

Potencial Tecnológico de Leveduras Não-Saccharomyces

Technological Potential of Non-Saccharomyces yeasts

Potencial Tecnológico de las Levaduras No Saccharomyces

Recebido: 10/07/2022 | Revisado: 22/07/2022 | Aceito: 25/07/2022 | Publicado: 02/08/2022

Pérsio Alexandre da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6281-4515>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: persiosilva@gmail.com.br

Ninive Bezerra Florêncio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8807-288X>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: ninive.florencio@gmail.com

Gleyka Daisa de Melo Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1041-6977>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: santosgleyka@gmail.com

Erik Jonne Vieira de Melo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3151-0949>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: erikjonne@gmail.com

Norma Buarque de Gusmão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6700-9876>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: normagusmao@gmail.com

Resumo

A cerveja é uma bebida constituída por água, malte, lúpulo e leveduras. A levedura é o principal agente transformador, convertendo os açúcares em etanol, CO₂ e uma série de compostos conferindo sabor e aroma. Destaca-se as leveduras Saccharomyces como as mais utilizadas pela indústria. Com o crescente número de consumidores de cervejas e a grande diversidade de sabores, o número de cervejarias também vêm aumentando. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial biotecnológico de leveduras não-Saccharomyces mantidas em coleção. Avaliou-se a potencialidade biotecnológica para serem utilizadas na indústria. Realizou-se a diferenciação bioquímica das cepas em ALE e LAGER, a tolerância a etanol e o potencial de floculação das leveduras. Os resultados obtidos 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 permitem classificá-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. 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. O 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

Beer is a beverage made up of water, malt, hops and yeast. Yeast is the main transforming agent, converting sugars into ethanol, CO₂ and a series of compounds providing flavor and aroma. Saccharomyces yeasts stand out as the most used by the industry. With the growing number of beer consumers and the great diversity of flavors, the number of breweries is also increasing. The objective of this research was to evaluate the biotechnological potential of non-Saccharomyces yeasts kept in collections. The biotechnological potential to be used in the industry was evaluated. Biochemical differentiation of strains into ALE and LAGER, ethanol tolerance and yeast flocculation potential were performed. The results obtained showed that the yeasts presented a potential to be applied in fermentation processes. All yeasts used in the biochemical differentiation tests showed 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. 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. The study presented promising results suggesting that yeasts can be used in fermentation processes, being necessary to carry out further investigations to certify the real potential of these yeasts.

Keywords: Yeasts; Non-saccharomyces; Fermentation processes.

Resumen

La cerveza es una bebida compuesta por agua, malta, lúpulo y levadura. La levadura es el principal agente transformador, convirtiendo los azúcares en etanol, CO₂ y una serie de compuestos que aportan sabor y aroma. Las levaduras *Saccharomyces* se destacan como las más utilizadas por la industria. Con el creciente número de consumidores de cerveza y la gran diversidad de sabores, el número de cervecerías también está aumentando. El objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial biotecnológico de levaduras no *Saccharomyces* conservadas en colecciones. Se evaluó el potencial biotecnológico a ser utilizado en la industria. Se realizó la diferenciación bioquímica de las cepas en ALE y LAGER, la tolerancia al etanol y el potencial de floculación de la levadura. Los resultados obtenidos mostraron que las levaduras presentaron potencial para ser aplicadas en procesos de fermentación. Todas las levaduras utilizadas en los ensayos de diferenciación bioquímica arrojaron resultados que permiten clasificarlas como levaduras tipo LAGER. En la prueba de floculación, todas las levaduras resultaron ser levaduras industriales según los criterios de clasificación de la American Society of Brewing Chemistry. En la evaluación de la tolerancia al etanol a concentraciones del 10%, 15% y 20%, solo la levadura utilizada en el control mostró tolerancia al etanol al 15%, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* obtenida de la colección de cultivos mostró tolerancia al etanol al 10%, y la otros no mostraron tolerancia al etanol a las concentraciones utilizadas. El estudio presentó resultados prometedores que sugieren que las levaduras pueden ser utilizadas en procesos de fermentación, siendo necesario realizar más investigaciones para certificar el potencial real de estas levaduras.

Palabras clave: Levaduras; No saccharomyces; Procesos de fermentación.

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 (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). 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). 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*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces* (Varela, 2016). 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. 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. 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. Metodologia

2.1 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. As leveduras estudadas foram *Saccharomyces cerevisiae* (URM-7481), *Pichia membranifaciens* (URM-4780), *Candida lambica* (URM-4778), *Saccharomyces cerevisiae* (UFPEDA-1109), *Saccharomyces diastaticus* (UFPEDA-1212), *Saccharomyces norbensis* (UFPEDA-1267).

2.2 Meios de Cultura

Os meios de culturas utilizados foram meio YP e o meio YNB, 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. 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).

2.3 Avaliação da Potencialidade Biotecnológica para a Indústria Cervejeira

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 (Araujo, 2013).

2.4 Diferenciação Bioquímica de Cepas Ale e Lager

De acordo com a American Society of Brewing Chemists (ASBC, 1992), a diferenciação de cepas ale e lager cervejeiras se baseiam na capacidade de metabolização de melibiose e nas temperaturas de crescimento. As colônias foram 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.

2.5 Avaliação da Capacidade de Flocculação

Para determinação da capacidade de flocculação, foi aplicado o teste de Helms modificado (D'Hautcourt & Smart, 2018). Para isso, as leveduras foram 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), foram 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 a 10000 RPM, as células foram 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

seguiram para a ressuspensão em EDTA 0,5M (pH 7,0). As células foram submetidas à 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. O teste foi realizado em triplicata e determinada a porcentagem de floculação.

2.6 Teste de Tolerância ao Etanol

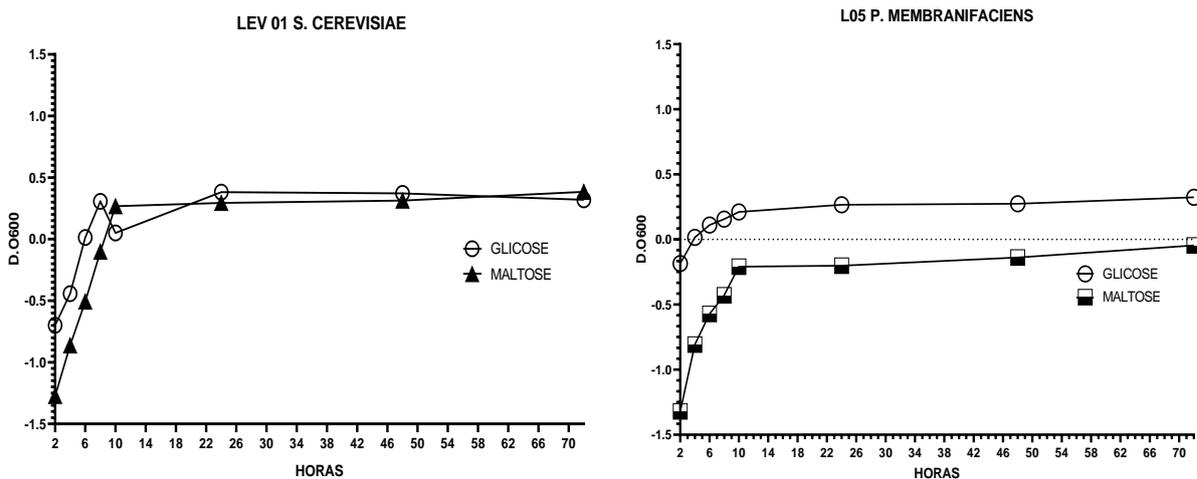
As leveduras foram crescidas em tubos contendo 4 mL de YP maltose 2% por 24 horas sob agitação a 200 rpm em mesa agitadora. Em microplacas de 96 poços contendo 150 µL de YP maltose 2% e etanol 10% (v/v) foram inoculados 1,5 µL de células nas diluições de 10⁻¹ até 10⁻⁸. As placas foram incubadas a 30°C 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). Este teste foi adaptado de Araujo, 2013.

3. Resultados e Discussão

3.1 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. A seguir apresenta-se a Figura 1 para o crescimento das leveduras LEV 01 *S. cerevisiae* e LEV 05 *P membranifaciens* podemos observar o desempenho das leveduras em meios com glicose e maltose.

Figura 1: Curva de crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia Membranifaciens* em meio YPG e YPM a 2%.



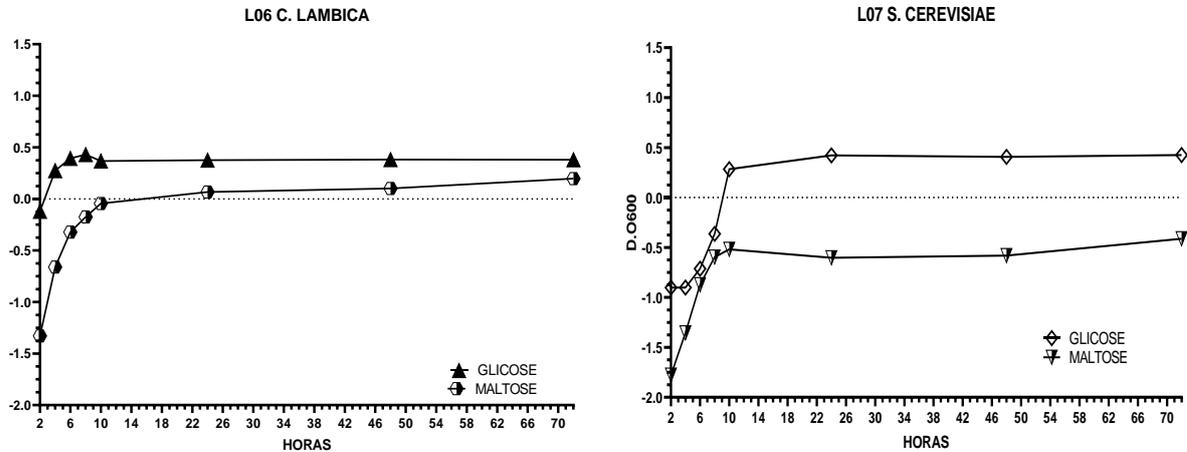
Fonte: Autores.

Observando os gráficos, é possível perceber que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (URM-7481) apresentou perfil de crescimento semelhante para ambas às fontes de carbono tendo os valores de D.O₍₆₀₀₎ em torno de 0,4, diferente da levedura *Pichia membranifaciens* onde apresentou melhor crescimento para o meio contendo glicose.

Na Figura 2 seguinte, apresenta-se dados de crescimento de leveduras do tipo LEV 06 *C. lambica* e LEV 07 *S.*

cerevisiae.

Figura 2: Curva de crescimento das leveduras *Candida lambica* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio YPG e YPM a 2%.

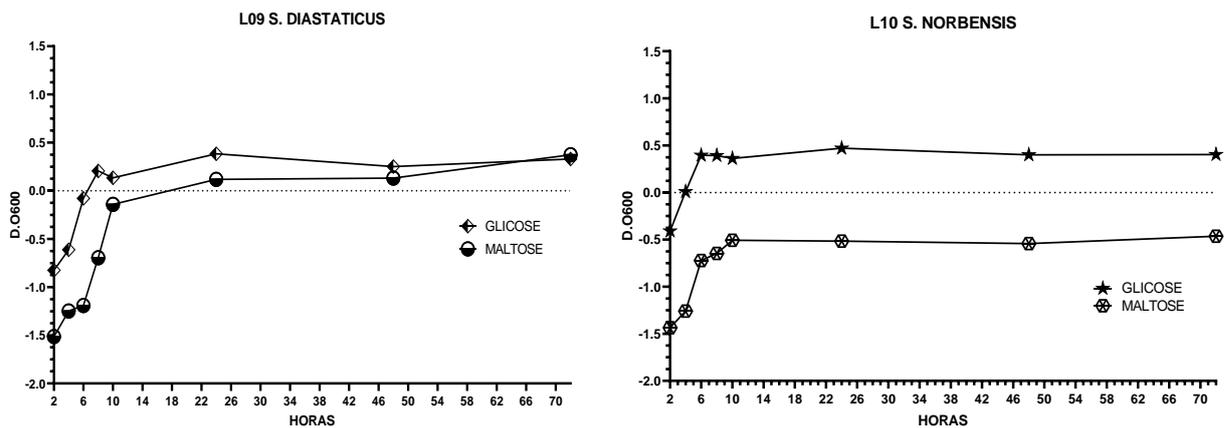


Fonte: Autores.

Observando os gráficos acima, é possível perceber que a levedura *Candida lambica* apresentou perfil de crescimento semelhante para ambas às fontes de carbono, apesar de atingir valores de 0.4 após 70 horas, diferentemente da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (UFPEDA-1109), onde apresentou melhor crescimento para o meio contendo glicose.

Na Figura 3 seguinte, apresenta-se dados de crescimento de leveduras do tipo LEV 09 *S. diastaticus* e LEV 10 *S. norbensis*.

Figura 3: Curva de crescimento das leveduras *Saccharomyces diastaticus* e *Saccharomyces norbensis* em meio YPG e YPM a 2%.



Fonte: Autores.

Observando os gráficos acima, é possível perceber que a levedura *Saccharomyces diastaticus* apresentou perfil de crescimento semelhante para ambas às fontes de carbono, apesar de atingir valores de 0.4 após 70 horas, diferentemente da levedura *Saccharomyces norbensis*, onde apresentou melhor crescimento para o meio contendo glicose.

Pelos gráficos apresentados as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lambica* e *Saccharomyces diastaticus* apresentam valores iguais ou superiores a 0,4 sendo leveduras promissoras em processos fermentativos. As leveduras *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces norbensis* 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.

3.2 Diferenciação Bioquímica de Cepas Ale e Lager

A 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. As leveduras testadas apresentaram o perfil melibiose-positiva sendo classificadas tipo Lager como descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Diferenciação bioquímica. Legenda: (+) para descoloração e (-) para não descoloração.

Cepas	Melibiose
Controle: S-04	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+
<i>Pichia membranifaciens</i>	+
<i>Candida lambica</i>	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	+
<i>Saccharomyces norbensis</i>	+

Fonte: Autores.

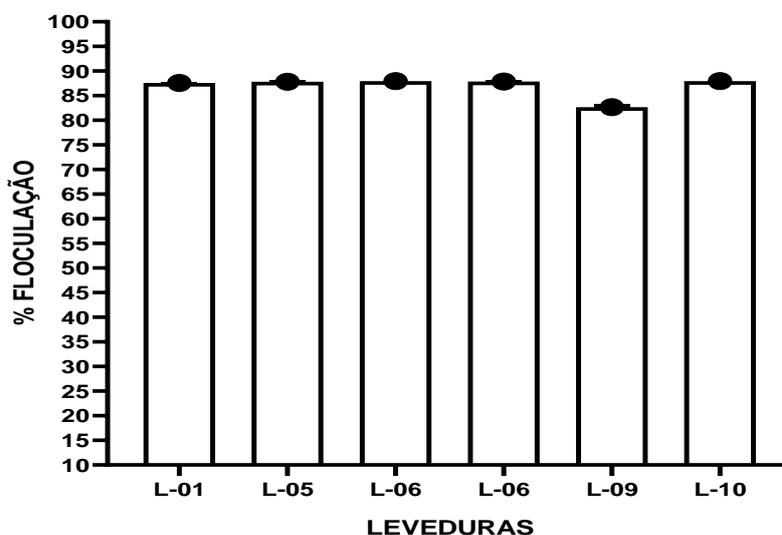
A levedura controle S-04 não descoloriu o meio como esperado, pois, se trata de uma levedura Ale descrita pelo fabricante. Com as demais leveduras a descoloração foi evidenciada podendo classificá-las como do tipo Lager. Gallone e colaboradores (2017) afirmam que esta capacidade de utilização da melibiose é possível devido ao gene MEL1 das cepas Lager. A leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* (URM-7481 e UFPEDA-1109) 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.

3.3 Avaliação da Capacidade de Flocculação

A flocculação 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 flocculação é um elemento importante para o processo de produção na indústria de bebidas, já que, uma baixa flocculação influencia negativamente no processo de separação, uma vez que a flocculação acelera o processo de decantação, otimizando o processo (Boulton, 2017). A flocculação 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 flocculação 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 íons de Ca^{+2} (Stewart, 1998). Vestrepen e seus colaboradores (2003), classificaram as leveduras a partir de seu potencial floculante: de 90 a 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. Com base nessa classificação, o gráfico na Figura 4 a seguir, mostra os resultados com as leveduras testadas.

Figura 4: Gráfico de percentual de floculação. Legenda: L-01 (*Saccharomyces cerevisiae*), L-05 (*Pichia membranifaciens*), L-06 (*Candida lambica*), L-07 (*Saccharomyces cerevisiae*), L-09 (*Saccharomyces diastaticus*), L-10 (*Saccharomyces norbensis*).



Fonte: Autores.

Os percentuais de floculação das leveduras estudadas foram 87,57% para *Saccharomyces cerevisiae*, 87,84% para *Pichia membranifaciens*, 87,94% para *Candida lambica*, 87,89% para *Saccharomyces cerevisiae*, 82,67% para *Saccharomyces diastaticus* e 87,94% para *Saccharomyces norbensis*. Todas as leveduras se mostraram como leveduras com característica industrial segundo o critério de classificação da ASBC.

3.4 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 2 a seguir mostra os resultados de tolerância ao etanol com as leveduras testadas.

Tabela 2: Tolerância ao etanol. Legenda: (+) para tolerante e (-) para não tolerante.

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

Fonte: Autores.

De acordo com a tabela apresentada, a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* se mostrou tolerante até 15% de etanol enquanto a *Saccharomyces cerevisiae* (URM-7481) e mostrou-se tolerante em até 10%. A levedura controle por ser comercial já deve estar bem adaptada ao processo fermentativo enquanto a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (URM-7481) é 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 *Torulasporea 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*.

4. Conclusão

Com a realização destes experimentos podemos concluir que as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*(URM-7481), *Pichia membranifaciens*(URM-4780), *Candida lambica*(URM-4778), e *Saccharomyces diastaticus*(UFPE-1212) são promissoras a serem aplicadas em processos fermentativos, se destacando a levedura *Candida lambica* por apresentar melhor resposta nos testes realizados. Todas as leveduras testadas com exceção da cepa comercial S-04, apresentaram um perfil de leveduras Lager, assim como 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*(URM-7481) que se mostrou tolerante a 10% de etanol.

Mesmo com base nesses resultados, é necessário certificar o real potencial destas leveduras não-*Saccharomyces* com base em estudos de perfil fermentativo e prospecção química dos produtos de fermentação, para que futuramente as leveduras estudadas possam ser utilizadas em indústrias de pequeno à grande porte.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial LAMAI - UFPE, e o apoio das agências brasileiras de pesquisa CNPq, FACEPE e CAPES pelo financiamento do projeto.

Referências

- Alves jr, S. L., Herberts, R. A., Hollatz, C., Trichez, D., Milleti, L. C., Araujo, P. S., & Stambuk, B. U. (2008). 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. 10.1128/AEM.02570-07
- Andrietta, S. R., Serra, G. E., & Andrietta, M. G. S. (1999). Classificação das linhagens de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. *STAB, açúcar, álcool e subprodutos*, 17,54-59.
- Araujo, T. M. (2013). *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.
- ASBC (1992) *ASBC Methods of Analysis* (8th ed.), American Society of Brewing
- Basso, R. F. (2019). *Caracterização de leveduras não convencionais para produção de cervejas*. Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba. São Paulo.
- Boulton, C. (2017) *Brewing Yeast Physiology. Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology*, Caister Academic Press, 1-28. 10.21775/9781910190616.01.
- Brasil. (2020). *Anuário da Cerveja*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/http-www-cervbrasil-org-br-novo_site-wp-content-uploads-2021-04-anuariocerveja2-pdf/.
- D'hautcourt, O. & Smart, K. A. (2018). Measurement of brewing yeast flocculation. *Journal of American Society of Brewery Chemistry*. 57: 123-128. doi: 10.1094/ASBCJ-57-0123.
- Gallone, B., Mertens, S., Crauwelse, S., Lievens, B., Verstrepen, K. J., & Steesels, J. (2017). Genomics and Evolution of Beer Yeasts. *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology*, Caister Academic Press, 145-178. 10.21775/9781910190616.06
- Giorgi, V. V., & Júnior, J. O. C. (2016) *A produção de cervejeira como patrimônio intangível*. Cultura Histórica & Patrimônio.
- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*. (a.421), 1-12. 10.3389/fmicb.2012.00421.
- Mukherjee, V., Radecka, D., Aerts, G., Verstrepen, K. J., Lievens, B., & Thevelein, J. M. (2017). Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnology for biofuels*, 10, 216. 10.1186/s13068-017-0899-5
- Müller, M., Bellut, K., Tippmann, J., & Becker, T. (2017), Physical Methods for Dealcoholization of Beverage Matrices and their Impact on Quality Attributes. *ChemBioEng Reviews*, 4, 5,310–326. 10.1002/cben.201700010
- Naumova, E. S., Serpova, E. V., Korshunova, I. V., & Naumov, G. I. (2011). Molecular polymorphism of α -galactosidase MEL genes of *Saccharomyces* yeasts. *Microbiology*, 80(4), 502–513. doi:10.1134/s0026261711040151
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol*, 6(1),1-31.10.3934/microbiol.2020001.
- Sampaio, J. P., Pontes, A., Libkind, D., & Hutzler, M. (2017). Taxonomy, Diversity, and Typing of Brewing Yeasts. *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology*, Caister Academic Press, 85-118. 10.21775/9781910190616.04
- Sicard, D., & Legras, J. L. (2011). Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Compts Rendus Biologies*. 334(3):229-36. 10.1016/j.crv.2010.12.016.
- Smart, K. A. (2017). Yeast Stress and Brewing Fermentations. *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology*, Caister Academic Press, 29-52. 10.21775/9781910190616.02.
- Stewart, G. G., & Russel, I. (1998). An introduction to brewing Science & Technology: series III: brewer's yeast. *London: The Institute of brewing*.
- Varela C: (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(23), 9861-9874. 10.1007/s00253-016-7941-6
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2003). Yeast flocculation: What brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(3), 197-205. 10.1007/s00253-002-1200-8.