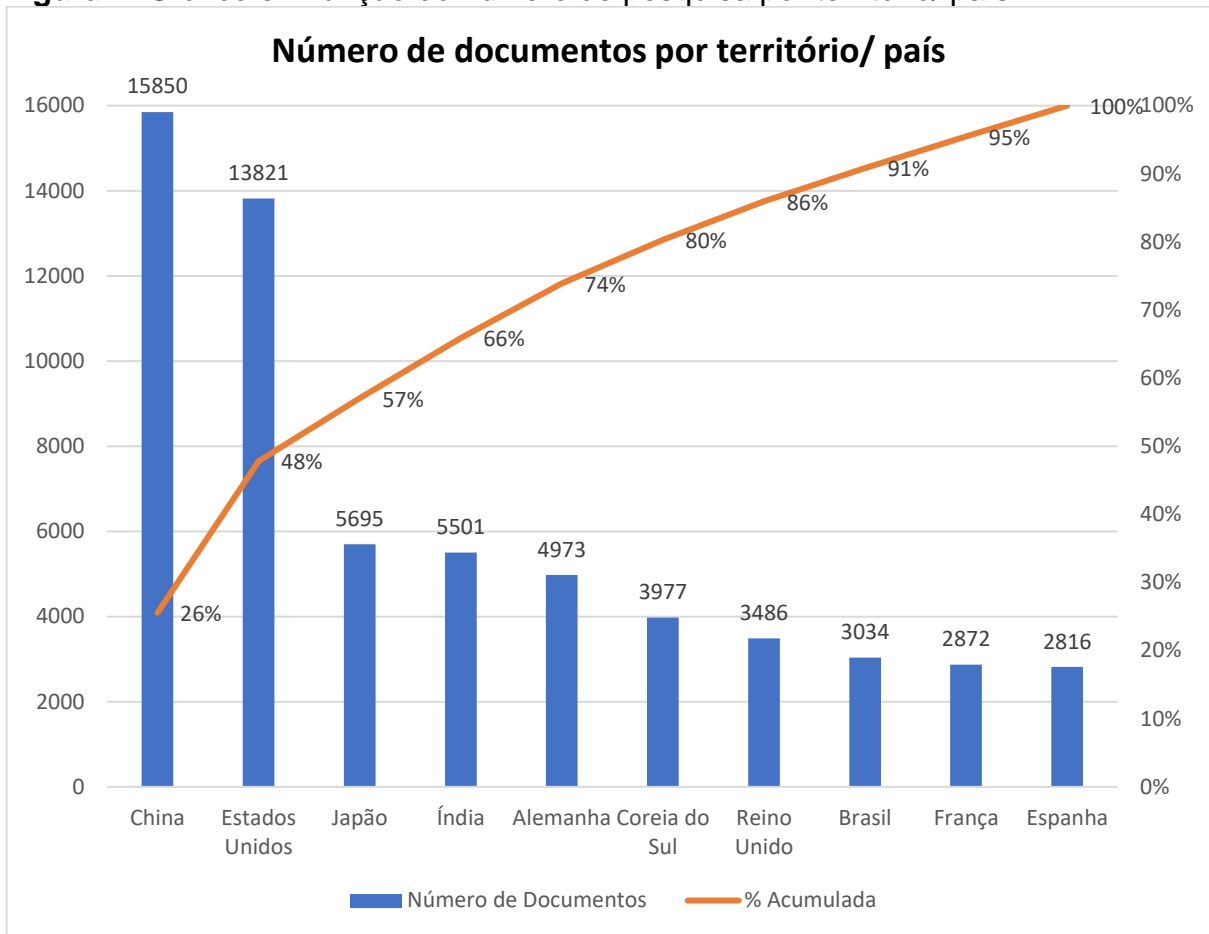
Discussão, o lapso temporal adotado foi entre 2014 e 2024 visto que, neste período ocorreram grandes descobertas relacionadas à técnica CRISPR.

V. RESULTADOS

Analisando os resultados obtidos inicialmente, as buscas originaram 221.653 documentos apenas com o descritor Fermentation sem horizonte de tempo. Utilizando a ferramenta de filtro por área nesse descritor podemos encontrar uma procura bem notável principalmente na área de bioquímica, genética e biologia molecular que representa 81.031 trabalhos do total inicialmente obtido, representando aproximadamente 37% do percentual total de trabalhos sobre fermentação.

Através desse limitador, analisando os números obtidos relacionados aos trabalhos por território, foi encontrado predominância de pesquisa nos países principalmente na China e Estados Unidos da América (EUA) como mostra a figura abaixo, representando 48% do total entre os 10 países principais produtores de materiais científicos relacionados aos descritores acima, somando um total de 29.671 trabalhos publicados entre os dois países, sendo que o total de trabalhos publicados para esses 10 países somam um total de 62.025 trabalhos publicados até o momento.

Figura 4. Gráfico em função do número de pesquisa por território/ país.



Fonte: Adaptado de Scopus.com

Fica evidente no gráfico acima, a corrida que os países China e EUA travam por conta de descoberta de novas tecnologias baseado nos números de trabalhos publicados, principalmente envolvendo áreas de bioquímica, genética e biologia molecular no qual trata-se o enfoque desta pesquisa.

Ainda interpretando o gráfico da figura acima, os EUA mesmo sendo o segundo país com o maior número de trabalhos publicados com 13.821 englobando os descritores de pesquisa Fermentation, mostra uma certa discrepância em relação ao primeiro colocado que é a China com um número de trabalhos publicados de 15.850 tornando-se o país líder em desenvolvimento acadêmico levando em conta apenas o número de trabalhos publicados referente aos descritores presentes nesta pesquisa, sem horizonte de tempo definido.

Adotando o critério de número de trabalhos por ano, foi encontrado uma discrepância em números de pesquisa relacionadas ao tema fermentação pois entre meados de 1967 a 1980, a média ponderada de números por ano era de 196 trabalhos

por ano, sendo que no ano de 1985 teve um salto para 556 trabalhos, no ano de 1996 um novo salto para 1045 trabalhos, atingindo seu pico em trabalhos publicados no ano de 2023 com 4500 trabalhos publicados englobando o tema de fermentação como mostra a figura abaixo extraída da base de dados científica Scopus.

Figura 5. Gráfico em função do número de trabalhos realizados por ano adotando o descritor Fermentation.



Fonte: Adaptado de Scopus.com

Diante desses dados foi utilizado o descritor em inglês Yeast como mais uma opção para apurar os resultados e buscas na plataforma Scopus e obteve-se o seguinte resultado: 32.209 documentos encontrados já limitados à área de bioquímica, genética e biologia molecular, sendo ainda liderados pelos países China e EUA como maiores produtores de conteúdo científico através deste tema abordado com os descritores Fermentation AND Yeast.

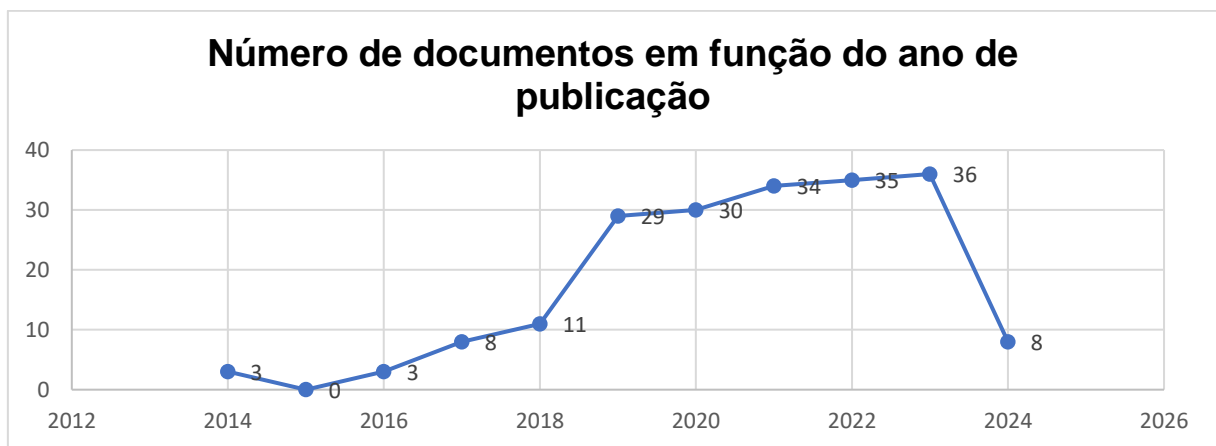
Utilizando mais um descritor para refinar e apurar os resultados, os números encontrados passam a ser: 4.183 trabalhos publicados sem horizonte de tempo, apenas limitados à área de bioquímica, genética e biologia molecular.

Por fim, o último descritor da pesquisa foi adicionado resultando nos seguintes dados: 197 documentos encontrados limitados à área de bioquímica, genética e biologia molecular sem horizonte de tempo definido porém os dados obtidos nessa última depurada, pôde-se perceber que apenas foram encontrados trabalhos com o limitador de tempo à partir de 2014, isso deve-se ao fato de que a técnica molecular através do sistema CRISPR/Cas9 tornou-se evidente nos anos de 2012 e em 2014 após os trabalhos publicados de (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014) que elucidaram

com detalhes os mecanismos de clivagem de DNA através de um mecanismo programável de RNA tornando-se essa tecnologia fácil de usar, aperfeiçoar, integrar, direcionar, regular e marcar células de interesse genômico.

Os dados da figura abaixo, representa o limitador de tempo obtido através do refino dos seguintes descritores em conjunto, escritos respectivamente em inglês: Fermentation AND Yeast AND Modified AND CRISPR/Cas9.

Figura 6. Número de trabalhos obtidos limitados ao intervalo de tempo através dos descritores Fermentation AND Yeast AND Modified AND CRISPR/Cas9.



Fonte: Adaptado de Scopus.com

Os dados representados na figura acima, mostra o ano em que o sistema CRISPR/Cas9 foi descrito em 2014 pelos pesquisadores (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014) e mostra a evolução no tempo em conformidade com os anos onde o crescimento do ano de 2015 passou de 0 trabalhos publicados para seu pico máximo em 2023 para 36 trabalhos com os descritores Fermentation AND Yeast AND Modified AND CRISPR/Cas9.

VI. DISCUSSÃO

VI.1 Alterações genéticas de Leveduras como melhorias no processo cervejeiro

A modificação genética é caracterizada por alterações resultando retirada ou introdução de características pertinentes com produção de novas substâncias (proteínas ou enzimas) (CORREIA, J. L. S., 2022), ferramenta essa utilizada através dos conhecimentos e avanços tecnológicos da bioengenharia e engenharia genética.

No estudo de (QUADROS; *et al*, 2018) é apresentado que as estratégias de edição gênica mais utilizadas são as que provocam uma deleção de DNA em um

local específico, e dito isso, detalha que essas características indesejadas do genoma são inativadas, e após isso, um mecanismo de reparo natural das células, as características indesejadas desaparecem completamente.

Mediante a esses avanços moleculares, viu-se a necessidade e a possibilidade de melhorias nas características das leveduras cervejeiras. Na literatura (STEWART, G. G., 2017) descreve que a primeira levedura modificada geneticamente em escala industrial foi aprovada em 1993 pelos Ministérios da Agricultura e da Saúde do Reino Unido através da técnica de DNA recombinante; o mecanismo adotado foi através de um estudo feito anteriormente onde foi identificadas características de glucoamilases desramificadoras em *Aspergillus niger*, que foram sensíveis ao calor; a cerveja produzida com essa levedura exibiu a denominação de “Nutfield Lyte”.

A técnica utilizada para modificação e edição de DNA se baseia em dois pontos principais que são o reconhecimento e a clivagem do DNA e após isso a cicatrização (o reparo) (CORREIA, J. L. S., 2022).

Dessa maneira, no estudo de (CARVALHO; BENTO; SILVA., 2006), é citado alguns artigos onde foi apontado quais os principais atributos a serem considerados em uma levedura como boa produtora de cerveja:

- Controle celular e otimizar o tempo de fermentação;
- Conversão total de açúcares disponíveis no mosto;
- Tolerância ao stress imposto sob diversas condições de fermentação;
- Floculação;
- Armazenamento, condições de viabilidade e vitalidade;
- Aumento na eficiência e produtividade da fermentação;
- Redução de custos com matérias primas
- Tempo de processo
- Melhora na qualidade das cervejas;
- Desenvolvimento de cervejas novas (sabores únicos).

Nesse mesmo estudo (CARVALHO; BENTO; SILVA., 2006), também é apontado as dificuldades no setor em aprovação de leveduras geneticamente modificadas que implicam quase exclusivamente em:

- Aprovação demorada por parte de leis regimentais;
- Disponibilidade de soluções alternativas;
- Aplicações de patentes;

- Preocupação na aceitação do consumidor.

Na figura abaixo, segundo a literatura de (STEWART, G. G., 2017), é exposto alguns fatores e melhorias que influenciam características de leveduras cervejeiras:

Tabela 2. Representação esquemática dos processos de melhorias a que foi submetida, sua especificidade e resultados obtidos.

Melhoria dos processos	Flexibilidade de matérias-primas	Novos produtos
Taxa/ velocidade de fermentação	Hidrólise de amido/ dextrinas	Baixos teores de carboidratos
Características da Floculação	Hidrólise da celulose	Alteração nos teores alcoólicos
Temperatura ótima	Metabolismo de Celobiose	Sabores específicos
Tolerância osmótica - cervejas de alta densidade	Utilização de Lactose	-
Tolerância alcoólica - cervejas de alta densidade	Utilização de maltose/ maltotriose	-
Taxa de crescimento	Maior utilização de adjuntos	-
Anti-infecção – leveduras zimocida (assassinadas)	-	-
Hidrólise de proteínas/polipeptídios – estabilidade na cerveja	-	-
Gestão de Diacetil	-	-
Controle na produção de ésteres, álcool superior e compostos de enxofre – gestão do sabor	-	-

Fonte: Adaptado de (STEWART, G. G., 2017).

Na revisão feita por (SAERENS; DUONG; NEVOIGT., 2010), obteve os seguintes resultados para o melhoramento genético em leveduras cervejeiras:

- **Melhor utilização dos nutrientes:** a maior parte de sua investigação se concentrou na melhoria da eficiência de maltose e maltotriose através da hidrolização de glicose por metabolização central do carbono das leveduras; os resultados para este teste foram em cepas que fermentaram mosto mais concentrado mais rápido e completo, produzindo cervejas com maiores níveis de álcool;

- **Floculação com base na remoção mais eficiente da biomassa:** a maior floculação depende da interação entre as adesinas e floculinas que são glicoproteínas codificadas pelo gene “FLO” (floculação). Enquanto o mosto conter açúcares, estas proteínas se ligarão competitivamente; porém as cepas construídas pelos autores não

demonstraram resultados positivos, não floclaram no momento correto acarretando demora significativas no processo de fermentação. Os autores ainda relataram que o maior desafio para floclação cronometrada corretamente tem sido a falta de promotores que possam ser induzidos em condições industriais no momento adequado.

- **Melhorias de sabor:** através da redução de sabores indesejáveis como formação do composto diacetil, sulfeto de dimetila (DMS), H₂S, sulfitos e ésteres. Eliminação do precursor metabólico a-acetolactato através de remoção do gene ILV2, porém os autores mostraram que tal levedura não desempenhou de forma positiva, resultando em má fermentação por incapacidade de sintetizar valina e leucina.

No estudo feito por (MOLITOR, R. W., 2022), foi utilizado uma cepa com alteração genética na enzima cisteína S-conjugada a beta-liase (*CSL – cysteine S-conjugate beta-lyase enzyme*) para a metabolização de moléculas precursoras de tióis melhorando significativamente os aromas e sabores da cerveja. Neste estudo foi relatado detalhadamente o mecanismo de ação da cepa alterada onde, levantaram a hipótese de que a enzima CSL em conjunto com a álcool aciltransferase (*AAT – alcohol acyltransferase*) aumentaria a produção do composto acetato de 3-mercaptohexil (*3MHA – 3-mercaptohexil acetate*). A cepa no estudo possuía baixa capacidade de biotransformação de compostos precursores de tióis antes de serem alteradas e, portanto, neste estudo foi concluído que as cepas geneticamente modificadas (GMs) catalisam um aumento substancial na conversão dos precursores de tióis sendo descrito que as cervejas produzidas foram classificadas como intensamente tropicais e frutadas associadas ao aroma de goiaba, manga, abacaxi, maracujá e aromas de suor.

Também no estudo de (DENBY, C. M., 2018), foi utilizado tecnologia de engenharia metabólica de vias biosintética para maximizar moléculas de monoterpenos aromáticos provenientes de expressão genética de manjerição e hortelã, que conferem sabores e aromas agradáveis de lúpulo na cerveja. As técnicas utilizadas neste trabalho foram através de metodologias guiadas por bioinformática para construção de plasmídeos e primers resultando na construção de um gene específico, adotando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação genética, e as cadeias codificadoras de genes heterólogos foram validadas por sequenciamento Sanger. Para a integração do gene plasmídico à levedura foi adotado técnicas envolvendo enzima Cas9 e RNA-guia único

(Cas9/sgRNA) e modelo de reparo, que teve como alvo uma quebra de fita dupla (DSB) na sequência 3' do DNA. Por fim esse trabalho demonstrou que as cepas construídas GM conferiram sabores de lúpulo às cervejas, e as cervejas produzidas foram percebidas como mais lupuladas dos que as produzidas de forma tradicionais.

VI.2 A Técnica CRISPR/Cas9

A compreensão de que a vida, organismos vivos, são feitos de células e essas células que contém informações, exercem funções cruciais e determinantes na replicação, transcrição e tradução, de características de um ser, essa descoberta assombrou a humanidade e foi um marco na história da biologia (dogma central da biologia molecular). As novas descobertas sobre funções do DNA como a dupla Hélice e os métodos químicos na síntese de DNA em fase sólida, permitiu a detecção e a exploração na organização do genoma (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

O desenvolvimento da tecnologia CRISPR/Cas9 que remete a técnica do Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Interespaçadas, surgiu através dos estudos em que avaliava o comportamento da imunidade bacteriana frente à uma infecção viral, e compreendia o seu mecanismo de defesa. Algumas bactérias possuem um sistema imune, chamado CRISPR, adaptado aos vírus, que lhes permite detectar o vírus e destruí-lo (SILVEIRA, *et al*, 2022).

Pode-se entender então que a técnica CRISPR/Cas9, é um sistema de defesa imunológica adaptativa, que foi encontrado em bactérias, pode ser programado para editar DNA de forma precisa e eficiente; permite aos cientistas cortar, editar e até mesmo substituir sequências específicas de DNA com uma precisão sem precedentes.

Na revisão de Doudna e Charpentier (2014) elas descrevem os mecanismos moleculares subjacentes na edição do genoma por Cas9 e revisa os rápidos avanços nesta tecnologia desde a sua publicação inicial em 2012.

Muitas das primeiras abordagens sobre a chamada edição de genoma, dependia do princípio de reconhecimento específico do local de sequências de DNA; o estudo sobre o reparo do DNA em bactérias e leveduras, como os mecanismos de recombinação de DNA, revelou que as células possuem mecanismos perfeitos para reparar a quebra da dupla fita de DNA, que em outras técnicas poderiam ser letais (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Por sua vez, CRISPR é um sistema *procariótico* de defesa antiviral, baseado em endonuclease guiada por RNA, capaz de inativar genes por meio da clivagem do DNA (PEREIRA, 2016).

VI.2.1 Moléculas envolvidas na técnica CRISPR/Cas9

Através da definição feita por (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014), em que CRISPR atua através da enzima Cas9 em função de um duplex de RNA (tracrRNA:crRNA) guiados por uma sequência guia (sgRNA), pareando com sequências alvo de DNA dando condições para a enzima Cas9 clivar ou introduzir uma sequência específica no local de interesse, é preciso elucidar o papel das enzimas e moléculas envolvidas neste processo.

Para isso, entender o funcionamento correto de atuação das enzimas e moléculas que estão envolvidas neste processo, torna-se um fator primordial para compreender como o direcionamento genômico e suas alterações em função do complexo de enzimas e moléculas intermediados por CRISPR/Cas9 funcionam nas aplicações práticas na manipulação genética.

VI.2.1.1 Endonuclease Cas9

A proteína Cas9, é uma endonuclease utilizada para a quebra de fitas duplas específicas de DNA (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). Essa enzima, é composta por um domínio duplo de nucleases, sendo cada um deles encarregados de cortar uma das fitas de DNA especificado e identificado pelo sistema CRISPR/Cas9 (CAETANO *et al.*, 2018).

No estudo feito por Molinari *et al.*, (2020), foi descrito como a enzima Cas9 faz o reconhecimento do sgRNA até encontrar a sequência PAM, seguido de atividade helicase na abertura das fitas de DNA, seguidos de pareamento molecular através de sgRNA.

Inicialmente, a enzima Cas9 reconhece o sgRNA por meio do seu lobo de reconhecimento (Rec). Uma vez formado, o complexo Cas9-sgRNA percorre a dupla fita do DNA-alvo até encontrar um sítio PAM, que é também reconhecido pelo lobo Rec da Cas9. Em seguida, a atividade helicase da Cas9 promove a abertura da dupla fita de DNA na posição imediatamente a montante de PAM, permitindo o pareamento de 20-24 nucleotídeos entre o DNA-alvo complementar e o sgRNA (MOLINARI *et al.*, 2020).

Desse modo, no estudo feito por Pereira, (2016), ele define a enzima Cas9 mais utilizada em células eucarióticas provenientes de *S. pyogenes*, também utiliza mecanismos de reconhecimento (Rec) e atividade nucleásica (Nuc) através de sua estrutura bilobulada.

A análise tridimensional da Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), que é a enzima mais comumente utilizada na edição do DNA de células eucarióticas, revelou que ela possui estrutura bilobulada: um lóbulo de reconhecimento (REC) e um lóbulo com atividade nucleásica (NUC). O lóbulo NUC consiste nos domínios catalíticos RuvC e HNH, além do domínio de interação com PAM (PI) (JINEK, M. *et al.*, 2012; PEREIRA, 2016).

Por sua vez, também foi elucidado no trabalho de Caetano *et al.* (2018), a maneira de como a enzima Cas9, em células eucarióticas, por não possuírem sistema que interliguem o tracrRNA:crRNA, foi inserido em célula alvo.

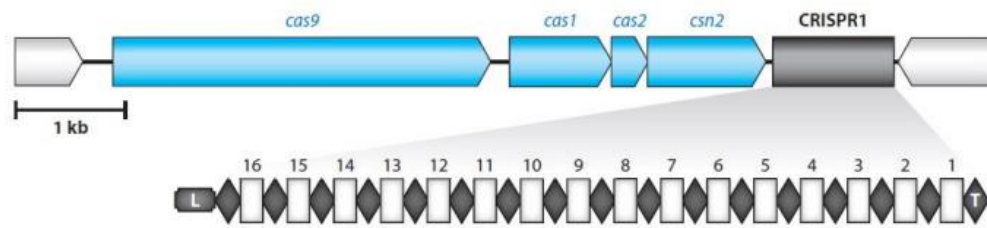
Devido ao fato de os eucariotos não possuírem a maquinaria necessária para ligação do tracrRNA e crRNA, um gRNA (RNA guia) foi desenvolvido e direcionado para uma sequência alvo específica e então este é inserido na célula alvo juntamente com a Cas9. Desta forma, o gRNA realiza o reconhecimento da sequência presente no DNA alvo e permite que a cas9 clive o sítio de interesse, possibilitando a inserção da sequência desejada através de recombinação homóloga (PEREIRA, 2016).

Como visto nos últimos anos, as pesquisas relacionadas à modificação genética em células procariontes e eucariontes, destacam que a enzima Cas9 atua como principal nuclease a fim de clivar o DNA invasor mostrando satisfatoriamente que o sistema CRISPR trata-se de uma importante ferramenta atribuída a engenharia genética moderna possibilitando inúmeras probabilidade na edição de genoma com sucesso.

VI.2.1.2 Locus CRISPR

Locus é interpretado como uma região específica mapeada dentro de um genoma. No sistema CRISPR, ou mais precisamente, no Locus CRISPR, os genes Cas estão localizados em arranjos contidos em uma sequência de repetições e espaçadores CRISPR, codificando proteínas que estão diretamente envolvidas na interação neste sistema com o DNA.

Figura 7. Visão geral de um Locus do sistema CRISPR/Cas.



Fonte: Adaptado de (NOGUEIRA, 2015).

Na figura acima, as porções repetitivas e os espaçadores são representados por losangos pretos e retângulos cinzas, respectivamente. Os números indicam a ordem nos quais os espaçadores foram adquiridos ao longo do tempo (NOGUEIRA, 2015).

VI.2.1.3 crRNA e tracrRNA

O RNA CRISPR ou melhor, RNA derivado de CRISPR (*CRISPR-derived RNA*) corresponde à um polinucleotídeo curto, decorrente da transcrição do material genético invasor que é acoplado juntamente ao Locus CRISPR. O RNA-transativador (tracrRNA) é derivado do loco CRISPR, quando é acionado molecularmente, possui cooperação com crRNA na formação do complexo tracrRNA:crRNA que resulta na formação do precursor do RNA-guia único representado pelo pré-RNA.

Posterior a isso, esse complexo se tornará um precursor do RNA-CRISPR (ou então pré-RNA), que contém várias sequências repetidas intercaladas por vários espaçadores localizada em um único RNA mais extenso e integrando outros complexos para mais tarde em sua maturação, derivar diversos fragmentos de crRNA maduros. Esses fragmentos maduros vão atuar mais adiante como uma memória contra invasores, agindo similarmente como memória imunológica do hospedeiro.

Pereira (2016), em seu livro especifica os detalhes deste recurso adotado no sistema CRISPR/Cas9 na etapa de biogênese:

A transcrição deste loco gera um “precursor do RNA de CRISPR” (ou pré-crRNA), contendo várias sequências repetidas e vários espaçadores em um único RNA longo. Em seguida, esse pré-crRNA é processado, dando origem a diversos RNAs menores – os crRNAs –, cada qual correspondendo a um espaçador distinto (MAKAROVA *et al.*, 2011; PEREIRA, 2016).

Além disso, esse complexo entre tracrRNA:crRNA atua auxiliando no direcionamento molecular da endonuclease Cas9 até o material genético invasor (CAETANO, G. C. G. *et al.*, 2018).

VI.2.1.4 sgRNA

Por sua vez, o sgRNA originado da sigla em inglês (*single guide ribonucleic acid*) significa RNA-guia de fita única. Por definição segundo Molinari *et al.*, (2020), trata-se de uma fusão quimérica entre o tracrRNA:crRNA para unir e acumular funções em sua estrutura molecular, que adere à função de transportar a endonuclease Cas9 ao seu alvo, executando suas funções.

Assim, essa integração entre o crRNA e o tracrRNA, onde o crRNA é constituído por uma sequência CRISPR derivada do locus CRISPR (pequenos fragmentos de DNA exógeno integrados ao locus CRISPR sendo denominada de *spacer*), complementar à uma sequência de DNA alvo (*protospacer*). Entretanto, para esse propósito, o tracrRNA é composto por um arranjo molecular dotado de três grampos para reconhecimento da enzima Cas9, e mais um grampo para a finalização da transcrição, formando assim o complexo denominado sgRNA, ou seja, RNA-guia, que guiará esse complexo até a sequência de DNA alvo intitulada de sequência PAM.

No estudo feito por Mcvey *et al.* (2022), nos dão detalhes de como é feita a interação e integração entre RNAs dando origem ao sgRNA citado logo abaixo:

O sgRNA é composto por duas seções, a alça em gancho de tracrRNA que liga Cas9 e a sequência de crRNA projetada para ser complementar à sequência de DNA alvo. O sgRNA varre o genoma, emparelhando-se com a sequência alvo e recrutando Cas9 para aquele local (MCVEY, S. L. *et al.*, 2022).

Contudo, para o correto funcionamento de suas ações, o sgRNA que é composto pelo tracrRNA, quando ocorre o dobramento de seus grampos que são constituídos de uma sequência-guia de aproximadamente 20 nucleotídeos ligantes à extremidade 5' do DNA alvo (região localizada aproximadamente ao sítio PAM, no qual é conhecida também como região *seed*) e mais uma sequência ligante denominada universal de aproximadamente 80 nucleotídeos ligadas na região 3' no grampo de finalização da transcrição da enzima Cas9.

No artigo elaborado por (CAETANO, G. C. G. *et al.*, 2018) nos traz detalhadamente como é feito a identificação do DNA alvo através do pareamento entre o sistema da Cas9 no sistema CRISPR.

O crRNA foi projetado como um RNA guia único (sgRNA) com duas características, a sequência de 20 nucleotídeos na extremidade 5' do sgRNA que determina o local alvo do DNA pelo pareamento Watson-Crick, e estrutura de cadeia dupla no lado 3' da sequência que se liga a Cas9. Isso criou um sistema simples de dois componentes, no qual alterações na sequência guia do sgRNA podem ser usadas para programar CRISPR-Cas9 para atingir sequência do DNA de interesse, desde que seja adjacente a um PAM (CAETANO, G. C. G. *et al.*, 2018).

VI.2.1.5 Sequência PAM

Na literatura a sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), traduzindo do inglês significa motivo adjacente ao protoespaçador. Esse motivo pode ser interpretado como um marcador alvo. Quando a enzima Cas9 é guiada ao seu destino, primeiramente no ato da varredura de seu alvo, ela identificará o sítio PAM, para assim se emparelhar a sequência de DNA de interesse a ser manipulada.

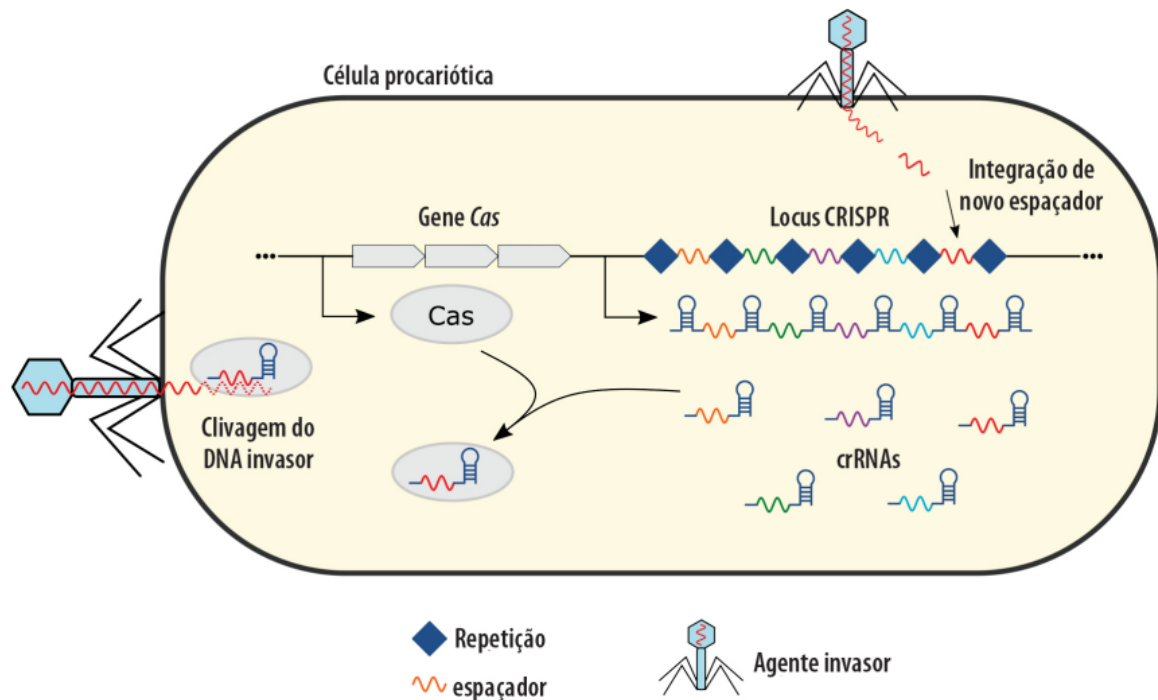
Na literatura, Pereira (2016) descreve que o complexo Cas9/sgRNA irá interagir com o alvo apenas se houver um motivo PAM adjacente na outra fita de DNA; além disso, ele evidencia quais as características e funções desse marcador “PAMs são sequências curtas, geralmente de 2-5 nt (e.g., 5'NGG3' e 5'NNGRRT3'), essenciais para a ancoragem da nuclease ao sítio de clivagem”.

Já Molinari *et al.*, (2020), em sua literatura descreve o exato mecanismo de ação que o complexo sgRNA/Cas9 executa ao identificar o sítio PAM para o processo de clivagem do DNA, descritos conforme o tópico acima “Endonuclease Cas9”.

VI.2.2 Mecanismo de ação (Cas9/ sgRNA)

O sistema CRISPR/Cas9, é um sistema aprimorado do dispositivo de defesa utilizado por procariotos (bactérias e arqueas) contra o ataque de vírus e plasmídeos, permitindo a inativação dos ácidos nucleicos (DNA) do invasor, através do mecanismo de clivagem, inativando-o seu ciclo (WIEDENHEFT *et al.*, 2012; KOONIN; MAKAROVA, 2013; MOLINARI *et al.*, 2020).

Figura 8. Representação esquemática onde o Locus CRISPR integra o genoma viral como um novo espaçador em seu próprio Locus CRISPR.

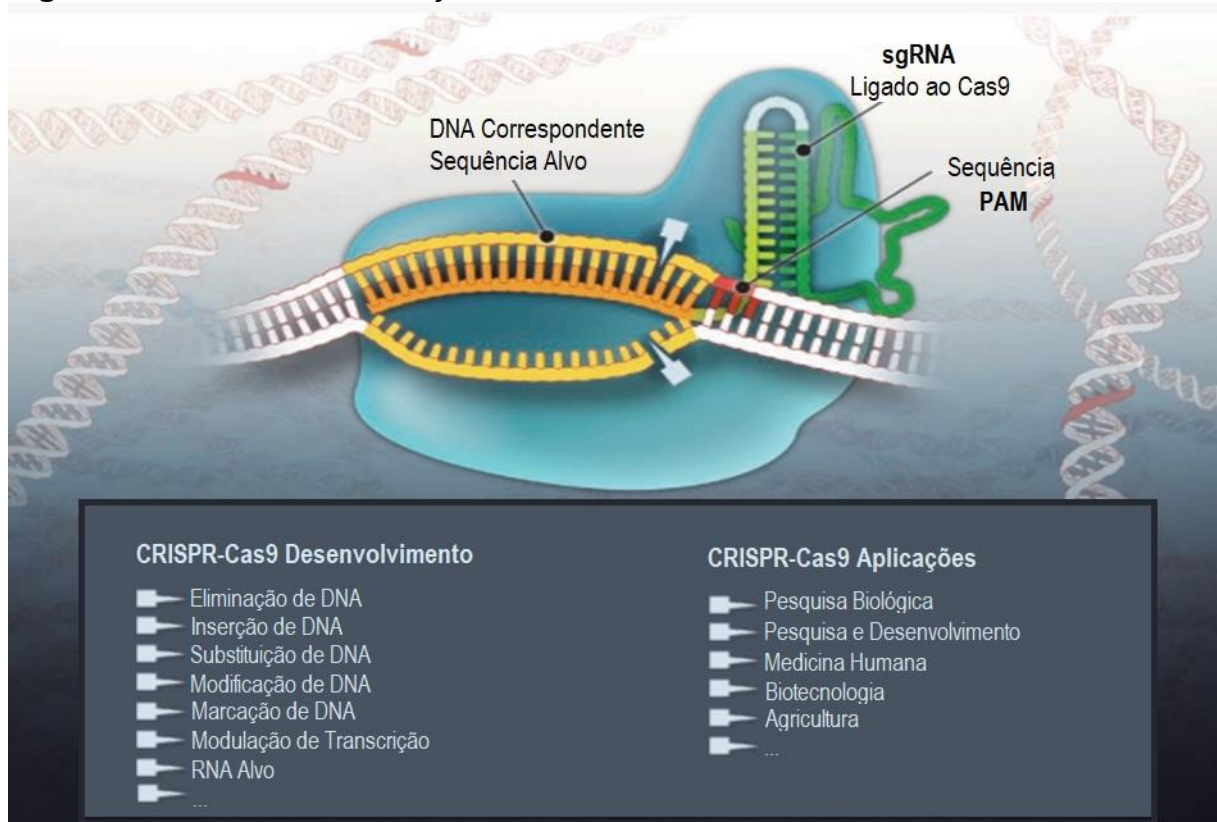


Fonte: (MOLINARI *et. al.*, 2020).

Com isso, a memória imunológica criada pelo crRNAs, quando ocorre uma nova invasão, age semelhante ao sistema de imunidade ativa e adquirida, inativando através da clivagem o material genético do invasor interrompendo sua proliferação.

A tesoura molecular dentro do processo de edição genética, é representada pela figura logo abaixo, através da enzima Cas9 (azul). Por entre seus dois centros catalíticos, é realizado cortes na dupla fita de DNA, com isso, é dividido em um determinado ponto de interesse localizado próximo a uma sequência de nucleotídeos (sequência PAM, em vermelho). Para essa precisão, a Cas9 manuseia uma sequência de 20 nucleotídeos (laranja), proveniente do RNA guia único (sgRNA). O RNA representado na parte verde da figura, destaca-se o RNA guia único (sgRNA), o derivado da dupla fita de RNA provindo da sequência de RNA CRISPR, é representado em verde claro, e o RNA transcrito (tracrRNA) se junta estabilizando a proteína Cas9, representado pelo verde escuro. Quando essa quebra é identificada, ocorre o desencadeamento e a ativação da enzima para o reparo, corrigindo e substituindo sequências de DNA no local da quebra. Esse é o mecanismo preciso da edição de DNA pelo complexo CRISPR/Cas9 (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Figura 9. Mecanismo de atuação da enzima Cas9 na técnica CRISPR/Cas9.



Fonte: Adaptado de (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

VI.2.3 Reparo do DNA

Para toda ação executada pela endonuclease Cas9, como é o caso das ações sítio dirigidas, que funciona através atuação em clivar uma molécula de interesse em seu alvo marcado por uma sequência PAM, o recrutamento intrínseco das engrenagens moleculares para o reparo de DNA é executado. Para isso, os cortes que foram realizados molecularmente precisam ser reparados através de mecanismos de ação via junção de extremidades não homólogas (NHEJ) ou através de vias de reparo direcionado por homologia (HDR) ou apenas reparo por homologia (HR).

A quebra na dupla fita de DNA pode ser reparada por NHEJ ou HR, resultando na edição do gene, por meio de inserções ou deleções (SATHEESH *et al.*, 2019; MOLINARI *et al.*, 2020).

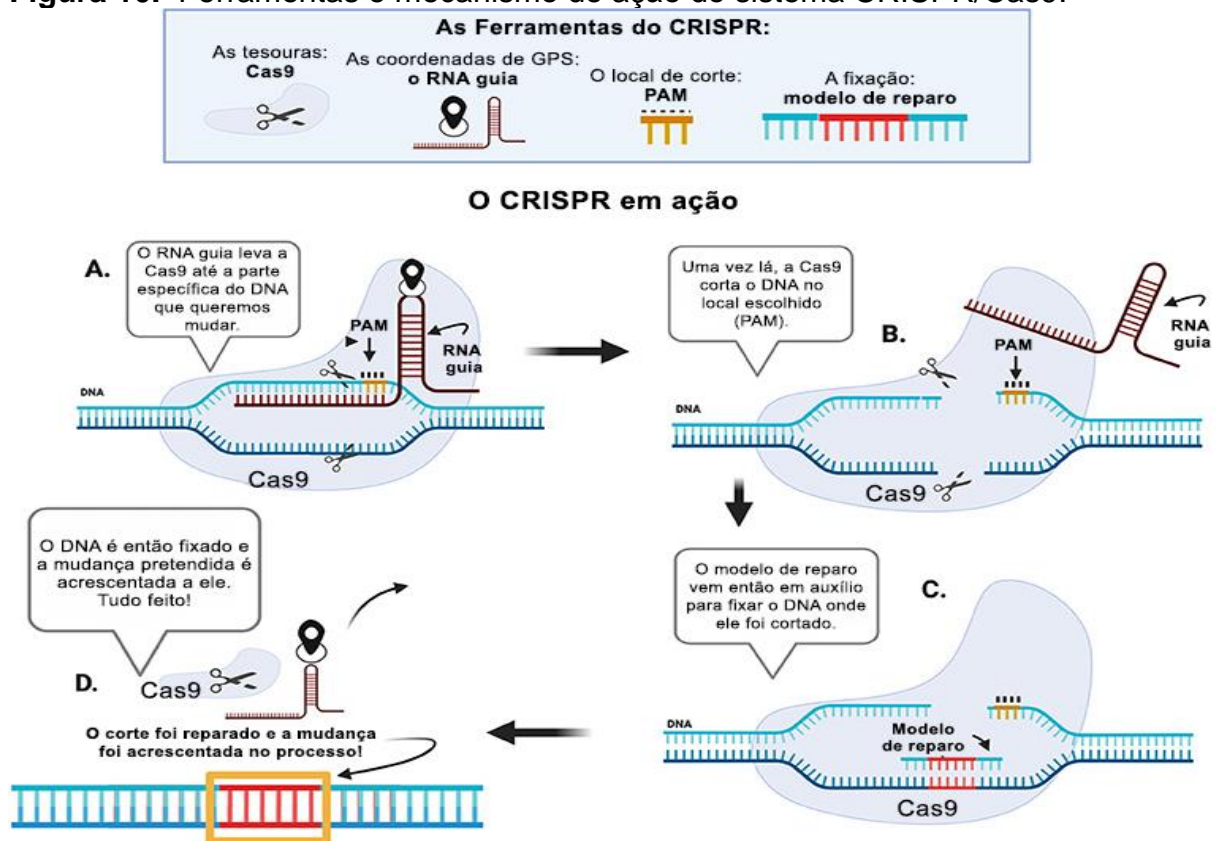
A ação realizada por NHEJ é mais comum em células eucariontes, entretanto, a via por NHEJ tende a produzir *indels* (pequenas inserções ou deleções localizadas aproximadamente do sítio de ação da clivagem do DNA-alvo da Cas9), apesar disso, a via de reparo homóloga (HR) permite um direcionamento com alta finalidade e inserção de sequências de interesse na região editada (MOLINARI *et al.*, 2020).

NA revisão feita por (MALZAHN *et al.*, 2017), é descrito que uma quebra de fitas duplas no DNA (*DSB - double-strand breaks*) ocorre naturalmente por intervenções a fatores exógenos e endógenos nas células e que esse é o mecanismo mais letal de dano ao DNA e deve ser reparado antes de sua replicação. Dito isso ele define as vias de reparo celular principalmente em eucariotos através das vias NHEJ e HDR.

O reparo feito por NHEJ as extremidades clivadas do DNA são ligadas por um conjunto de proteínas diferentes e seguidas por uma ligase. Esse reparo nesta via pode ser executado sob mecanismos distintos, um clássico e um alternativo. O clássico liga-se sem homologia resultando *indels*; o alternativo as regiões 5' do DNA são cortadas até que por micro homologias as saliências da região 3' são criadas e ligadas. Já o reparo dirigido por homologia (HDR) é dependente de um molde de DNA homólogo para efetuar o reparo, normalmente não estão disponíveis naturalmente, mas modelos sintéticos estão disponíveis e permitem a inserção, substituição, marcação ou a mutação de um determinado Gene (MALZAHN *et al.*, 2017).

Com isso, o ciclo entre as ferramentas (enzimas compostas pelo sistema CRISPR/Cas9) são elucidadas e demonstradas na figura abaixo onde a tesoura molecular (Cas9), o RNA guia (sgRNA), o motivo alvo (sítio PAM) e o reparo (NHEJ ou HDR) são demonstrados respectivamente através da sequência das letras A, B, C e D:

Figura 10. Ferramentas e mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas9.



Fonte: Adaptado de (MARNIK, E. *et al.* 2021).

VI.3 Regulamentação da edição genômica em alimentos no Brasil

Hoje no Brasil, a Comissão Técnica de Biossegurança – CNTBio, órgão regulador técnico que compete e determina no uso de suas atribuições legais os requisitos técnicos para avaliar metodologias e abordagens em materiais biológicos e microrganismos que sofreram introdução de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP), sob os preceitos da legislação vigente atribuídos na Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, que define moléculas de ADN/ARN recombinante, engenharia genética e organismo geneticamente modificado - OGM nos incisos III, IV e V de seu art. 3º, respectivamente; também exerce seus atributos sob Resolução Normativa Nº16, de 15 de janeiro de 2018, que estabelece os requisitos técnicos para apresentação de consulta à CTNBio sobre as Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (CTNBio, 2018).

Sob essas condições, e de acordo com a atualização do site do CTNBio, onde são divulgadas atualizações, legislações e documentações principalmente na questão sobre as TIMP, na data de 08 de junho de 2018, foi disponibilizado o primeiro parecer técnico da Comissão Técnica Nacional De Biossegurança Ministério da Ciência,

Tecnologia e Inovação (CTNBio) envolvendo a técnica CRISPR/Cas9 com liberação comercial de uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* porém, empregada em processos de obtenção de bioetanol sob altas concentrações de melação de cana como substrato fermentativo.

No estudo feito por Quadros *et al.* (2018), ele destaca o mesmo parecer técnico realizado pelo CTNBio em função da liberação comercial da cepa “Excellomol 4.0”, editada por CRISPR/Cas9, pela empresa GlobalYeast; e destaca também a urgência e a relevância em discutir e implementar mudanças nas diretrizes e legislação bem como à disrupção tecnológica que essas técnicas TIMPs irão promover no mercado.

Segundo Molinari *et al.* (2020) e a RN16, para um produto não ser considerado GM deve se enquadrar nos seguintes critérios:

- 1) ausência de DNA/RNA recombinante; 2) presença de elementos genéticos que poderiam ser obtidos por cruzamento; 3) presença de mutações induzidas que também poderiam ser obtidas por técnicas estabelecidas, como exposição à radiação ou química; e 4) presença de mutações que poderiam ocorrer naturalmente (MOLINARI *et al.*, 2020).

Ainda em sua literatura, Molinari *et al.* (2020) conclui que produtos (alimentos, plantas, microrganismos) que sofreram abordagens de TIMPs cujo produto final não contenham DNA exógeno, não devem estar sujeitos aos requisitos de análise de risco como os OGMs portanto são passíveis de liberação para uso comercial via CTNBio em função da RN16 que define que os produtos devem atender às características estabelecidas para classificação como organismos não GM.

VII. CONCLUSÃO

A ferramenta de melhoramento genético através do sistema CRISPR/Cas9 mostra-se muito promissora diante da perspectiva científica, uma vez que possibilita deleções e alterações genéticas significativas em células e microrganismos de interesse industrial e principalmente em leveduras cervejeiras apresentado neste trabalho.

Por se tratar de uma técnica que apresenta certa facilidade, rapidez e baixo custo frente à outras técnicas moleculares, desperta muito interesse na comunidade científica, porém, cabe ainda elucidação sobre seus mecanismos de ação e suas adaptações, uma vez que, seu reparo apresentou *indels* por via de reparo NHEJ, e

necessidade de um molde de DNA homólogo exógeno para o reparo sob a via por HDR.

Os resultados apresentados nesse trabalho como melhorias no processo para obtenção de cerveja, mostraram ser parcialmente satisfatórios uma vez que, apenas as cepas modificadas para melhoria em utilização de nutrientes e de melhorias sensoriais referentes à aromas e sabores de lúpulo atingiram o resultado esperado.

Trata-se de uma técnica recente, com isso, os resultados para deleções efetuados pelo sistema CRISPR/Cas9 em microrganismos (nesse caso leveduras) são apresentados como satisfatórios, e seu mecanismo de ação é elucidado completamente eficaz, e através disso algumas cepas comerciais já foram aprovadas e liberadas para o uso aqui no Brasil, assegurados pela legislação sob a RN16 que classifica como organismos não GM os produtos que sofreram abordagens de TIMPs cujo produto final não contenham DNA exógeno sendo executados e avaliados através do CTNBio.

Cabe ainda, sob essa perspectiva ressaltar que, a legislação brasileira deve acompanhar os resultados e seus impactos frente às necessidades estabelecidas no setor industrial, pois essa demanda impacta diretamente na redução de custos, redução de matérias-primas e eficiência nos processos de obtenção de produtos.

A partir dos produtos já estabelecidos e lançados no mercado internacional, é de extrema urgência que as leis nacionais evoluam para que o Brasil também se torne competitivo nesse mercado através das técnicas para melhoramento genético, principalmente em alimentos.

VIII. PERSPECTIVAS

Tratando-se de alterações e melhoramento genético de leveduras sob a técnica CRISPR pode-se esperar uma revolução na questão de novos produtos, visto que, no mercado mundial já foram apresentados diversos produtos de laboratórios e fabricantes diferentes, dentre eles destacam-se leveduras GM dos laboratórios Berkeley Yeast, Escarpment Labs e Ômega Yeast.

Esses laboratórios vêm se destacando principalmente no mercado das cervejas artesanais no qual a demanda por produtos singulares é crescente e além dos produtos tradicionais como cepas que já são trabalhadas no Brasil, são apresentadas cepas GM modificadas como:

- Cepas produtoras de enzima CSL (carbono-enxofre-liase) que expressa aromas e sabores provenientes da metabolização de precursores dos Tióis;
- Cepas produtoras de enzima ALDC (alfa-acetolactato descarboxilase) que decompõe o precursor de diacetil convertendo-o em acetoína;
- Cepas produtoras de ácido láctico e etanol permitindo acidificação rápida no fermentador sem a necessidade de um processo adicional como o Kettle-souring e CIP adicionais;
- Cepas produtoras de terpenos linalol, geraniol e citronelol durante a fermentação, principais determinantes de sabores e aromas de lúpulos, porém sem amargor. Essas cepas permitem a redução da adição de lúpulos no processo de produção de cerveja principalmente na etapa de Dry-hopping.

Como sugestão e perspectivas, esse trabalho bibliográfico possibilita a ampliação de estudos focados e práticos principalmente nas questões da técnica CRISPR em modificações de leveduras com a finalidade de promover evolução nos produtos que já possuem demandas a serem preenchidas como é caso do mercado das cervejas artesanais (segmento Kraft).

Abaixo serão descritos alguns pontos de possíveis estudos futuros:

- Sob o enfoque climático, alterações via CRISPR para a produção de cepas termotolerantes e boas produtoras de cerveja através de inserções genética dos fenótipos resistentes à altas temperaturas possibilitando testes fermentativos para avaliar a evolução sensorial dos produtos obtidos por estas cepas;
- Sob o enfoque terpênicos, construção de cepas que possibilitem aromas encontrados na natureza através da análise genômica e inserção via CRISPR visando o desenvolvimento de linhagens de cepas que poderão ser disponibilizadas no mercado frente à uma evolução legislativa.
- Sob o enfoque hipotético e enzimático, construção de cepas com alterações metabólicas alternativas às criadas já no mercado (*ALDC* e *CSL*) visando soluções para as questões sobre redução de diacetil, redução de tempo de fermentação, aumento na capacidade de metabolização de nutrientes, reações ligadas à redução do extrato, mudança de coloração, aumento na formação de álcool, redução de pH, formação de ésteres, álcoois superiores, aldeídos e outros subprodutos.

Por último, vale ressaltar que esses resultados sob o olhar industrial mediados pela ciência, podem contribuir no desenvolvimento de possíveis novos produtos e que os problemas solucionados pela evolução da técnica CRISPR possa atender a

demanda já esperada no setor cervejeiro tanto nas grandes quanto nas pequenas indústrias; e que esses resultados contribuam para o esclarecimento da modulação genética que essa técnica oferece.

IX. REFERÊNCIAS

- ALMAGUER, C. *et al.* Humulus lupulus: a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014.
- ANTONINI, S. R. C.; COVRE, E. A. From backer's yeast to genetically modified budding yeasts: the scientific evolution of bioethanol industry from sugarcane. **FEMS Yeast Res.**, v. 20, n. 8, 2020.
- AREND, C. A.; PEREIRA, J. O.; MARKOSKI, M. M. O Sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia. **Arq Bras Cardiol.** V. 108, n. 1, p. 81-83, 2017.
- BARBOZA, C. M. S. *et al.* A técnica de crispr-cas9 na terapia gênica: uma revisão da literatura. **Revista Transformar.** V. 13, n. 1, jan./jul., 2019.
- BIZAJ, E. *et al.* A breeding strategy to harness flavor diversity of Saccharomyces interspecific hybrids and minimize hydrogen sulfide production. **FEMS Yeast Res.** v. 12, p. 456–465, 2012.
- BRASIL. Decreto nº 9.902, de 8 de julho de 2019. Altera o Anexo ao Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. 2019.
- BRASIL. Instrução Normativa Nº 65, de 10 de dezembro de 2019, Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. **Diário Oficial da União**, Vol. Seção 1, p. 31. 2019.
- BRASIL. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2017.
- CAETANO, G. C. G. *et al.* Técnica CRISPR-CAS9 e sua utilização na área laboratorial. **Braz. J. Surg. Clin. Res**, dez. 2018 – fev. 2019, v. 25, n. 2, p. 96-99, 2018.
- CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – as leveduras. **Revista Analytica**, out. – nov., n.25, 2006.
- CORREIA, J. L. S. **Prospecção de Enzimas do Complexo CRISPR/Cas a partir do Microbioma Intestinal do Cumpim *Syntermes wheeleri***. Brasília – DF, 2022, 50p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade de Brasília.

CTNBio. Comissão Técnica Nacional De Biossegurança Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018:** Estabelece os requisitos técnicos para apresentação de consulta à CTNBio sobre as Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão. Disponível em: < http://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas?p_auth=sd3wPJI&p_p_id=101_INSTANCE_OgW431Rs9dQ6&p_p_lifecycle=1&p_p_state=exclusive&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=3&_101_INSTANCE_OgW431Rs9dQ6_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fexport_journal_article&_101_INSTANCE_OgW431Rs9dQ6_groupId=566529&_101_INSTANCE_OgW431Rs9dQ6_articleId=2233502&_101_INSTANCE_OgW431Rs9dQ6_targetExtension=pdf>. Acesso em: 19 de março de 2024.

DENBY, C. M. *et al.* Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer. **Nature Communications**, v. 9, n. 965, 2018.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, 2014.

DUBOS, R. **Pasteur e a Ciência Moderna**. São Paulo, SP: Edart, 1967b.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ JR., S. Química do lúpulo. **Química Nova**, São Paulo, v. 42, n. 8, p. 900-919, 2019.

FILHO, W. G. V. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. Vol. 1. São Paulo: Blucher, 2010.

JANISH, S. **A nova IPA: um guia científico sobre o aroma e o sabor do lúpulo**. Tradução: Gabriela Albara Lando – 1. Ed. – Porto alegre: editora Krater, 2021. 320p.

KATZ, S. E. **A arte da fermentação: explore os conceitos e processos essenciais da fermentação praticados ao redor do mundo**. Tradução: Cristina Yamagami. – 1. ed. – São Paulo: Tapioca, 2014. 585p.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. Translated: Suzan Pratt – 3.ed. – Berlin: VLB, 2004. 948p.

MALZAHN, A. *et al.* Plant genome editing with TALEN and CRISPR. **Cell Biosci.**, v. 7, n. 21, 2017.

MARNIK, E. *et al.* CRISPR: A new way for scientists to edit DNA. **Front. Young Minds**. 2021. 9:600133. DOI: 10.3389/frym.2021.600133.

MCVEY, S. L., *et al.* Beyond editing, CRISPR/Cas9 for protein localization: an educational primer for use with “A dCas9-based system identifies a central role for Ctf19 in kinetochore-derived suppression of meiotic recombination”. **Genetics**, v. 222, n.1, 2022.

MOLINARI, H. B. C. *et al.* **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020. 210p.

MOLITOR, R. W. *et al.* The sensorial and chemical changes in beer brewed with yeast genetically modified to release polyfunctional thiols from malt and hops. **Fermentation**, v. 8, n.8, 2022. 370p.

MORADO, R. **Larousse da cerveja: A história e as curiosidades de uma das bebidas mais populares do mundo**. São Paulo: Alaúde Editorial, 2017. 440p.

MOSHER, R. **Tasting beer: an insider's guide to the world's greatest drink**. Tradução Marcio Caparica – 1. Ed. São Paulo: Editora Senac, 2020. 366p.

MUXEL, A. A. **Química da cerveja: uma abordagem química e bioquímica das matérias-primas, processo de produção e da composição dos compostos de sabores da cerveja**. 1.ed. Curitiba: Appris, 2022. 350p.

OLIVER, G.; MENDES, I.; FILHO, W. G. V. **O guia oxford da cerveja**. São Paulo: Bluchner, 2020. 1040p.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Uberlândia – MG. 2010, 106p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia.

PAVENTI, G. *et al.* Biological activity of *Humulus lupulus* (L.) essential oil and its main components against *Sitophilus granarius* (L.). **Biomolecules**, v. 10, n. 8, p.1108, 2020.

PEREIRA, T. C. **Introdução à técnica CRISPR**. Ribeirão Preto: Editora Cubo, 2016, 250p.

QUADROS, O. F. *et al.* Edição dirigida do genoma por CRISPR/Cas9: uma nova tecnologia para o melhoramento de plantas. **Incaper em Revista**, Vitória, v. 9, p. 6 - 15, jan/dez 2018. ISSN 2179-5304.

SAERENS, S. M. G.; DUONG, C. T.; NEVOIGT, E. Genetic improvement of brewer's yeast: current status, perspectives and limits. **Springer**. 2010. V. 86, 1195-1212p.

SANTOS, M. S.; RIBEIRO, F. M. **Cervejas e Refrigerantes**. São Paulo: **CETESB**, 58p. 2005.

SILVA, C. T. D. **Caracterizações químicas dos primeiros cultivares de lúpulo (*humulus lupulus* L.) produzidos no Brasil**. 2019. 90 f. Dissertação (Mestrado) -

Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2019.

SILVEIRA, C. *et al.* As mulheres ganhadoras do Nobel de química. **Química Nova**, Curitiba, v. 45, n. 5, p. 636-646, 2022.

STEWART, G. G. **Brewing and distilling yeasts: the yeast handbook**. Edinburgh: Springer. 2017. 423p.

TORRE, L. **Ciência da cerveja: a química dos processos cervejeiros**. 1.ed. Porto Alegre: Editora Krater, 2022. 244 p.

WALKER, G. M.; WALKER, R. S. K. Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. **Advances in Applied Microbiology**. v.105. p.87-129. 2018.