

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PÉRSIO ALEXANDRE DA SILVA**

**POTENCIAL TECNOLÓGICO DE LEVEDURAS NÃO-SACCHAROMYCES**

**RECIFE  
2022**

**PÉRSIO ALEXANDRE DA SILVA**

**POTENCIAL TECNOLÓGICO DE LEVEDURAS NÃO-SACCHAROMYCES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Norma Buarque de Gusmão

Co-Orientador: Prof. Dr. Leonor Alves

**RECIFE  
2022**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Silva, Pécisio Alexandre da  
Potencial tecnol3gico de leveduras *Não-Saccharomyces* / Pécisio Alexandre da Silva.  
– 2022.

43 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão  
Coorientadora: Profa. Dra. Leonor Alves  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro  
de Biotecnologias. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Recife,  
2022.

Inclui referências.

1. Fungos. 2. Leveduras. 3. Biotecnologia. I. Gusmão, Norma Buarque (orientador). II. Alves, Leonor (coorientador). III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-135

**PÉRSIO ALEXANDRE DA SILVA**

**POTENCIAL TECNOLÓGICO DE LEVEDURAS NÃO-SACCHAROMYCES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 28/01/2022

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Buarque de  
GusmãoUFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Mendonça de Miranda  
UNICEUMA

---

Professor Dr. Erik Jonne Vieira de Melo  
UNINASSAU

Recife, 28 de Janeiro de 2022.

“Love would never leave us alone”

**Bob Marley(1980)**

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus, Pai de sabedoria infinita, por me permitir aprender um pouco de suas obras e por sempre colocar seus anjos em minha estrada.*

*A minha Família, Idomilçon e Izabel, Paulo e Patrícia. Por sempre acreditarem e apoiarem em minhas escolhas, me dando todo amor e carinho.*

*A amada companheira Gleyka, por estar presente em tudo na minha vida, nos bons momentos e principalmente nos momentos de dúvidas e angústias do seu lado sempre me sinto capaz. Amu tu my love!!!*

*A professora Norma Buarque por anos de ensinamentos e amizade, por sempre ser uma brisa calma em meio à tempestade. Obrigado pelo abraço sempre caloroso e acolhedor*

*A professora Leonor Alves, um exemplo de profissional a ser seguido, grato pelos seus ensinamentos e seu bom humor de sempre.*

*A meu fiel companheiro Coffey, por sempre me receber com latidos e alegria, principalmente nos dias mais difíceis.*

*A Rita e Petrus, que mesmo estando distantes, o carinho e afeto não diminuem.*

*A meu amigo-irmão Erik, sua esposa Ata e Adam “o galego”, por todos os anos de amizade e companheirismo.*

*Aos meus queridos amigos químicos, Breno “bombeiro” e Marema (Marina), Henrique “comando” e Juliana (Gabriel e Vinicius), Edgar “maisena” e Ritinha (Beatriz e Leticia), Luiz “Mago” e Veo (Luna e Ester), Rafael Formiga e Juliana (Miguel, Davi e Lucas, os galegos), Luiz “Montanha” e Priscila, Marcilio “Tchutchuo” véi e Taciana, Thiago “negão” e Nara, meus amigos para a vida inteira.*

*Aos amigos do Lamai, Raphael Ferrer, Diana, Manu, Eduardo, Hugo, Wellma, Sarah. Por fazerem este laboratório o melhor local de trabalho.*

*Aos amigos do Clube da Luta, Pedrão, Vitor “bode”, Junior “bagagem”, Edinaldo “mago”, Bruno Daltro. Agradeço pela amizade de longas datas.*

*As queridas do Biofarmatox, Rayane, Jessica, Elizabeth, Katarina e Marilia, grato pelo carinho e pelos litros de café nas tardes cotidianas.*

*A Camila, Hugo e Navi, pela amizade e carinho apesar da distância.*

*A Nínive, por seu carinho e amizade e por compartilhar o dia a dia no laboratório.*

*A Flavia Arruda (Pretinha), mesmo estando distante, meu carinho e admiração por ti não diminuíram.*

*Aos amigos, Robinho, Nelzita, Kedminha, Renatinha, Lari e Roberto, Maira e Fagner. Por todo carinho e amizade.*

*A todos os amigos que por ventura não tenha lembrado, meus sinceros agradecimentos.*

*“O primeiro gole do copo das ciências naturais te tornará um ateu. Mas, no fundo do copo Deus estará esperando por ti.”*

*(Werner Heisenberg)*

## RESUMO

A utilização de produtos fermentados pela humanidade vem desde a antiguidade até os dias de hoje. Os produtos de fermentação podem ser usados como matriz energética (etanol) e também como alimentos (pães, cervejas, vinhos). Os historiadores datam que os primeiros indícios do surgimento da cerveja, foi em 6000 a.C na Palestina. A cerveja é uma bebida constituída basicamente por água, malte, lúpulo e leveduras. A levedura é o principal agente transformador químico, convertendo os açúcares disponíveis no mosto em etanol, dióxido de carbono e uma série de compostos do metabolismo secundário que conferem sabor e aroma para a cerveja. Destaca-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* como as mais utilizadas pela indústria cervejeira. Com o crescente número de consumidores de cervejas e a grande diversidade de sabores, o número de micro e pequenas cervejarias artesanais também vêm aumentando consideravelmente, sendo um importante gerador de empregos e de receita. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial biotecnológico de leveduras não-*Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Candida lambica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces norbensis*) mantidas em coleção de micro-organismos. Avaliou-se a potencialidade biotecnológica para serem utilizadas na indústria cervejeira. Realizou-se a diferenciação bioquímica das cepas em ALE e LAGER. Foi analisada a tolerância a etanol das leveduras e avaliado o potencial de floculação das leveduras. Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que as leveduras apresentaram um potencial para serem aplicadas em processos fermentativos. Todas as leveduras utilizadas nos testes de diferenciação bioquímica apresentaram resultados que permite classifica-las como leveduras do tipo LAGER. No teste de floculação todas as leveduras se mostraram como leveduras com característica industrial segundo o critério de classificação da American Society of Brewing Chemistry (ASBC). Na avaliação de tolerância ao etanol nas concentrações de 10%, 15% e 20% apenas a levedura usada no controle demonstrou tolerância ao etanol 15%, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtida na coleção de cultura demonstrou tolerância ao etanol 10%, e as demais não apresentaram tolerância ao etanol nas concentrações utilizadas no teste. O atual estudo apresentou resultados promissores sugerindo que as leveduras podem ser utilizadas em processos fermentativos, sendo necessária a realização de maiores investigações para certificar o real potencial destas leveduras.

**Palavras-chave:** Leveduras; Não-*Saccharomyces*; Processos Fermentativos.

## ABSTRACT

The use of fermented products by humanity dates back to antiquity to the present day. Fermentation products can be used as an energy matrix (ethanol) and also as food (breads, beers, wines). Historians date that the first evidence of the emergence of beer was in 6000 BC in Palestine. Beer is a beverage consisting primarily of water, malt, hops and yeast. Yeast is the main chemical transforming agent, converting the available sugars in the wort into ethanol, carbon dioxide and a series of secondary metabolism compounds that give beer flavor and aroma. The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis* stand out as the most used by the brewing industry. With the growing number of beer consumers and the great diversity of flavors, the number of micro and small craft breweries has also increased considerably, being an important generator of jobs and revenue. The objective of this research was to evaluate the biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Candida lambica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces norbensis*) kept in a collection of microorganisms. The biotechnological potential to be used in the brewing industry was evaluated. The biochemical differentiation of the strains into ALE and LAGER was performed. The ethanol tolerance of the yeasts was analyzed and the flocculation potential of the yeasts was evaluated. The results obtained in this research showed that the yeasts had the potential to be applied in fermentation processes. All yeasts used in the biochemical differentiation tests presented results that allow classifying them as LAGER type yeasts. In the flocculation test, all yeasts were found to be industrial yeasts according to the classification criteria of the American Society of Brewing Chemistry (ASBC). In the evaluation of ethanol tolerance at concentrations of 10%, 15% and 20%, only the yeast used in the control showed tolerance to 15% ethanol, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* obtained from the culture collection showed tolerance to 10% ethanol, and the others did not. showed tolerance to ethanol at the concentrations used in the test. The current study showed promising results suggesting that yeasts can be used in fermentation processes, requiring further investigations to certify the real potential of these yeasts.

**Key-words:** Flavors; Non *Saccharomyces*; Fermented Products.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Componentes celulares e microscopia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
Figura 2- Diagrama esquemático da produção de cervejas.....	21
Figura 3- Crescimento do número de cervejarias.....	24
Figura 4- Curva de crescimento da levedura (Lev01) em meio YPG e YPM a 2%.....	28
Figura 5- Curva de crescimento da levedura (Lev05) em meio YPG e YPM a 2%.....	29
Figura 6- Curva de crescimento da levedura (Lev06) em meio YPG e YPM a 2%.....	29
Figura 7- Curva de crescimento da levedura (Lev07) em meio YPG e YPM a 2%.....	30
Figura 8- Curva de crescimento da levedura (Lev09) em meio YPG e YPM a 2%.....	30
Figura 9- Curva de crescimento da levedura (Lev10) em meio YPG e YPM a 2%.....	31
Figura 10- Teste de diferenciação bioquímica no tempo inicial.....	32
Figura 11- Teste de diferenciação bioquímica após 7 dias de incubação.....	33
Figura 12- Gráfico de percentual de floculação.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	- Celsius
Mapa	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
YNB.	- Yeast Nitrogen Base
YP	- Yeast Peptone
Lev	- Levedura
g/L.	- Gramas por Litro
(p/v)	- Peso por Volume
mL	- Mililitro
D.O.	- Densidade Optica
RPM	- Rotações por Minuto
nm	- Nanômetro
p.	- Página
dt	- Derivada do tempo
dX	- Derivada de X
ln	- Logaritmo neperiano
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
pH	- Potencial Hidrogeniônico
NI	- Não informado
CO <sub>2</sub>	- Gás Carbônico
μL.	- Microlitro

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de leveduras utilizadas.....	25
Tabela 2- Diferenciação Bioquímica.....	33
Tabela 3- Tolerância ao Etanol.....	36

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS E METAS .....</b>	<b>14</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	14
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
3.1	FUNGOS .....	15
3.2	LEVEDURAS.....	16
3.3	<i>SACCHAROMYCES</i> .....	17
3.4	NÃO <i>SACCHAROMYCES</i> .....	19
3.5	PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	20
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1	LEVEDURAS.....	25
4.2	MEIOS DE CULTURA.....	25
4.3	AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE BIOTECNOLÓGICA PARA A INDÚSTRIA CERVEJEIRA.....	26
4.4	DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DE CEPAS ALE E LAGER .....	26
4.5	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FLOCULAÇÃO .....	27
4.6	TESTE DE TOLERÂNCIA AO ETANOL.....	27
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
5.1	AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE BIOTECNOLÓGICA PARA A INDÚSTRIA CERVEJEIRA.....	28
5.2	DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DE CEPAS ALE E LAGER .....	32
5.3	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FLOCULAÇÃO .....	34
5.4	TESTE DE TOLERÂNCIA AO ETANOL.....	36
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão presentes em todas as partes, solo, água, ar, alimentos, insetos e animais, exercendo grandes influências nas atividades humanas (HATOUM *et al.*, 2012). As bebidas alcoólicas estão presentes nas tradições humanas desde eras primitivas, dentre elas destacam-se as cervejas, cujo consumo data-se por mais de 6000 anos. Artigos arqueológicos apontam para o início de sua produção na Mesopotâmia, onde é concentrada a maior parte dos indícios de produção da bebida (FERREIRA; BENKA, 2014; GIORGI; JÚNIOR, 2016)

As leveduras constituem o principal grupo de micro-organismos eucariotos utilizados na fermentação de alimentos e bebidas. Das mais de 600 espécies de leveduras conhecidas, merecem destaque as espécies do gênero *Saccharomyces*. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é o agente fermentativo utilizado na produção de vinho, saquê, cerveja, cachaça, pão, entre outros (SICARD & LEGRAS, 2011; PARAPOULI *et al.* 2020).

Mesmo com a existência de grandes cervejarias industriais, o número de microcervejarias artesanais cresceu nos últimos anos produzindo cervejas em pequenas quantidades, fazendo uso de métodos tradicionais de produção preservando tradições e sabores de estilos clássicos de cervejas do mundo. Mesmo com o crescimento acentuado, os insumos de produção de cerveja são importados tornando a produção de custo elevado como, por exemplo, as leveduras. Mediante disso, justifica-se a busca por outros tipos de insumos que diminuam o custo de fabricação de cervejas. O presente trabalho visa testar leveduras alternativas com potencialidade de aplicação em processos fermentativos.

## 2 OBJETIVOS E METAS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico de leveduras não-*Saccharomyces* mantidas em coleção de micro-organismos.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Testar leveduras mantidas em coleção de micro-organismos com potencialidade biotecnológica para serem utilizadas na indústria cervejeira;
- Diferenciar bioquimicamente cepas ALE e LAGER;
- Analisar a tolerância a etanol das leveduras;
- Avaliar o potencial de floculação das leveduras;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 FUNGOS

São seres eucarióticos, heterotróficos, uni ou pluricelulares, na sua maioria são organismos aeróbios. Ocupam diferentes nichos ecológicos podendo ser saprófitos, parasitas ou mesmo simbioses (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). São organismos que possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em diversos ambientes, como no ar atmosférico, na água, no solo, nos animais e alimentos (CARMO *et al.* 2007, FLORES; ONOFRE, 2010).

Os fungos filamentosos produzem filamentos chamados de hifas, cujo conjunto forma o micélio, enquanto as leveduras formam um pseudomicélio que pode se agrupar, porém nunca formando tecidos verdadeiros. Apresentam uma parede celular formada essencialmente de celulose e quitina e o principal polissacarídeo armazenado é o glicogênio. Quanto à nutrição, podem ingerir substâncias por absorção, após ação de enzimas produzidas pelos próprios fungos, no exterior da parede celular. E esses nutrientes para que sejam absorvidos devem possuir um tamanho adequado para que possam ser assimilados e atravessar as camadas celulares: parede, membrana celular ou protoplasma antes de alcançar o citoplasma onde serão metabolizados (GRIFFIN, 1994; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Benevides & Marinho (2015) relatam que os fungos necessitam de quatro elementos básicos: H, O, C e N, além de outros elementos em menor quantidade: P, S, Mg, Fe, Zn, Cu, Mb. De maneira geral, para o seu crescimento, necessitam de uma fonte orgânica de Carbono ou de uma fonte inorgânica de Nitrogênio. Estes organismos apresentam grande importância econômica, sendo utilizados: na alimentação, produção de medicação, controle de pragas, bioindicadores de poluição; produção de enzimas, fermentação alcoólica, degradação, entre outros (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; RODRIGUES; MARINHO, 2012)

Se tratando desta última atividade dos fungos, merece destaque, pois são considerados biodegradadores eficientes de polímeros de plantas naturais como lignina e celulose, além de outros tipos de moléculas orgânicas tais como, ceras, borrachas, fenol, benzeno, tolueno, xileno e xenobióticos (BENEVIDES; MARINHO, 2015).

### 3.2 LEVEDURAS

Há mais de 12 mil anos o homem consome alimentos fermentados, mas a identificação dos micro-organismos como responsáveis pelo processo fermentativo aconteceu apenas em 1665. Bioquimicamente é chamado fermentação o processo de produção de energia, a partir de compostos orgânicos, por micro-organismos. O processo da fermentação na produção de alimentos gera diversos benefícios, como a conservação dos alimentos pela produção de compostos que inibe a proliferação de outros micro-organismos, o aumento da segurança alimentar, pela inibição de patógenos; o incremento do valor nutricional, além da melhoria da qualidade sensorial do produto, pela produção de substâncias aromatizantes (BOURDICHON *et al.*, 2012).

As leveduras constituem o principal grupo de micro-organismos eucariotos utilizados na fermentação de alimentos e bebidas. Das mais de 600 espécies de leveduras conhecidas, merecem destaque as espécies do gênero *Saccharomyces* (SICARD & LEGRAS, 2011).

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, tipicamente esféricos ou ovais. Da mesma forma que os fungos filamentosos, as leveduras são amplamente distribuídas na natureza (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012).

As leveduras são definidas como fungos ascomicetos ou basidiomicetos que são capazes de se reproduzir por brotamento ou fissão e formar esporos que não estão incluídos em um corpo de frutificação (T. BOEKHOUT, C.P. KURTZMAN, 1996).

As leveduras podem ser isoladas do ambiente terrestre, aquático e aéreo. As plantas são o habitat preferido das leveduras, algumas espécies são encontradas desenvolvendo comensalismo ou relações parasitárias com animais. Ambientes extremos como baixo potencial hídrico (alta concentração de açúcar ou sal) e temperatura baixa pode ser habitada por leveduras (G.M. WALKER, 1999).

As leveduras se desenvolvem em meios simples que contêm carboidratos fermentáveis para fornecer energia e esqueletos de carbono para a biossíntese, nitrogênio para a síntese de proteínas, sais minerais entre outros elementos como fatores de crescimento (KUNZE. W. 1999).

Fontes de carbono incluem monossacarídeos, tais como D-glicose, D-manose, D-frutose, D-galactose e o açúcar pentose D-xilulose, mas não outras pentoses (WANG, JOHNSON e SCHNEIDER, 1980).

Dissacarídeos como a sacarose e a maltose também são fermentados pela levedura de cerveja, que, entretanto, não fermenta a lactose. Trissacarídeos como a maltotriose e a

rafinose também são fermentados pela levedura de cerveja, embora no caso da rafinose algumas cepas conduzam apenas uma hidrólise parcial. Os compostos orgânicos glicerol, etanol e lactato não são fermentados, mas a levedura pode crescer aerobicamente pela respiração usando esses compostos como fontes de carbono e energia (KUNZE. W. 1999).

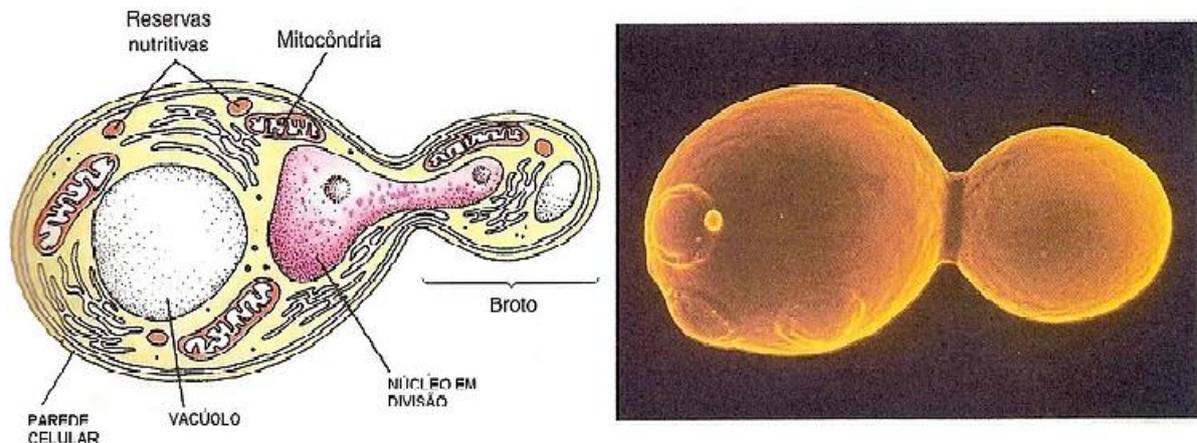
### 3.3 SACCHAROMYCES

*Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucarionte reconhecidamente seguro, amplamente utilizado há milhares de anos na panificação e na fermentação de bebidas alcoólicas como a cerveja e o vinho. Nos dias de hoje assume importância para o homem quando utilizada como organismo modelo em estudos, tais como, caracterização da resposta ao stress oxidativo, osmótico ou alcoólico, na genética molecular sendo o microrganismo eucarionte cujo genoma foi o primeiro a ser sequenciado e usado também na comparação metabólica com células cancerígenas (OSTERGAARD S. *et al.*, 2000; PARAPOULI *et al.* 2020).

*Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura ascomicética gemulante típica, suas células são elípticas, medem de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura e reproduzem-se de forma assexuada por brotamento ou gemulação. No processo de brotamento, o núcleo se divide por constrição e uma porção dele penetra no broto juntamente com outras organelas (CARVALHO *et al.*, 2006).

*Saccharomyces. cerevisiae* é a levedura predominantemente empregada na produção de bebidas fermentadas. Todas as leveduras são fungos unicelulares que possuem características estruturais semelhantes às das células eucarióticas superiores. Isto é, eles compreendem uma parede celular, núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático (ER), o aparelho de Golgi, vacúolos, micro corpos, e vesículas secretoras em conjunto com um complexo extracelular e da membrana de rede intracelular (G.M. WALKER, 1999).

Figura 1: Componentes celulares e microscopia de *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: [https://mbiorg.wixsite.com/mbiorg/post/saccharomyces-cerevisiae-levedura-da-cerveja](https://mbiorg.wixsite.com/mbiorg/post/saccharomyces-cerevisiae-levedura-da- cerveja).

A levedura é o único microorganismo vivo que pode passar da respiração para a fermentação. Um fato importante a lembrar sobre a levedura é que, apesar da presença de oxigênio, a levedura sempre fará a rota fermentativa para utilizar a glicose se a glicose estiver em alta concentração no meio, esse efeito é conhecido como Efeito Crabtree (PARAPOULI *et al.* 2020; INGLEDEW, W.M.; 1999).

*Saccharomyces cerevisiae* não é considerado um verdadeiro anaeróbio facultativo, uma vez que o efeito Crabtree tem precedência, ou seja, acima de 1% de açúcar fermentável no meio de cultura (a porcentagem exata varia entre as cepas) a levedura fermenta o açúcar por metabolismo anaeróbico, mesmo que o meio de cultura seja aerado (INGLEDEW, W.M.; 1999).

As leveduras fermentativas tem a capacidade de usar açúcares anaerobicamente como doadores de elétrons, aceptores de elétrons e fontes de carbono. *Saccharomyces. cerevisiae* é considerada uma levedura etanologênica que pode fermentar facilmente glicose, frutose, manose, galactose, sacarose, maltose e maltotriose em etanol e dióxido de carbono (WALKER G. M , STEWART G.G.; 2016).

Segundo WALKER, G.M., WALKER, R.S.K.(2018), a fermentação é menos energeticamente favorável em comparação com o metabolismo respiratório que, em *Saccharomyces cerevisiae*, só ocorrerá em condições aeróbicas quando os níveis de glicose forem mantidos muito baixos (devido ao efeito Crabtree).

As cervejas podem ser diferenciadas pelo tipo de levedura responsável pela fermentação. As leveduras *Saccharomyces. cerevisiae* tipo ale e *Saccharomyces. cerevisiae*

tipo lager, existindo diferenças bioquímicas entre estes tipos de cepas, que justificam manter uma diferenciação entre elas. As cepas tipo lager possuem os genes MEL que produzem a enzima extracelular  $\alpha$ -galactosidase permitindo a utilização do dissacarídeo melibiose (glicose-galactose). Porém, as cepas tipo ale carecem desses genes MEL, impossibilitando o uso da melibiose. Além disso, cepas ale podem crescer a temperaturas mais altas (37°C), enquanto que as cepas lager não apresentam crescimento em temperaturas superiores a 34°C (STEWART & RUSSELL, 1998).

### 3.4 NÃO SACCHAROMYCES

A humanidade têm aproveitado os processos de fermentação para melhorar a vida útil e a segurança de diversos alimentos e bebidas. Além disso, a fermentação pode adicionar uma variedade de sabores desejáveis aos produtos fermentados ou eliminar sabores desagradáveis (CRAUWELS *et al* 2015).

A utilização de cepas de *Saccharomyces* em fermentação controlada ao longo de décadas se deve basicamente a alguns aspectos positivos: produção eficiente de etanol; fermentação alcoólica, também em condições oxidativas, como via metabólica preferencial devido ao efeito Crabtree (repressão da respiração por altos teores de glicose); e alta tolerância ao etanol (STEENSELS AND VERSTREPEN 2014).

A busca por novas leveduras de cerveja foi recentemente expandida também para espécies de leveduras nunca utilizadas com este objetivo e pertencentes às chamadas não *Saccharomyces*, ou mesmo às leveduras não convencionais (BASSO. 2019).

PIRES e seus colaboradores (2014), afirmam que a escolha da levedura tem grande impacto nos metabólitos que conferem à cerveja seu sabor característico, incluindo acetato e ésteres de etila e álcoois superiores.

Pesquisadores estão a estudar o uso de cepas não-*Saccharomyces* para a produção de cerveja. Isso inclui o uso de leveduras não *Saccharomyces* para a produção de cervejas com baixo teor de álcool, cervejas funcionais e amaras de especiarias. Embora este campo específico tenha apenas começado a ser explorado, há evidências crescentes do enorme potencial para a aplicação de leveduras não-*Saccharomyces* na indústria cervejeira (Basso et al. 2016).

As leveduras não *Saccharomyces* passaram de uma indesejável contaminação por microrganismos associada a vinhos estragados para leveduras que podem trazer características interessantes (JOLLY et al., 2014).

Atualmente, 37 espécies de leveduras foram mencionadas como as principais não *Saccharomyces* envolvidos em fermentações espontâneas de vinho, cerveja, tequila, mezcal e cachaça. Eles pertencem a 20 gêneros, são eles: *Aureobasidium*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hanseluna*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomycodes*, *Starmerella*, *Wickerhamomyces*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* (VARELA C., 2016).

A substituição da cultura de levedura é uma das modificações mais fáceis de serem implementadas pelas cervejarias, pois não requer investimentos em equipamento cervejeiro, o que o torna acessível para cervejarias de todos os tamanhos (BELLUT K. & ARENDT E. K. 2019).

### 3.5 PRODUÇÃO DE CERVEJA

Até a Idade Média, a produção de cerveja não passava de uma atividade caseira destinada ao consumo doméstico. A partir do século VI, os mosteiros passaram a fabricar a bebida, que adquiriu o seu sabor característico pelas mãos dos monges, os quais introduziram também na formulação o lúpulo, ingrediente usado como fator de amargor e também por suas propriedades antimicrobianas (MORADO, 2009). Em 1516, na Baviera, foi promulgada a *Reinheitsgebot*, a Lei da Pureza, que estabelecia, entre outras coisas, que os únicos ingredientes permitidos na fabricação da cerveja eram a água, o malte de cevada e o lúpulo. Nessa época, como ainda não havia o conhecimento da existência das leveduras, estas não foram citadas. Além da preocupação com o estabelecimento de padrões para o processo de fabricação da cerveja, a lei também tinha o objetivo de controlar a demanda de trigo, pois o grande consumo de trigo para a fabricação de cerveja estaria encarecendo o pão. A aceitação da *Reinheitsgebot* se espalhou gradativamente da Baviera para regiões vizinhas. Porém, ao final do século XX, a competição no mundo globalizado forçou a adição de adjuntos (milho, arroz) para garantia da produção de grandes volumes de cerveja a um baixo custo (MORADO, 2009).

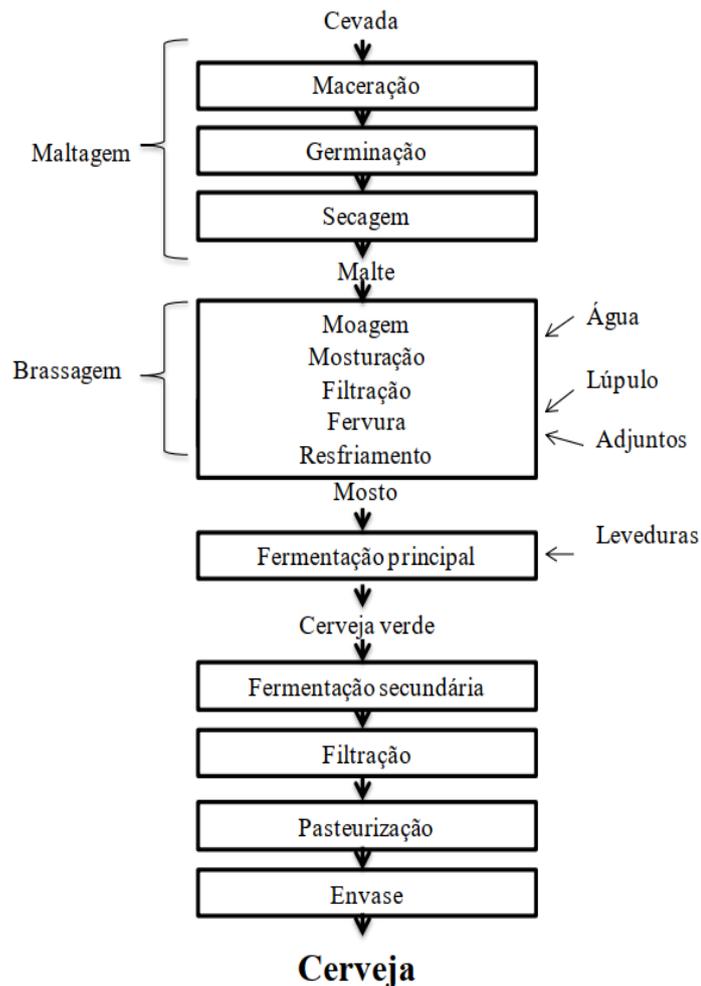
A cerveja é uma bebida carbonatada, preparada a partir de malte de cevada, lúpulo, levedura e água de boa qualidade. Também faz uso de adjuntos para substituir o grão de cevada, como: arroz, milho e trigo, visando baratear o custo final da bebida. Seu sabor é determinado pela matéria prima, pelo tipo de processo e pela levedura utilizada, além dos

compostos produzidos durante a fermentação e maturação, que exercem maior influência nas suas características sensoriais (OLIVEIRA, 2011).

As cervejas são classificadas pelo teor de álcool e extrato, pelo malte ou de acordo com o tipo de fermentação. As cervejas de alta fermentação são aquelas cujas leveduras (cepas Ale) são ativas em temperatura de 20°C a 25°C e flutuam após fermentar o mosto, gerando um produto de cor cobre avermelhada, de sabor forte, ligeiramente ácido e com teor alcoólico entre 4% e 8% (as alemãs, por exemplo). A maior parte das cervejas é de baixa fermentação, ou seja, quando expostas a temperaturas entre 9°C e 14°C, o levedo (cepas Lager) fica depositado no fundo do tanque (SINDICERV, 2019).

O processo de produção de cerveja pode ser dividido basicamente em seis etapas: moagem do malte, mosturação ou brasagem, filtração do mosto, fervura do mosto, fermentação e maturação.

Figura 2: Diagrama esquemático da produção de cervejas.



O malte é produzido a partir de grãos de cevada, pelo processo de maltagem, que é dividido em três fases: germinação, maceração e secagem. O principal objetivo da maltagem é ativar as enzimas do grão de cevada. Estas enzimas, então, irão auxiliar a conversão do carboidrato armazenado na forma de amido em açúcares fermentáveis. A degradação do amido começa durante a maltagem e continua até a fase de produção do mosto.

Em geral, a cevada já chega maltada às cervejarias (MORADO, 2009). A brassagem, será realizada a moagem do malte, a mosturação, a filtração do mosto, sua fervura e resfriamento. O malte é moído para que seja liberado o conteúdo dos grãos de cevada, que, durante a mosturação, serão suspensos em água e aquecidos para solubilizar o conteúdo e permitir a ação das amilases. Na sequência, os sólidos são removidos e o mosto é clarificado, fervido e resfriado antes que seja iniciada a fermentação (MORADO, 2009). o mosto é fervido com lúpulo. A etapa de fervura tem como objetivos esterilizar o mosto e inativar as enzimas do malte. Depois de fervido, o mosto é resfriado e colocado no tanque de fermentação (MORADO, 2009). A adição do lúpulo (*Humulus lupulus*) é fundamental para conferir às cervejas o amargor característico. Além disso, seus aromas também podem conferir às cervejas notas herbais, florais e frutais (MORADO, 2009).

Leveduras cervejeiras, tradicionalmente usadas na produção de cervejas Ale e Lager, são cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que representam um grupo diversificado de microrganismos. Para efeito histórico e prático, as leveduras Lager, são referidas na literatura como *Saccharomyces carlsbergensis*, entretanto, mais especificamente são híbridos de *Saccharomyces cerevisiae* com outras leveduras (WALKER, 2000; CASAREGOLA *et al.*, 2001).

A fermentação é resultado do metabolismo das leveduras que são capazes de converter açúcares fermentáveis em dióxido de carbono e etanol. Além destes, outros subprodutos metabólicos podem ser gerados durante a fermentação, os quais, juntamente com aqueles provenientes do malte e do lúpulo, serão os responsáveis por formar o *flavour* (aroma e sabor) das cervejas (OLANIRAN *et al.*, 2011; LEI *et al.*, 2012).

O produto da fermentação principal é chamado cerveja verde, pois contém componentes de sabor indesejável, tais como diacetil (2,3-butanodiona), que é uma dicetona vicinal formada durante a biossíntese da valina, sendo considerada uma substância *off flavour* por conferir às cervejas sabor de manteiga (DASSARI & KOLLING, 2011). Na fermentação secundária, o diacetil é reabsorvido pelas leveduras e convertido em acetoína e posteriormente em 2,3-butanodiol. Comparados ao diacetil, esses dois subprodutos apresentam um nível

muito mais baixo de percepção sensorial (*threshold*) (DUONG *et al.*, 2011). A redução da presença do diacetil é o passo limitante da velocidade de maturação da cerveja (DASSARI & KOLLING, 2011).

A levedura está envolvida na maioria dos processos de formação de aroma durante fermentação de cerveja, transformando ingredientes do mosto em álcool e compostos aromáticos como álcoois, ésteres e compostos carbonílicos (PIRES *et al.*, 2014).

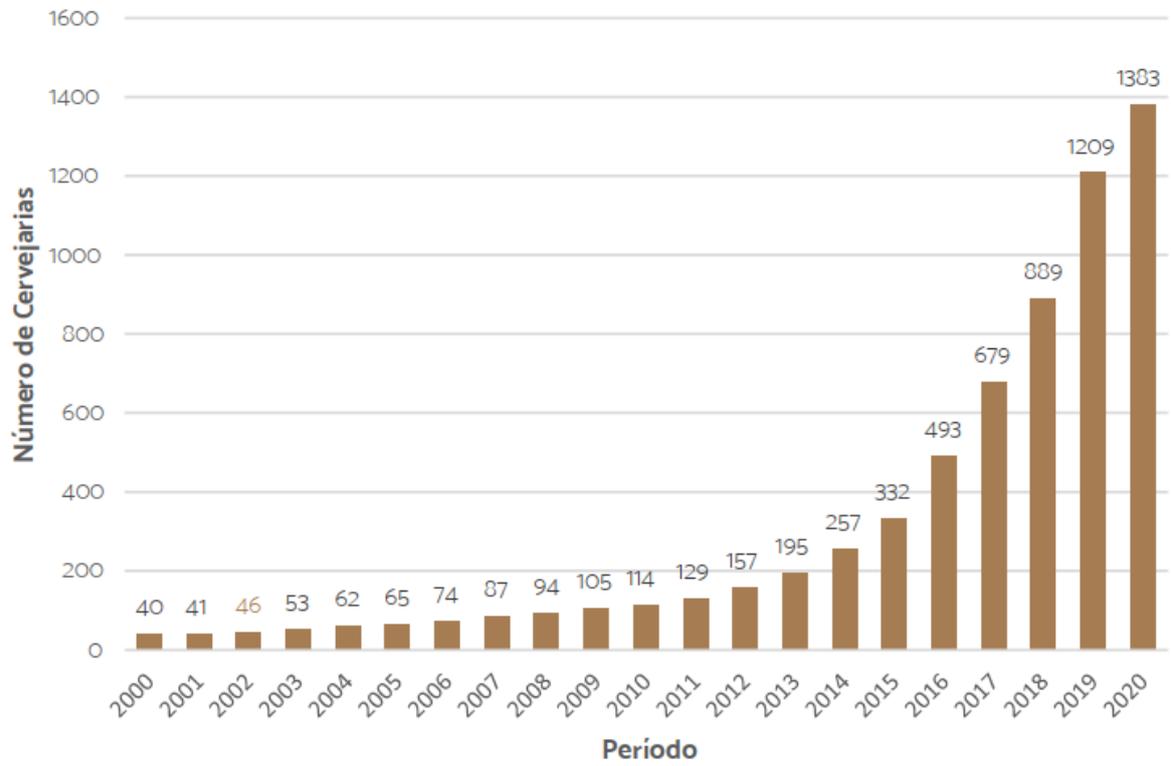
A procura por mudanças no aroma da cerveja podem ser obtidas usando diferentes leveduras além das convencionais cepas de *Saccharomyces*. Leveduras “Não *Saccharomyces*” são principalmente conhecidas como leveduras para cerveja ou outras bebidas, mas eles podem realmente formar uma diversidade de sabores que podem se encaixar perfeitamente na cerveja (PIRES *et al.*, 2014; VERSTREPEN *et al.*, 2003).

Muitos compostos de sabor significativos que vêm da fabricação de cerveja por leveduras são principalmente metabólitos secundários. Eles são produzidos em quantidades relativamente baixas em comparação com os produtos de fermentação principal, que são etanol e dióxido de carbono (PIRES *et al.*, 2014; VERSTREPEN *et al.*, 2003).

Metabólitos secundários podem ser divididos em diferentes categorias e incluir compostos aromatizantes contendo enxofre, compostos carbonilados indesejáveis, fenóis voláteis, ácidos orgânicos, álcoois fuseis, ésteres e álcoois monoterpênicos (PIRES *et al.*, 2014; VERSTREPEN *et al.*, 2003; MEILGAARD, M. C.;1975).

No ano de 2020 o Brasil chegou a 1.383 cervejarias registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), distribuídas em todos os estados da federação, um crescimento de 14,4% em relação ao ano anterior. Os estados com maior crescimento no número de cervejarias foram Piauí e Paraíba. A maioria das cervejarias está localizada nos estados do Sul e do Sudeste: 85,6% ficam nessas regiões. São Paulo tem o maior número de estabelecimentos (285), seguido pelo Rio Grande do Sul (258) e por Minas Gerais (178). Apesar da concentração no Sul e Sudeste, estados do Nordeste têm apresentado nos últimos anos um crescimento expressivo no número de estabelecimentos, entre eles Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte.

Figura 3: Crescimento do número de cervejarias



Fonte: MAPA (2020)

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LEVEDURAS

As leveduras utilizadas foram cedidas pela Coleção de Culturas-Micoteca URM do Departamento de Micologia e da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos, ambos do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco e uma levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* SafAle™ S-04 de marca FERMENTIS.

Todas as culturas foram estocadas em tubos contendo meio YP 2% de glicose e conservadas sob refrigeração.

Tabela 1: Leveduras utilizadas

Levedura	Coleção de Cultura	Substrato
Lev-01: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	URM-7481	Poupa de mangaba
Lev-05: <i>Pichia membranifaciens</i>	URM-4780	Grão de kefir
Lev-06: <i>Candida lambica</i>	URM-4778	Massa de mandioca
Lev-07: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	UFPEDA-1109	NI
Lev-09: <i>Saccharomyces diastaticus</i>	UFPEDA-1212	NI
Lev-10: <i>Saccharomyces norbensis</i>	UFPEDA-1267	NI

### 4.2 MEIOS DE CULTURA

- MEIO YP

O meio YP é composto por extrato de levedura 1% (p/v) e peptona 2% (p/v). Para o meio sólido, foi acrescentado ágar 2% (p/v). Foram utilizadas diferentes fontes de carbono, como por exemplo, glicose e maltose.

- MEIO MÍNIMO YNB (YEAST NITROGEN BASE)

O meio mínimo YNB, composto por 6,7 g/L de base nitrogenada sem aminoácidos e sem sulfato de amônio, foi preparado adicionando-se glicose 2% (p/v).

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE BIOTECNOLÓGICA PARA A INDÚSTRIA CERVEJEIRA

A eficiência do processo de fermentação das cervejas está diretamente relacionada à capacidade de fermentação de glicose e de maltose. As leveduras foram crescidas em tubos contendo 5mL de YP glicose 2% e YP maltose 2%, separadamente, sendo incubadas a 30°C por 48 horas sob agitação a 160 rpm. Foi calculado o volume necessário de cultura para ser inoculado em frasco Erlenmeyer com capacidade para 125 mL contendo 50 mL de YP glicose 2% e YP maltose. Os frascos foram mantidos a 30°C, sob agitação a 160 rpm por 72 horas, sendo recolhidas amostras e realizadas leituras de D.O.600nm a cada 2 horas. Foi calculada a velocidade de crescimento específica definida como a variação do número de células em relação ao tempo, definida pela seguinte equação:

$$\mu = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} = \frac{d \ln X}{dt}$$

onde:  $\mu$  corresponde à velocidade específica de crescimento, X refere-se à biomassa celular, dX corresponde à variação da biomassa, dt representa a variação do tempo, e  $\ln X$  é igual ao logaritmo neperiano do valor da biomassa celular.

#### 4.4 DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DE CEPAS ALE E LAGER

A diferenciação de cepas ale e lager cervejeiras se baseiam na capacidade de metabolização de melibiose e nas temperaturas de crescimento. As colônias serão inoculadas em tubos contendo 6 mL de meio YNB acrescido de 0,002% de verde de bromocresol, 280 mg de melibiose e um tubo de Durhan invertido. Se ocorrer a mudança de coloração do meio de amarelo para verde ao fim de 7 dias de incubação, indicará positivo para fermentação de melibiose.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FLOCULAÇÃO

Para determinação da capacidade de floculação, será aplicado o teste de Helms modificado (D'Hautcourt & Smart, 1999). Para isso, as leveduras serão cultivadas em YP glicose 2%, a 30°C, sob agitação a 200 rpm, por 72 horas. Após o crescimento das culturas, as células, na concentração de  $10^8$  células/mL (D.O.600nm 0,35 – 0,4), vão ser lavadas com água destilada ou solução de EDTA 5M (pH 7,0) e ressuspensas em tampão de lavagem, contendo sulfato de cálcio (0,5 g/L). Após centrifugação à 10000 RPM, as células serão ressuspensas em tampão de suspensão, contendo sulfato de cálcio (0,5 g/L), acetato de sódio (6,8 g/L), ácido acético glacial (4,5g/L), e etanol 4% a um pH final de 4,5. Como controle, as células serão ressuspensas em EDTA 0,5M (pH 7,0). As células serão submetidas a agitação e um período de sedimentação de 15 minutos, será alíquotas de 100 µL de sobrenadante para cada amostra, e depois suspensas em 900 µL de água destilada para realizar a leitura de absorbância a D.O.600nm. Para cada cepa, serão utilizadas 3 réplicas e o percentual de floculação foi determinado para três determinações independentes pela seguinte fórmula:

$$\%Floculação = \frac{DO600controle - DO600experimental}{DO600controle} \times 100$$

#### 4.6 TESTE DE TOLERÂNCIA AO ETANOL

As leveduras foram crescidas em tubos contendo 4 mL de YP maltose 2% por 24 horas sob agitação a 200 rpm em mesa agitadora. Em microplacas de 96 poços contendo 150 µL de YP maltose 2% e etanol 10% (v/v) foram inoculados 1,5 µL de células nas diluições de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-8</sup>. As placas foram incubadas a 30°C por 72 horas e o crescimento foi avaliado em leitura em espectrofotômetro à 600nm de absorbância. O mesmo procedimento foi adotado para avaliação da tolerância ao etanol em 15 e 20% (v/v).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE BIOTECNOLÓGICA PARA A INDÚSTRIA CERVEJEIRA

A eficiência do processo de fermentação das cervejas está diretamente relacionada à capacidade de fermentação de maltose e de maltotriose. Já que o mosto utilizado na produção de cerveja geralmente possui maltose em torno de 50 a 60%, maltotriose em 15 a 20% e glicose em 10 a 15% (Alves Jr. *et al.*, 2008), é importante avaliar a capacidade de metabolização de maltose pelas culturas estudadas. De acordo com Andrietta *et al.* (1999), leveduras são consideradas aptas para o processo fermentativo se apresentarem valores de velocidade específica de crescimento maiores ou igual a 0,4.

Nos gráficos a seguir podemos observar o desempenho das leveduras em meios com glicose e maltose.

Figura 4: Curva de crescimento da levedura (Lev01) em meio YPG e YPM a 2%.

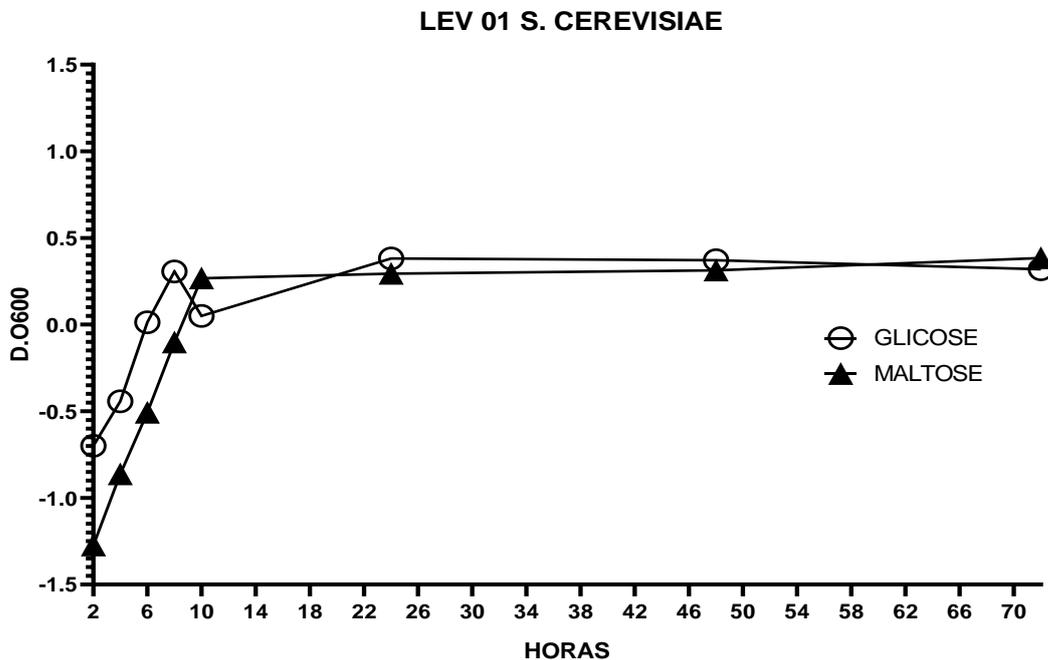


Figura 5: Curva de crescimento da levedura (Lev05) em meio YPG e YPM a 2%.

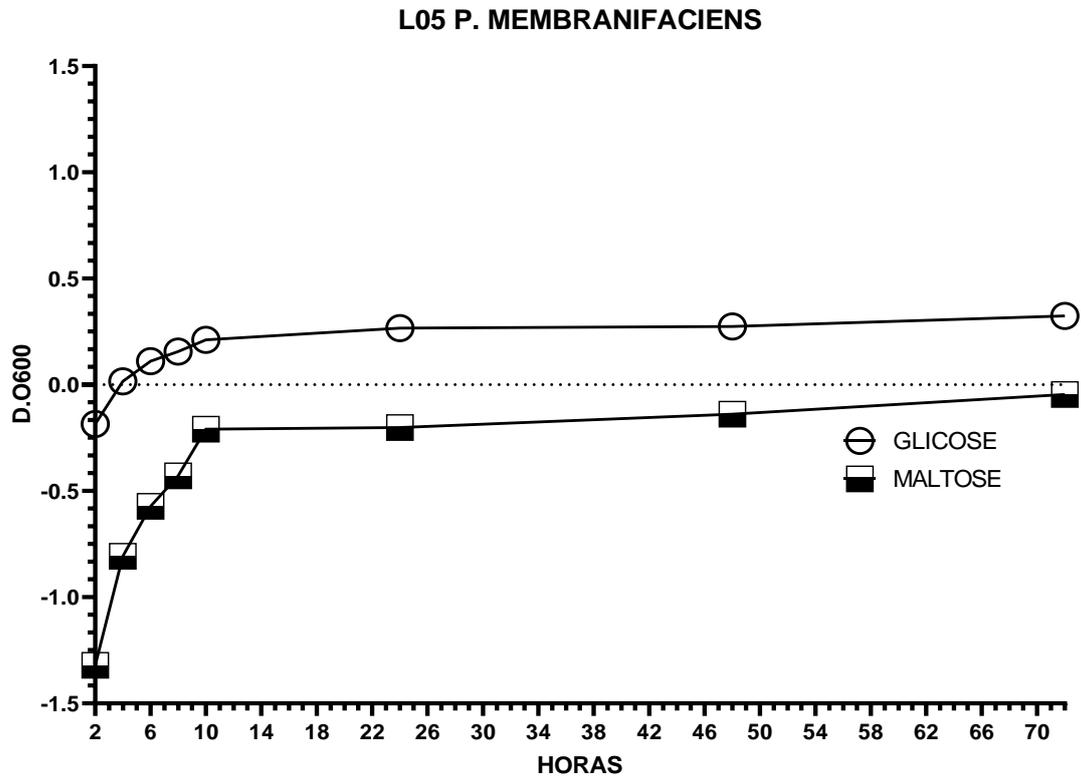


Figura 6: Curva de crescimento da levedura (Lev06) em meio YPG e YPM a 2%.

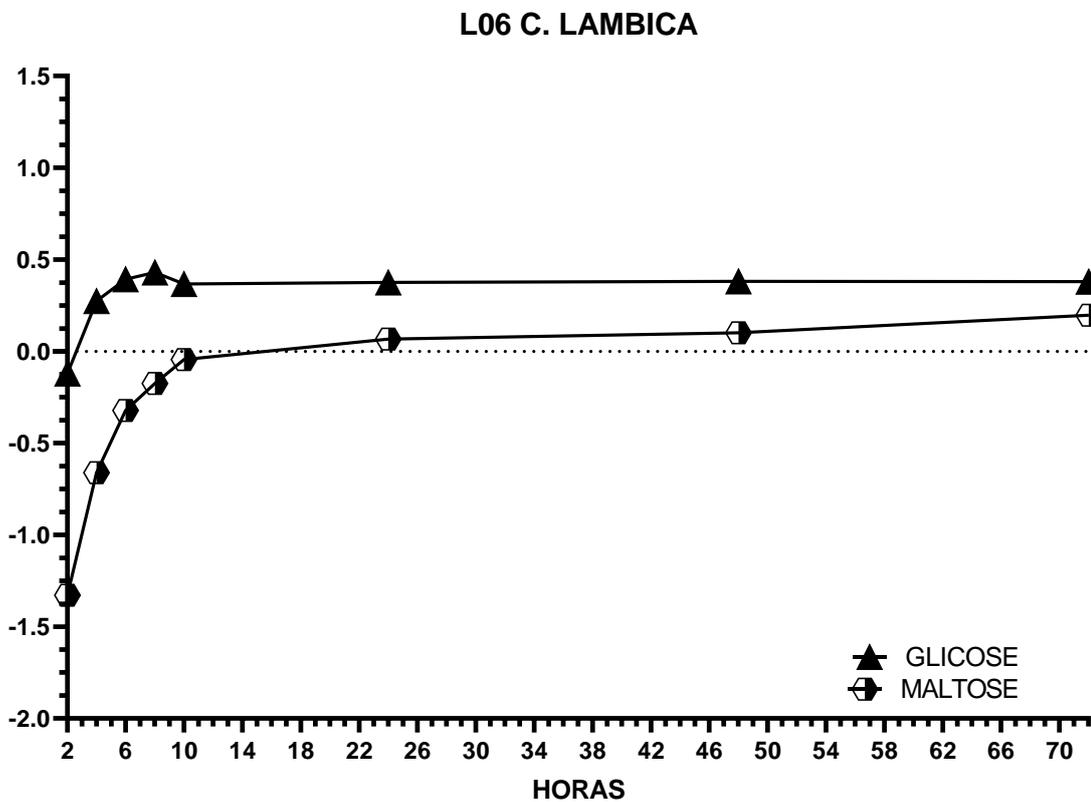


Figura 7: Curva de crescimento da levedura (Lev07) em meio YPG e YPM a 2%.

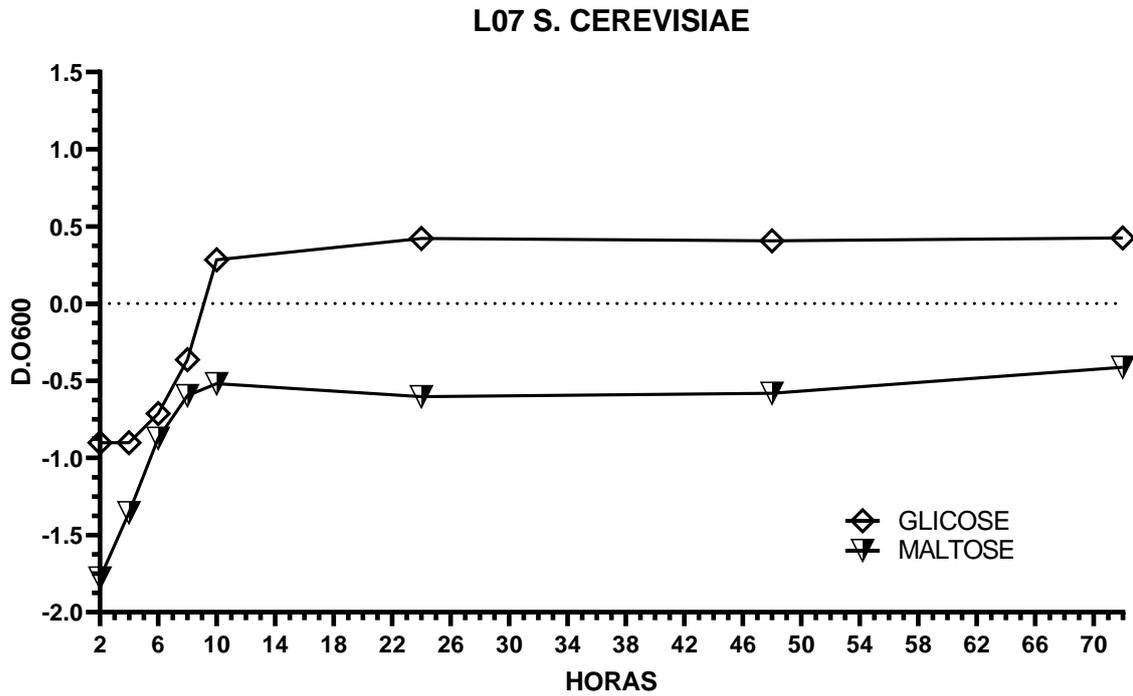


Figura 8: Curva de crescimento da levedura (Lev09) em meio YPG e YPM a 2%.

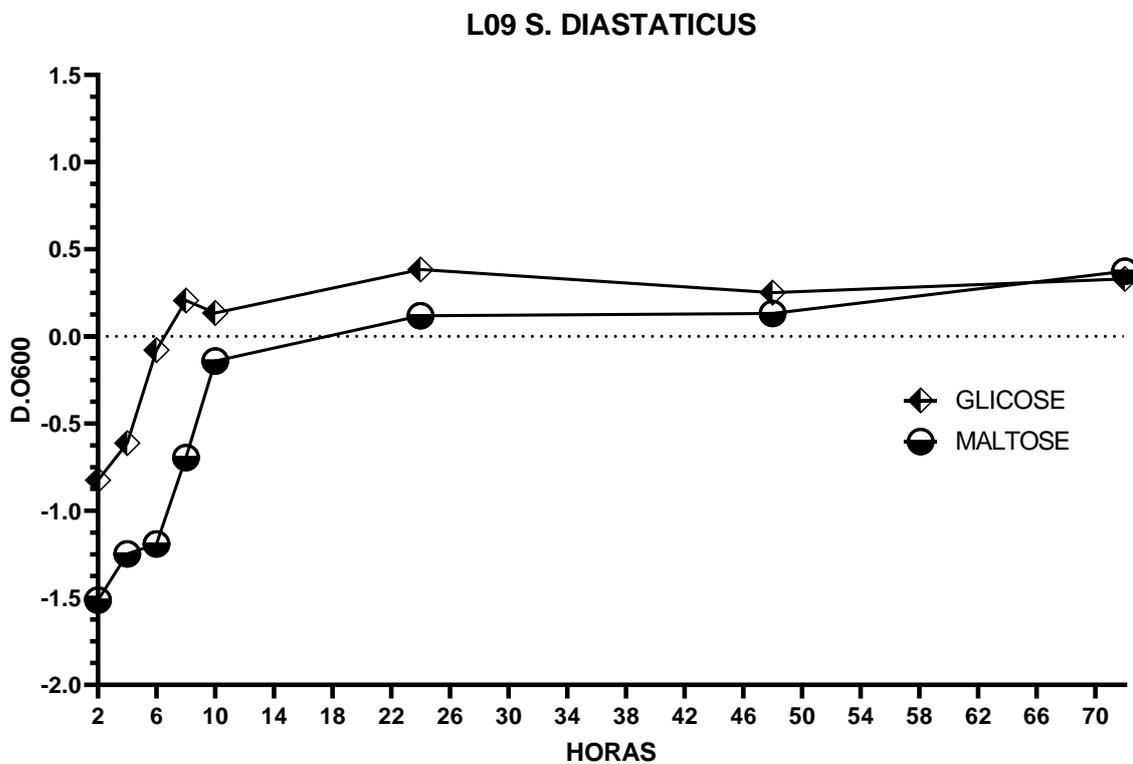
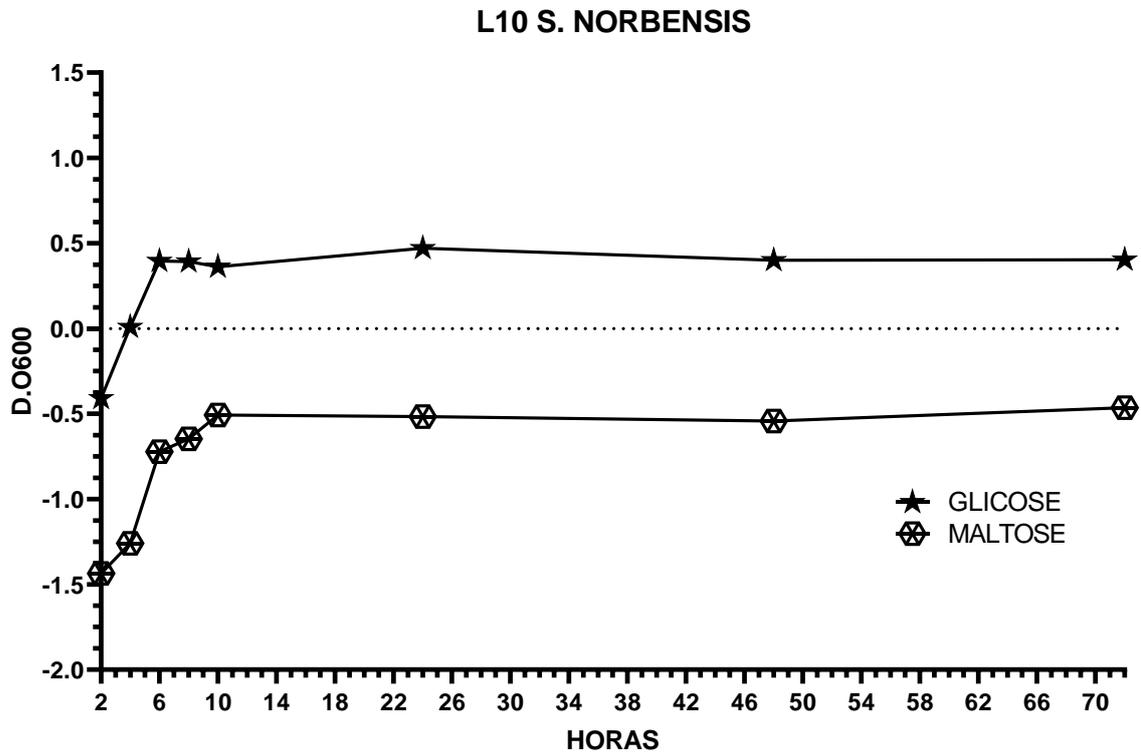


Figura 9: Curva de crescimento da levedura (Lev10) em meio YPG e YPM a 2%.



Pelos gráficos apresentados as leveduras L01, L06, L09 apresentam valores iguais ou superiores a 0,4 sendo leveduras promissoras em processos fermentativos.

As leveduras L05, L07 e L10 não tiveram o mesmo comportamento da metabolização de glicose para o meio contendo maltose. Segundo Libkind e seus colaboradores (2011), esse perfil pode ser uma característica de cepas do tipo lager, pois fermentam mais lentamente e precisam de temperaturas mais baixas do que a que foi utilizada neste experimento.

## 5.2 DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DE CEPAS ALE E LAGER

A ASBC (American Society of Brewing Chemists) recomenda a diferenciação bioquímica como critério de classificação de cepas de leveduras (ASBC, 1994).

Este ensaio se caracteriza pela capacidade das cepas de leveduras utilizarem o carboidrato melibiose que é formado por uma molécula de glicose e uma de galactose, essa assimilação é possível devido a produção da enzima melibiase. As cepas melibiase-positivas são classificadas do tipo Lager e as cepas melibiase-negativas como do tipo Ale (SAMPAIO *et al.*, 2017).

A principal característica do ensaio é a mudança de coloração de azul para amarelo pelas cepas que conseguem assimilar a melibiose, essa mudança é facilmente percebida nas figuras 10 e 11. As leveduras testadas apresentaram o perfil melibiose-positiva sendo classificadas tipo Lager como descritas na tabela 2.

Figura 10: Teste de diferenciação bioquímica no tempo inicial. Fonte: Autor

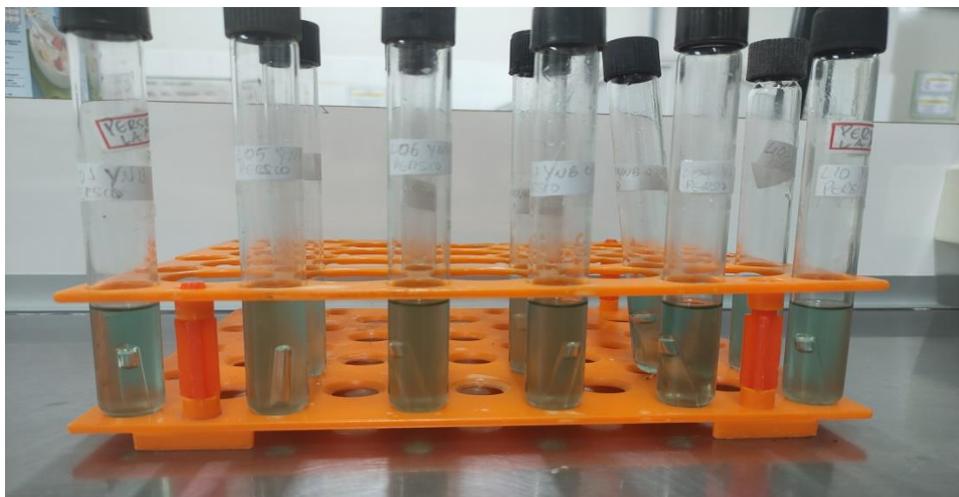


Figura 11: Teste de diferenciação bioquímica após 7 dias de incubação. Fonte: Autor

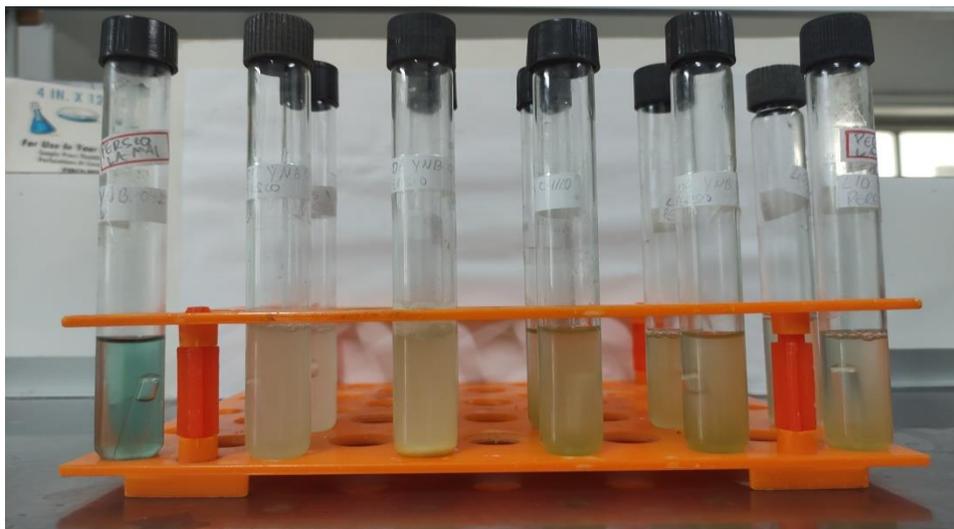


Tabela 2: Diferenciação Bioquímica

Cepas	Melibiose
Lev-Controle: S-04	-
Lev-01: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+
Lev-05: <i>Pichia membranifaciens</i>	+
Lev-06: <i>Candida lambica</i>	+
Lev-07: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+
Lev-09: <i>Saccharomyces diastaticus</i>	+
Lev-10: <i>Saccharomyces norbensis</i>	+

Legenda: (+) para descoloração e (-) para não descoloração.

A levedura controle S-04 não descoloriu o meio como esperado, pois se trata de uma levedura Ale descrita pelo fabricante. Com as demais leveduras a descoloração foi evidenciada podendo classifica-las como do tipo Lager. Gallone e colaboradores (2017) afirmam que esta capacidade de utilização da melibiose é possível devido ao gene MEL1 das cepas Lager. A levedura 01e 07, ambas *Saccharomyces cerevisiae* se apresentaram como melibiose-positiva, o que não era esperado, Sampaio *et al* (2017) em seus estudos também encontraram uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* com esse perfil. Nos estudos de

Naumova *et al.*,(2011) foi identificado 11 genes (MEL1-MEL11) em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, mesmo que esses genes estejam silenciados.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FLOCULAÇÃO

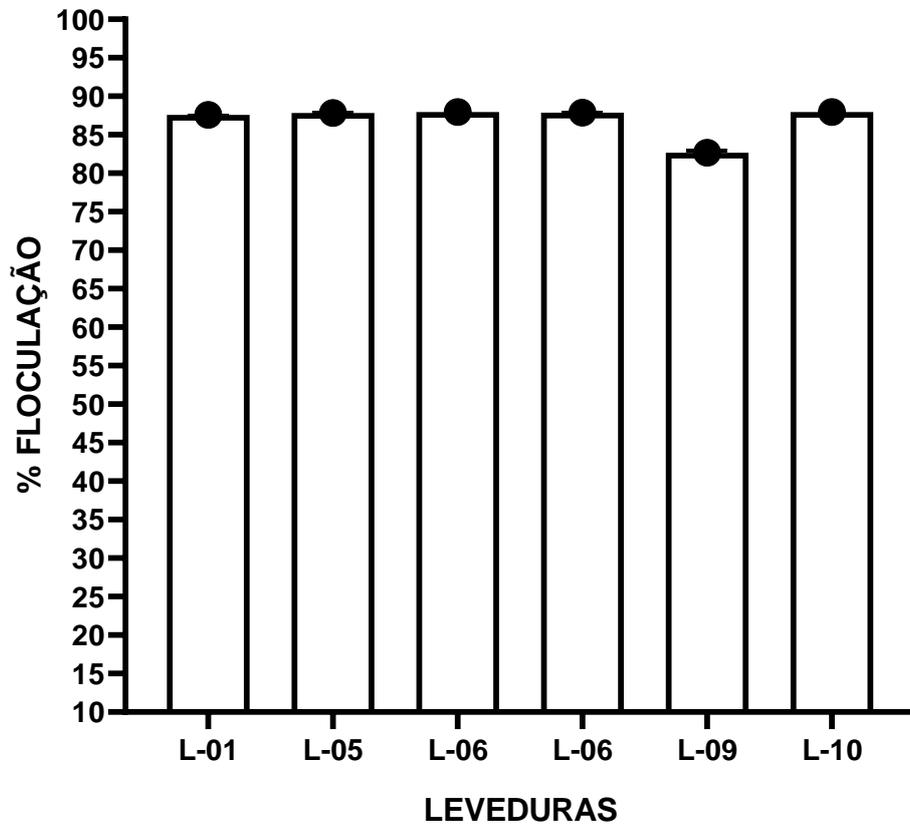
A floculação se trata de um agrupamento celular em que células formam aglomerados a partir de estruturas de superfície das paredes celulares, chamadas floculinas (lectinas). A capacidade de floculação é um elemento importante para o processo de produção na indústria de bebidas, já que, uma baixa floculação influencia negativamente no processo de separação, uma vez que a floculação acelera o processo de decantação, otimizando o processo (BOULTON, 2017).

A floculação é um processo de adaptação ao estresse, uma vez formado esse aglomerado tem função de manutenção e sobrevivência dos indivíduos. Os fatores que podem influenciar a floculação podem ser tanto por fatores físico-químicos tais como agitação, pH, temperatura, oxigênio, etanol, até fatores genéticos como relata Vestrepen e seus colaboradores em 2003. O cálcio é um elemento importante para o processo de floculação, isso se deve ao fato que as estruturas de lectina só se ligam a outras estruturas celulares como mananas ou glucanas na presença de ions de  $Ca^{+2}$  (STEWART, 2018).

Vestrepen e seus colaboradores( 2003), classificaram as leveduras a partir se seu potencial floculante: de 90 à 100% como levedura de extrema floculação, de 40% à 90% como levedura com característica industrial e 0 à 15% como levedura não-floculenta, essa classificação é sugerida pela American Society of Brewing Chemistry (ASBC).

Com base nessa classificação, o gráfico a seguir mostra os resultados com as leveduras testadas.

Figura 12: Gráfico de percentual de floculação. Fonte: Autor



Os percentuais de floculação das leveduras estudadas foram 87,57% para L-01, 87,84% para L-05, 87,94% para L-06, 87,89% para L-07, 82,67% para L-09 e 87,94% para L-10.

Todas as leveduras se mostraram como leveduras com característica industrial segundo o critério de classificação da American Society of Brewing Chemistry (ASBC).

#### 5.4 TESTE DE TOLERÂNCIA AO ETANOL

O processo fermentativo cervejeiro tem como principal objetivo transformar os carboidratos fermentescíveis do mosto em etanol e compostos voláteis com ou sem impacto sensorial. Apesar de ser produzido pelas leveduras, o etanol é tóxico e é capaz de deteriorar o produto fermentado no período pós-fermentação. (Smart, 2017).

Smart em 2017 relata uma série de efeitos prejudiciais da exposição das células de leveduras à altas concentrações de etanol durante a fermentação, tais como, inibição do crescimento e do tamanho das células, efeito mutagênico no metabolismo respiratório, redução da fermentação, inibição enzimática, aumento da permeabilidade da membrana celular, esses efeitos podem causar danos permanentes e comprometer as gerações futuras.

Geralmente as leveduras cervejeiras estão expostas a concentrações de 4 a 6% v/v de etanol podendo ultrapassar a 10% em cervejas de alta gravidade (Smart, 2017).

A tabela a seguir mostra os resultados de tolerância ao etanol com as leveduras testadas.

Tabela 3: Tolerância ao Etanol

Cepas	Tolerância ao Etanol		
	10%	15%	20%
Lev- Controle S-04	+	+	-
Lev-01- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-
Lev-05- <i>Pichia membranifaciens</i>	-	-	-
Lev-06- <i>Cândida lambica</i>	-	-	-
Lev-07- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-
Lev-09- <i>Saccharomyces diastaticus</i>	-	-	-
Lev-10- <i>Saccharomyces norbensis</i>	-	-	-

Legenda: (+) para tolerante e (-) para não tolerante.

De acordo com o gráfico, a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* se mostrou tolerante até 15% de etanol enquanto a *Saccharomyces cerevisiae* -01 mostrou-se tolerante em até 10%. A levedura controle por ser comercial já deve estar bem adaptada ao processo fermentativo enquanto a levedura 01 em mantida em preservação em coleção de cultura pode não estar bem adaptada concentrações maiores de etanol.

As demais leveduras não apresentaram tolerância às concentrações estudadas, mas isso não implica que estas leveduras não possam ser utilizadas em processos fermentativos. Cervejas com baixo teor alcoólico (low-alcohol) ou sem álcool (free-alcohol) tem tido aumento no interesse dos consumidores decorrente de uma maior preocupação com a saúde e possibilidade de menor ingestão calórica (Muller *et al.* 2017).

Algumas espécies de leveduras não-*Saccharomyces* apresentam perfil de tolerância semelhantes ao da *Saccharomyces cerevisiae*. Mukherjee e colaboradores em 2017 verificaram espécies de *Torulaspora delbruekii* e *Pichia kudriavzevii* tolerantes a 13% de etanol concluindo assim que espécies de leveduras não-*Saccharomyces* podem apresentar a mesma eficiência da *Saccharomyces cerevisiae*.

## 6 CONCLUSÕES

Com a realização destes experimentos podemos concluir que:

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae*(L-01), *Pichia membranifaciens*(L-05) e *Saccharomyces diastaticus*(L-09) são promissoras a serem aplicadas em processos fermentativos;

Todas as leveduras testadas com exceção da cepa comercial S-04, apresentaram um perfil de leveduras Lager;

Todas as leveduras testadas apresentaram valores acima de 80% nos ensaios de floculação, sendo classificadas como leveduras com características industriais;

As leveduras se mostraram pouco tolerantes ao etanol, destacando a *Saccharomyces cerevisiae*(L-01) que se mostrou tolerante a 10% de etanol;

Mesmo com base nesses resultados, é necessário mais estudos para certificar o real potencial destas leveduras não-*Saccharomyces* a serem aplicadas em processos fermentativos em pequena escala ou escala industrial.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J., MINS, C.W.; BLACWEL, M. *Introductory Mycology*. 4. P. 26-60. **J.WLEW & SONS**, New York, 1996.
- ALVES JR, S. L., HERBERTS, R. A., HOLLATZ, C., TRICHEZ, D., MILLETI, L. C., ARAUJO, P. S., STAMBUK, B. U. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the AGT1 permease. **Applied and Environmental Microbiology** 74: 1494-1501. 2008.
- ANDRIETTA, S. R.; SERRA, G. E.; ANDRIETTA, M. G. S. Classificação das linhagens de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB, açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 17, n. 5, p. 54-59, 1999.
- ARAUJO. T. M. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICO-MOLECULAR DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* ISOLADAS DE DORNAS DE FERMENTAÇÃO DE CACHAÇA PARA PRODUÇÃO DE CERVEJAS. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia NUPEB. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, Minas Gerais. 2013.**
- AZHAR, S.H. M. RAHMATH, A. JAMBO, S. A. MARBAWI, H. GANSAU, J. A. FAIK, A. A. RODRIGUES, K. F.: Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports** 10 52–61. 2017.
- BASSO RF, ALCARDE AR, PORTUGAL CB Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Res Int** 86:112–120. 2016.
- BASSO, RAFAEL FELIPE. Caracterização de leveduras não convencionais para produção de cervejas. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - **Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, 2019.
- BELLUT K. & ARENDT E. K. Chance and Challenge: Non-*Saccharomyces* Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing – A Review, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77:2, 77-91, DOI: 10.1080/03610470.2019.1569452. 2019
- BELLUT, KONSTANTIN & ARENDT, ELKE. Chance and Challenge: Non- *Saccharomyces* Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing – A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. 77. 1-15. 10.1080/03610470.2019.1569452. 2019.
- BENEVIDES, J. A. J; MARINHO, G.M. Degradação de pesticidas por fungos-uma revisão. **Holos**, Ano 31, Vol. 2, 2015.
- BORTOLI, DAIANE A. DA S.; SANTOS, FLÁVIO DOS; STOCCO, NÁDIA M.; ORELLI JR., ALESSANDRO; TOM, ARIEL; NEME, FERNANDA F.; NASCIMENTO, DANIELA DEFAVARI DO; *Leveduras e produção de cervejas – Revisão*. **Bioenergia em revista: diálogos**, ano 3, n. 1, p. 45-58, jan./jun. 2013.

BOULTON, C. *Brewing Yeast Physiology. Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology*, **Caister Academic Press** 2017.

BOURDCHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J.C.; GERDS, M.L.; HAMMES, W.P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I.B.; PRAJAPATI, J.B.; SETO, Y.; SCHURE, E.T.; BOVEN, A.V.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJYELAARS, S.; HANSEN, E.B. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* **154: 87-97**. 2012.

BRASIL. **Anuário da Cerveja**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA 2020.

BRASIL. Decreto nº 2.314/1997, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta da Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. **Diário Oficial da União, Brasília, 04 de junho de 2009**.

BRASIL. Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres, caderno 4 Fermentados Alcoólicos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. **Secretaria de Defesa Agropecuária- SDA, Coordenação Geral de Apoio Laboratorial-CGAL, 2010**.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1ª parte- As leveduras. **Revista Analítica**. São Paulo, 2006

CASAREGOLA, S.; NGUYEN, H.V.; LAPATHITIS, G.; KOTYK, A.; GAILLARDIN, C. Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p.1607–1618, 2001.

COSTA V, MORADAS-FERREIRA P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: Insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med*; 22(4-5):217-46. 2001.

CRAUWELS S, STEENSELS J, AERTS G., WILLEMS K. A. VERSTREPEN K. J AND LIEVENS B.; *Brettanomyces Bruxellensis*, Essential Contributor in Spontaneous Beer Fermentations Providing Novel Opportunities for the Brewing Industry. **BrewingScience**; Vol.68. 2015.

D'HAUTCOURT, O. e SMART, K.A. Measurement of brewing yeast flocculation. *Journal of American Society of Brewery Chemistry*. 57: 123-128. 1999.

DASSARI, S.; KOLLING, R. Cytosolic localization of acetohydroxyacid synthase Ilv2 and its impact on diacetyl formation during beer fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **77: 727–731**. 2011.

DRAGONE, G.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Cerveja. In VENTURINI FILHO, W. G. Bebidas alcoólicas: **Ciência e tecnologia**. Vol. 1 São Paulo: Blucher, 2010.

DUONG, C.T.; STRACK, L.; FUTSCHIL, M.; KATOU, Y.; NAKAO, Y.; FUJIMURA, T.; SHIRAHIGE, K.; KODAMA, Y.; NEVOIGT, E. Identification of Sc-type ILV6 as a target to reduce diacetyl formation in lager brewer's yeast. *Metabolic Engineering*, 13: 638-647. 2011.

DUTCOSKY, S. D. Análise Sensorial de Alimentos. 2ed. Curitiba: **Champagat**. 2011.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2ªed. Revisada. Caxias do Sul: **Educs**, 2010.

FERREIRA, A. S; BENKA, C. L. Produção de cerveja artesanal a partir de malte germinado pelo método convencional e tempo reduzido de germinação. Graduação – **Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão**, 2014.

G.M. WALKER, Yeasts Fungi Biol Appl, in: M. Schaechter (Ed.), The Desk Encyclopedia of Microbiology, **Elsevier**, Oxford. pp. 1174–1187. 2009.

GALLONE, B.; MERTENS, S.; CRAUWELSE, S.; et al. Genomics and Evolution of Beer Yeasts. *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology*, **Caister Academic Press** 2017.

GIORGI, V. V; JÚNIOR, J. O. C. A produção de cervejeira como patrimônio intangível. **Cultura Histórica & Patrimônio** ,v. 3, n. 2, 2016.

GRIFFIN, D. Fungal Physiology. New York: **Wiley Liss**. 39, 1994.

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*. v. 3, a.421, p. 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00421. 2012.

INGLEDEW, W.M. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: A yeast primer. In *The Alcohol Textbook*, 3rd ed.; Lyons, T.P., Kelsall, D.R., Eds.; **Nottingham University Press**: Nottingham, UK. pp. 49–87. 1999.

INSTITUTO ADOLF LUTZ- IAL, Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz, **Metodos físicos e químicos para análise de alimentos**. 4º ed., v. 1, 2008.

JOLLY NP, VARELA C, PRETORIUS I: Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res*, 14: p.215-237. 2014.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. 2 nd ed. Berlin: VLB, 1999.

LEI, H.; ZAO, H.; YU, Z.; ZAO, M. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166: 1562–1574. 2012.

LODOLO E, KOCK J, AXCELL B, BROOKS M.. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res* 8: 1018–1036. 2008.

MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry of beer: Part 1: Flavor and thresholds of 239 aroma volatiles, **Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.** 12, p. 107–117. 1975

MORADO, R. (2009). **Larousse da Cerveja**. São Paulo, *Larousse do Brasil*.

MUKHERJEE, V. *et al.* Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 2016, 2017.

MÜLLER, M. *et al.* Physical methods for dealcoholization of beverage matrices and their impact on quality attributes. **ChemBioEng Reviews**, v. 4, n. 5, p. 310–326, 2017.

NAUMOVA, E.S.; SERPOVA, E.V.; KORSHUNOVA, I.V.; NAUMOV, G.I. Molecular polymorphism of  $\alpha$ -galactosidase *MEL* genes of *Saccharomyces* yeasts. **Microbiology**. 80: p. 502–513. 2011.

OLANIRAN, A.O.; MAHARAJ, Y.R.; PILLAY, B. Effects of fermentation temperature on the composition of beer volatile compounds, organoleptic quality and spent yeast density. **Electronic Journal of Biotechnology** [on line]. 14. 2011.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, p. 19-24. 2004.

OLIVEIRA, N. A. M. Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja. Minas Gerais, **Programa de pós-graduação, UFMG**. 44 p. 2011.

OSTERGAARD S, OLSSON L, NIELSEN J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**; 64(1): p. 34–50. 2000.

PARAPOULI M, VASILEIADIS A, AFENDRA AS, HATZILOUKAS E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiol**. Feb 11;6(1):1-31. doi: 10.3934/microbiol.2020001. 2020

PIRES E, TEIXEIRA J, BRÁNYIK T, VINCENTE A. Yeast: the soul of beer's aroma – a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Appl Microbiol Biotechnol** 98: 1937–1949. 2014.

PRIEST, F.G.; STEWART, G.G. Handbook of Brewing, 2nd ed.; **CRC Press**: Boca Raton, FL, USA, 2006.

RODRIGUES, K. A.; MARINHO, M. M. S. Fungos e Águas Residuárias Industriais: **Nova Tecnologia**. Recife: Imprima, 2012.

SAMPAIO, J. P.; PONTES, A.; LIBKIND, D.; HUTZLER, M. Taxonomy, Diversity, and Typing of Brewing Yeasts. *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology*, **Caister Academic Press** 2017.

SICARD, D.; LEGRAS, J.L. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Compts Rendus Biologies**. 334: 22. 2011.

SILVA, J. B. A. Cerveja. In: VENTURINI, W. G. Filho. Tecnologia de bebidas. São Paulo: **Edgar Blücher**. Cap. 15 p. 353. 2005.

SINDICERV, site. Disponível em <http://www.sindicerv.com.br/tipo-cerveja.php>. Acessado em 07/06/19.

SMART, K. A. Yeast Stress and Brewing Fermentations. *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology*, **Caister Academic Press** 2017.

STEENSELS J, VERSTREPEN KJ Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annu Rev Microbiol* 68(1):61–80 2014.

STEWART, G. G.; RUSSEL, I. An introduction to brewing Science & Technology: series III: brewer's yeast. London: **The Institute of brewing**, 108p. 1998.

T. BOEKHOUT, C.P. KURTZMAN, Principles and methods used in yeast classification and an overview of currently accepted yeast genera, in: K. Wolf (Ed.), *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, **Springer-Verlag**, Berlin, pp. 1–99 1996.

VARELA C: The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016, 100:9861-9874.

VERSTREPEN K, DERDELINCKX G, DELVAUX F. Esters in beer. Part 1: The fermentation process: more than ethanol formation. *Cerevisia* 28: p. 41–49. 2003.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F. R. Yeast flocculation: What brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer Verlag .25. jan. 2003.

WALKER G. M , STEWART G.G. Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*. p. 2, 30. 2016.

WALKER, G. M., & WALKER, R. S. K. Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Advances in Applied Microbiology*. doi:10.1016/bs.aambs.2018.05.003. 2018.

WALKER, G.M. Yeast Technology. In: *Yeast Physiology and Biotechnology*. Scotland: **John Wiley & Sons**. p. 265-320. 2000.

WALKER, G.M. Yeasts. In *Eukaryotic Microbes*; Schaechter, M., Ed.; **Academic Press/Elsevier Science Publishers**: Oxford, UK. pp. 3–17. 2011.

WANG, P.Y., JOHNSON, B.F. AND SCHNEIDER, H. *Biotechnology Letters*, 3. 273 1980.