



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE NUTRIÇÃO – ENUT  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS – DEALI**



**PEDRO HENRIQUE CARVALHO SILVA GOMES**

**SCREENING DE LEVEDURAS ISOLADAS DE  
DORNAS DE FERMENTAÇÃO DE CACHAÇA COM  
POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJAS  
SEM ÁLCOOL OU COM BAIXO TEOR ALCÓLICO**

**OURO PRETO**

**JULHO/ 2021**

# **SCREENING DE LEVEDURAS ISOLADAS DE DORNAS DE FERMENTAÇÃO DE CACHAÇA COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJAS SEM ÁLCOOL OU COM BAIXO TEOR ALCÓLICO**

Submetido por

Pedro Henrique Carvalho Silva Gomes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Aureliano Claret Cunha  
Co-orientadores: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão, Profa. Dra. Izinara Rosse da Cruz, Dra. Débora Faria Silva.

**OURO PRETO**

**JULHO/ 2021**





## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Digite o nome do autor Pedro Henrique Carvalho Silva Gomes**

### **Screening de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça para a produção de cervejas sem álcool ou com baixo teor alcoólico**

Monografia apresentada ao Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Aprovada em 24 de abril de 2021

#### Membros da banca

Prof. Dr. Aureliano Claret da Cunha - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto  
Prfa. Dra. Izinara Rosse da Cruz - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Fernanda Godoy Santos - Queen's Universty Belfast, UK

Aureliano Claret da Cunha, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 30/07/2021



Documento assinado eletronicamente por **Aureliano Claret da Cunha, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/01/2023, às 14:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0460317** e o código CRC **4A2E0882**.

## RESUMO

No Brasil, o setor de bebidas é responsável por uma importante parte da economia, gerando milhares de empregos. O atual público consumidor tem sido mais exigente com a qualidade da bebida consumida e também está à procura de novos sabores. Sancionada a lei seca no Brasil, cada vez mais consumidores tem procurado por bebidas sem álcool, o que ainda não é comum na produção de cerveja artesanal, além também é claro, na divulgação dos benefícios do consumo moderado da bebida e a expansão do mercado para países onde o consumo de álcool é proibido por lei. O objetivo do presente trabalho é selecionar cepas de levedura isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cerveja sem álcool ou com baixo teor alcoólico. As cepas foram isoladas segundo os seguintes critérios: não fermentação de maltose, ausência de produção de sulfeto de hidrogênio, resistência a cerulenina, 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL) e  $\rho$ -fluoro-DL-fenilalanina (PFP). Neste trabalho foram analisadas 182 cepas, destas, 4 cepas apresentaram-se com alto potencial para a produção de cervejas sem álcool ou com baixo teor alcoólico. A perspectiva do trabalho será além da produção da cerveja em escala laboratorial, também analisar a qualidade da bebida, o que confirmara o potencial das leveduras.

**Palavras-chave:** Seleção, maltose, bebidas, sem álcool, baixo teor alcoólico.

## ABSTRACT

In Brazil the beverage market is responsible for a big part of the economy, generating thousands of jobs. The current consumers audience has been most demanding with the quality of the consuming beverage and also is seeking out for new flavors. With the implementation of transit rules for non-consumption of alcohol while driving, the consumers are searching out for free-alcohol beverages, what isn't common yet to the handmade production of free-alcohol beer. The subject of this paper was do the screening of yeasts isolated from cachaça fermentation vat to production alcohol-free or low alcohol beer. The yeasts were selected following the criteria: non-fermentation of maltose, absence of hydrogen sulfide production, resistance to cerulenin, 5,5,5-trifluoro-DL-leucin (TFL) e  $p$ -fluoro-DL-fenilanin (PFP). In this paper 182 strains were analyzed, and 4 these strains showed high potential to produce alcohol-free or low alcohol beer. The perspective for this paper will be beyond in production of the beer in laboratorial scale, also the analyze of the beverage's quality, what will confirm the potential of this strains.

**PRATICAL APPLICATION:** This research can bring new perspectives to produce alcohol-free beer.

**KEYWORDS:** Screening, maltose, beverages, non-alcohol, low-alcohol.

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1:** Quadro representativo das placas de 96 wells. Legenda: negativo (-); intensidade de coloração muito baixo (+/-); intensidade de coloração médio (+); intensidade de coloração alto (++); crescimento muito alta (+++). Estão marcadas de verde os testes com resultado de interesse. Foram selecionadas as cepas que tiveram legenda negativo (-) e mais ou menos (+/-)..... 20

**Quadro 2:** Quadro representativo das placas de 96 wells para os testes envolvendo crescimento em maltose, sendo, respectivamente na seguinte ordem: teste em crescimento em meio YP-maltose 2%; YP-maltose 4%; e extrato de malte 8%. Legenda: negativo (-); crescimento médio (+); crescimento alto (++); crescimento muito alto (+++). Estão marcadas de verde os testes com resultado de interesse. Foram selecionadas aquelas que não apresentaram crescimento cujo apresenta coloração verde (-).....24

**Quadro 3:** Quadro representativo das placas de 96 wells do teste com PFP. Legenda: negativo (vermelho) (-); positivo (amarelo) (+). Foram selecionadas aquelas que apresentaram crescimento cujo apresenta coloração verde (+).**Erro! Indicador não definido.**7

**Quadro 4:** Quadro representativo das placas de 96 wells do teste com cerulenina. Legenda: negativo (vermelho) (-); positivo (amarelo) (+). Foram selecionadas aquelas que apresentaram crescimento cujo apresenta coloração verde (+)..... 268

**Quadro 6:** Quadro representativo das cepas selecionadas com potencial para produção cervejeira não alcoólica ou com baixo teor alcoólico. Os testes em ambos lados da tabela, da esquerda para a direita: H<sub>2</sub>S; extrato de malte 8%; maltose 2%;

maltose 4%; PFP; TFL; cerulenina. As cores representam: vermelho teste com resultado sem interesse; amarelo, resultado com uma certa relevância (foi proposto apenas para os testes envolvendo maltose); verde, resultado procurado.....31

**Quadro 7:** Quadro representativo das cepas selecionadas com potencial para produção cervejeira não alcoólica ou com baixo teor alcoólico. Cepas selecionadas: 75; 113; 125; 163.....32



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Figura representativa do teste de produção de H<sub>2</sub>S em Placa de Petri. O círculo apontado de verde por exemplo, representa uma cepa que não teve o crescimento interpretado com alto nível de produção (-). Já a cepa apontada de vermelho, uma cepa que foi visto como altamente produtora de H<sub>2</sub>S (+++). Foram selecionadas as cepas conforme o resultado em verde. Considera-se para as demais escalas apresentadas no quadro, crescimentos entre estes demonstrados. .... 20

**Figura 2:** Figura representativa do teste de crescimento em maltose 2%. As setas verdes representam resultados onde foi interpretado como não crescimento algum e foram esses os resultados mais esperados para os testes envolvendo crescimento em meio contendo maltose. Já os testes apontados com setas vermelhas representam cepas que foi visto um crescimento suficientemente alto característico da boa assimilação da maltose presente no meio. Considera-se para as demais escalas apresentadas no quadro, crescimentos entre estes demonstrados. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 3:** Figura representativa do teste de crescimento em maltose 4%. As setas verdes representam resultados onde foi interpretado como não crescimento algum e foram esses os resultados mais esperados para os testes envolvendo crescimento em meio contendo maltose. Já os testes apontados com setas vermelhas representam cepas que foi visto um crescimento suficientemente alto característico da boa assimilação da maltose presente no meio. Considera-se para as demais escalas apresentadas no quadro, crescimentos entre estes demonstrados. .... 23

**Figura 4:** Figura representativa do teste de resistência em meio contendo cerulenina. As setas verdes representam resultados onde foi interpretado como que houve o crescimento e foram resistentes ao antibiótico presente no meio, sendo estes os resultados mais esperados para tais testes. Já os testes apontados com setas vermelhas representam cepas que foi visto um não crescimento, logo a não resistência a substância presente ao meio..... 26

**Figura 5:** Figura representativa do teste de resistência em meio contendo TFL. As setas verdes representam resultados onde foi interpretado como que houve o crescimento e foram resistentes ao antibiótico presente no meio, sendo estes os resultados mais esperados para tais testes. Já os testes apontados com setas

vermelhas representam cepas que foi visto um não crescimento, logo a não  
resistência a substância presente ao meio..... 27

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1	<i>Objetivos específicos</i> .....	15
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>15</b>
3.1	<i>Meios de cultura</i> .....	15
3.2	<i>Cepas</i> .....	16
3.3	<i>Testes para seleção de leveduras</i> .....	17
	<b>Teste de produção de H<sub>2</sub>S</b> .....	17
	<b>Teste de crescimento em maltose 2 e 4% por volume de meio</b> .....	17
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>iv</b>

# 1 INTRODUÇÃO

As cervejas com baixo teor alcoólico tiveram diferentes motivos associadas à sua produção durante o século passado. Durante as guerras mundiais (1914-1918 e 1939-1945), houve escassez de matéria prima que resultou na produção de cervejas com alteração dos conteúdos em matéria prima (menos açúcares no meio), logo resultando em cervejas com baixo teor de extrato original, logo com baixo teor alcoólico (MEUSSDOERFFER, 2009). Atualmente há uma crescente demanda por cervejas com baixo teor de álcool e sem álcool entre diferentes populações que veem sobre diferentes aspectos, como saúde, dieta, segurança no local de trabalho ou no âmbito do tráfego rodoviário, além é claro, dos países onde o consumo de álcool é absolutamente proibido por lei (CALUWAERTS, 1995).

Embora ainda representem um segmento secundário do mercado cervejeiro, recentemente, houve um aumento no mercado em produção e procura por cervejas com baixo teor alcoólico (<1,2% vol) e sem álcool (<0,5% vol). Cervejas com teor reduzido de álcool têm diferentes variações da proporção desta substância, uma vez que há várias regulamentações existentes em diferentes países ao redor do mundo. No Reino Unido, por exemplo, as cervejas não alcoólicas não devem exceder 0,05% vol (BRANYIK et al., 2012). Nos demais países europeus em geral, a cerveja sem álcool é caracterizada por um teor alcoólico inferior a 0,5% vol, enquanto uma cerveja com teor reduzido de álcool tem seu valor inferior a 1,2% vol (PORRETTA et al., 2008). Em 2019, com a Instrução Normativa do MAPA nº 65/2019, que entrou em vigor em 11 de dezembro de 2019, definiu a cerveja como baixo teor alcoólico entre 0,5% e 2,0% de volume de álcool, enquanto que a cerveja sem álcool não deve exceder o valor de 0,5% de álcool (BRASIL 2019). Para a fabricação de cervejas sem álcool

existem duas estratégias: 1- Remoção física do álcool, por meio da retificação ou evaporação do álcool, diálise, osmose reversa, tecnologia de membranas, dentre outros processos, ressalta-se que estes métodos fazem necessário um maior investimento em equipamentos de alto custo; 2- Por meios biológicos, como alteração de alguma etapa do processo que promove a limitação da produção alcoólica e que, na maioria das vezes não necessita de equipamentos sofisticados, ou utilizando leveduras especiais. O incomum dessas leveduras não convencionais em comparação com as tradicionais leveduras de cerveja é principalmente sua tendência a produzir menores quantidades de etanol ou nenhum etanol. Isso pode ser alcançado por estratégias como a seleção de uma cepa de levedura com propriedades específicas ou até mesmo uma mutação genética intencional (BRANYIK et al., 2012).

Independentemente do processo de obtenção da cerveja sem álcool, o aroma e o sabor das cervejas sem álcool são geralmente bastante distintos das cervejas convencionais, o que é um problema para o consumidor. Em processos que buscam remover o álcool produzido comprometem-se as características finais da bebida em aspectos como cor, sabor e aroma, pois, por exemplo, no caso das cervejas produzidas por processos envolvendo membranas essas têm menor teor de grau brix o que caracteriza a cerveja com um menor “corpo” e um perfil aromático mais baixo promovido pela retenção de compostos provocada pela filtração. No caso remoção do álcool se por processos térmicos a bebida sofre danos pelo calor uma vez que a bebida é fervida para a evaporação do álcool. Já as cervejas sem álcool produzidas por alteração do processo fermentativo (métodos biológicos), têm frequentemente um gosto doce e desagradável característico de um off-flavor não pretendido caracterizado pela presença de açúcares no mosto que não foram consumidos (MORTANARI et al., 2009). Portanto, uma das características desejadas nas cepas

que foram submetidas ao *screening* é a produção de um metabólito aromático, constatado após a análise de resultados de testes similares aos realizados por: (ASHIDA et al., 1987), (ICHIKAWA et al., 1991) e (FUKUDA, WATANABE e ASANO, 1990; FUKUDA et al., 1991) que respectivamente, realizaram testes com as substâncias 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL), cerulenina e p-fluoro-DL-fenilalanina (PFP) cujo resultados mostraram relação entre a resistência e a produção de compostos de valor tanto para o sabor da cerveja quanto para o aroma. Além disso, o *screening* inclui o teste de avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), um subproduto da fermentação alcoólica que tem aroma de ovo podre cujo o crescimento em qualquer nível de produção prejudica totalmente o aroma da cerveja, conforme constatado por NETO e MENDES-FERREIRA (2005).

Segundo Muller (1993) o principal açúcar fermentável de todos os tipos de malte, é a maltose e existem algumas cepas do gênero *Saccharomyces* (por exemplo, usadas na fermentação do vinho) que são incapazes de fermentar este açúcar. Logo, a cerveja resultante da conversão por estas leveduras conterá menor teor alcoólico. Esse processo de fabricação de cerveja sem álcool é idêntico ao da fabricação de cerveja comum, exceto pela utilização de uma cepa de levedura não convencional.

Ao contrário dos outros métodos biológicos, a pesquisa para o uso de leveduras especiais ganhou impulso nos últimos anos. Mudar a cultura da levedura que será utilizada na fermentação, é uma das modificações menos complexas para as cervejarias implementarem, uma vez que não requer investimentos adicionais com equipamentos de cervejaria, o que o torna acessível para cervejarias de todos os tamanhos (BELLUT, K., ARENDT, E. K. 2019). Baseado nestes fatos, foram realizados neste trabalho testes físicoquímicos e biológicos que buscaram selecionar entre 182 cepas oriundas da fabricação de água-ardente de cana-de-açúcar,

popularmente conhecida como Cachaça, um produto típico do Brasil, tendo a sua denominação de origem legalizada junto ao Decreto nº. 4062 de 21/12/2001 (BR7ASIL, 2001), leveduras que não fermentassem maltose, que apresentassem ausência de produção de sulfeto de hidrogênio, resistência a cerulenina, TFL e PFP. As leveduras selecionadas a partir desta pesquisa abrem caminho para também, além da possibilidade da produção de uma cerveja não alcoólica ou com baixo teor alcoólico de qualidade superior a existentes no mercado atualmente, a possibilidade da descoberta de uma levedura que tenha um potencial relevante para indústria cervejeira, uma vez que algumas destas cepas são de origem selvagem e será uma levedura pioneira para a fabricação cervejeira não alcoólica no Brasil, além de possibilitar, caso se encontre, a utilização de uma cepa que mais uma vez, destaca a grande variedade da biodiversidade existente no Brasil com potencial tecnológico ainda a ser explorado.

Como verificado na literatura apresentada, acredita-se que com a utilização de uma levedura que seja incapaz de metabolizar maltose, somente será consumido outras fontes de carbonos que estão presentes no mosto em mínimas quantidades, o que resultará em pouca quantidade de substrato produzido pela levedura durante a fermentação e conseqüentemente uma cerveja de baixo teor alcoólico, ponto chave que buscamos neste estudo, já que leveduras oriundas da produção de cachaça tem como sua principal fonte de carbono a sacarose, açúcar que não é encontrado no mosto cervejeiro.

## **2 OBJETIVOS**

Realizar o screening de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça com potencial para produção de cerveja sem álcool ou com baixo teor alcoólico.

### **2.1 Objetivos específicos**

Realizar testes físico-químicos e biológicos para selecionar cepas de levedura, isoladas de dornas de fermentação de cachaça, que não fermentem maltose e nem extrato de malte, não produzam sulfeto de hidrogênio e tenha resistência às drogas cerulenina, 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL) e  $\rho$ -fluoro-DL-fenilalanina (PFP).

## **3 METODOLOGIA**

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto LBCM /NUPEB/UFOP. Todos os testes foram realizados em duplicata.

### **3.1 Meios de cultura**

#### **Meio YP**

O meio YP é composto por extrato de levedura 1% (p/v) e peptona 2% (p/v). Ao meio YP foi adicionado a fonte de carbono em diferentes concentrações, glicose 2% (p/v) (YPD), maltose 2 e 4% (YPmaltose). Para o meio sólido, foi acrescentado ágar 2% (p/v). Esse meio foi utilizado para isolamento e cultivo das leveduras.



### **Meio YNB**

Meio YNB sem aminoácidos e sulfato de amônia (0,67% v/v de base de nitrogênio de levedura (Difco Laboratórios, EUA), 1% de glicose v/v e 2% de ágar v/v) foi usado para a realização do teste de tolerância a 5,5,5-trifluoro-DL- leucina (TFL).

### **Meio Extrato de Malte**

O meio ágar de extrato de malte (Kasvi Laboratories), foi utilizado em solução para realizar o teste de crescimento. Ele foi produzido com 8% de extrato de malte por volume do meio, peptona bacteriológica 1%, glicose 2%.

### **Meio ágar de bismuto de sulfito**

O *meio ágar de bismuto de sulfito* é composto por peptona 0,19% (p/v), *extrato de carne* 0,095% (p/v), dextrose (glicose) 0,095% (p/v), *fosfato dissodico* 0,076% (p/v), *sulfato ferroso* 0,0057% (p/v), *indicador bismuto* indicador 0,15% (p/v), *verde brilhante* 0,00047% (p/v), ágar 0,38% (p/v) (DIFCO Laboratories). Esse meio foi utilizado para o teste de produção de H<sub>2</sub>S.

## **3.2 Cepas**

As cepas de leveduras que foram utilizadas neste trabalho integram a coleção de Leveduras do Laboratório de Biologia Celular e Molecular/NUPEB/UFOP e foram selecionadas de dornas de fermentação de cachaça. Ao total, integram a coleção 182 cepas. Todas as leveduras foram estocadas em meio YPD, acrescido de 30% de

glicerol, a -80 °C. As cepas foram transferidas para placas de 96 wells em meio rico (YPD), essas placas foram consideradas “placas mãe” para os todos os testes.

### **3.3 Testes para seleção de leveduras**

#### **Teste de produção de H<sub>2</sub>S**

As leveduras foram crescidas em YP acrescido de glicose 2% por volume de meio a 30 °C (placas mães), e foram replicadas da placa mãe com o auxílio do replicador de 96 pinos para uma placa de Petri contendo meio bismuth sulfite ágar onde foi inoculado pela inserção do replicador no meio. Após inoculação as placas foram incubadas a 30 °C por 72 h (NETO e MENDES-FERREIRA 2005).

#### **Teste de crescimento em maltose 2 e 4% por volume de meio**

As leveduras das placas mãe foram inoculadas em YPD a 30 °C e crescidas overnight, as placas mãe foram replicadas para placas de 96 *wells* contendo YPmaltose 2 e 4% por volume de meio. Foram selecionadas as leveduras que não crescerem em YP maltose ou com base na escala realizada, atingiram os níveis mais baixos de crescimento. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por um período de 48h.

#### **Teste de crescimento em meio contendo extrato de malte 8% por volume de meio**

As leveduras das placas mãe foram inoculadas em YPD a 30 °C e crescidas overnight, as placas mãe foram replicadas para placas de 96 *wells* contendo YP mais extrato de malte 8% v/v. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por um período de 48 h

e foram selecionadas as cepas que não crescerem ou apresentarem o mínimo nível de crescimento.

#### **Teste de resistência ao 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL)**

As leveduras das placas mãe foram inoculadas em YPD a 30 °C e crescidas overnight, as placas mãe foram replicadas para placas de 96 *wells* contendo meio YPD com 0,5 mM de 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL) Sigma®. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por um período de 72 h. As cepas que cresceram foram consideradas resistentes e de potencial produção de álcool isoamílico e de L-leucina (ASHIDA et al., 1987).

#### **Teste de resistência a Cerulenina**

As leveduras das placas mãe foram inoculadas em YPD a 30 °C e crescidas overnight, as placas mãe foram replicadas para placas de 96 *wells* contendo meio YPD com 25 µM de cerulenina (Sigma®) em cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por um período de 72 h. As cepas que cresceram foram consideradas resistentes e de potencial produção ácido capróico (ICHIKAWA et al., 1991).

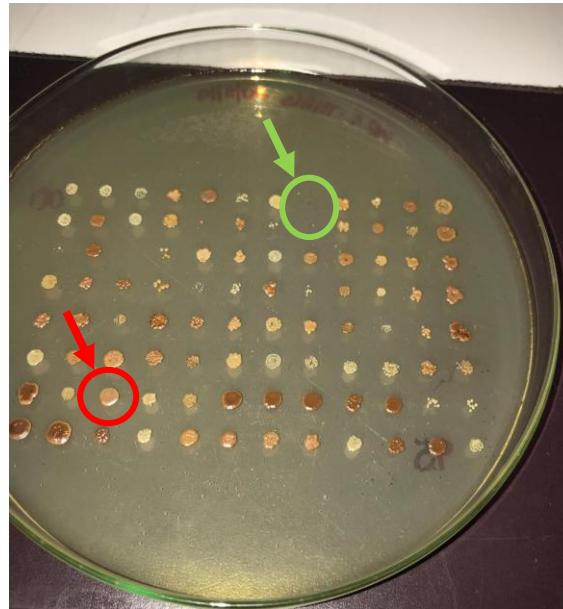
#### **Teste de resistência ao p-fluoro-DL-fenilalanina (PFP)**

As leveduras das placas mãe foram inoculadas em YPD a 30 °C e crescidas overnight, as placas mãe foram replicadas para placas de 96 *wells* contendo meio YNB acrescidas de glicose 2% v/v, ágar 2% v/v e p-fluoro-DL-fenilalanina (PFP) 1 mg/mL. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por um período de 72 h. As cepas que cresceram foram consideradas resistentes e de potencial produção de 2-feniletanol (FUKUDA, WATANABE e ASANO, 1990; FUKUDA et al., 1991).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A capacidade de produção de  $H_2S$  pelas leveduras foi avaliada e os resultados encontrados foram que das 182 cepas analisadas 18 não produziram  $H_2S$ , isso representa uma porcentagem de aproximadamente 9,90% das leveduras testadas, e mais de 90% das leveduras produziram  $H_2S$ . A classificação da capacidade de produção deste composto foi realizada através da análise da intensidade da coloração observada a olho nu, como mostra na figura 1, onde a foi proposto a seguinte escala para avaliação: não apresentou nenhuma coloração (-); apresentou baixa coloração (+/-); apresentou média coloração (+); apresentou coloração alta (++); apresentou coloração muito alta (+++). O quadro 1 mostra esquematizado os resultados obtidos após a análise realizada depois do período de incubação.

**Figura 1:** Figura representativa do teste de produção de H<sub>2</sub>S em Placa de Petri. O círculo apontado de verde por exemplo, representa uma cepa que não teve o crescimento interpretado com alto nível de produção (-). Já a cepa apontada de vermelho, uma cepa que foi visto como altamente produtora de H<sub>2</sub>S (+++). Foram selecionadas as cepas conforme o resultado em verde. Considera-se para as demais escalas apresentadas no quadro, crescimentos entre estes demonstrados.



**Quadro 1:** Quadro representativo das placas de 96 wells. Legenda: negativo (-); intensidade de coloração muito baixo (+/-); intensidade de coloração médio (+); intensidade de coloração alto (++) ; crescimento muito alta (+++). Estão marcadas de verde os testes com resultado de interesse. Foram selecionadas as cepas que tiveram legenda negativo (-) e mais ou menos (+/-).

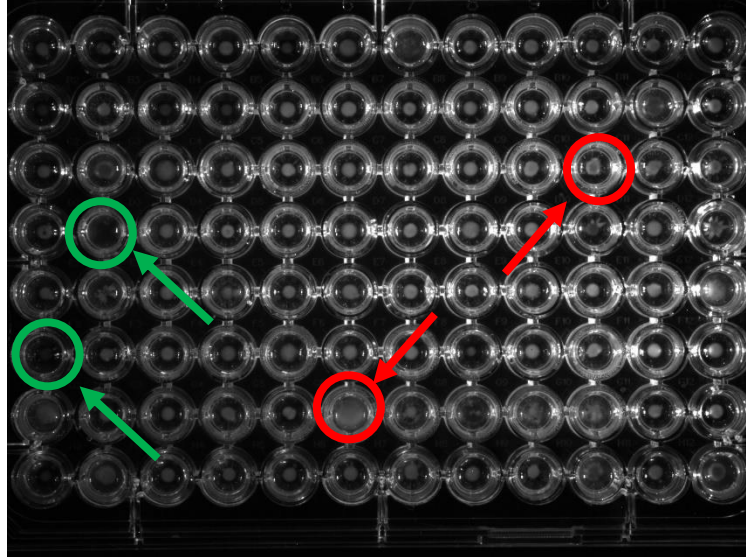
CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD
0	(+)	8	(+/-)	16	(-)	24	(++)	32	(+++)	40	(+/-)	48	(+)	56	(+)	64	(++)	72	(++)	80	(++)	88	(++)
1	(+/-)	9	(+++)	17	(-)	25	(++)	33	(+)	41	(+/-)	49	(+/-)	57	(+/-)	65	(+)	73	(++)	81	(+)	89	(+++)
2	(+)	10	(+++)	18	(-)	26	(+)	34	(+)	42	(++)	50	(-)	58	(++)	66	(++)	74	(++)	82	(+)	90	(+++)
3	(++)	11	(++)	19	(+)	27	(+)	35	(-)	43	(-)	51	(++)	59	(+)	67	(+++)	75	(-)	83	(++)	91	(+++)
4	(++)	12	(++)	20	(+)	28	(+)	36	(+)	44	(++)	52	(+)	60	(+)	68	(++)	76	(-)	84	(++)	92	(+++)
5	(+/-)	13	(++)	21	(+)	29	(+)	37	(++)	45	(+)	53	(+/-)	61	(+)	69	(+/-)	77	(-/+)	85	(++)	93	(++)
6	(+++)	14	(+)	22	(+)	30	(+/-)	38	(+)	46	(+++)	54	(+++)	62	(+++)	70	(+++)	78	(+++)	86	(+/-)	94	(-)
7	(+++)	15	(++)	23	(+++)	31	(+/-)	39	(++)	47	(++)	55	(++)	63	(++)	71	(+/-)	79	(+++)	87	(+++)	95	(+/-)
CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD	CEPA	PROD
96	(+++)	104	(++)	112	(+)	120	(++)	128	(++)	136	(+/-)	144	(+)	152	(+)	160	(++)	168	(-)	176	(+)		
97	(+)	105	(+++)	113	(-)	121	(+)	129	(+)	137	(+)	145	(++)	153	(++)	161	(++)	169	(+++)	177	(++)		
98	(++)	106	(++)	114	(-)	122	(++)	130	(++)	138	(++)	146	(+)	154	(+)	162	(++)	170	(++)	178	(+++)		
99	(+++)	107	(++)	115	(++)	123	(++)	131	(+++)	139	(++)	147	(-)	155	(++)	163	(-)	171	(++)	179	(+++)		
100	(+++)	108	(+++)	116	(++)	124	(++)	132	(++)	140	(+)	148	(++)	156	(+/-)	164	(+)	172	(++)	180	(+++)		
101	(-)	109	(+)	117	(++)	125	(-)	133	(++)	141	(+)	149	(+++)	157	(+)	165	(+)	173	(++)	181	(+++)		
102	(++)	110	(-)	118	(++)	126	(+/-)	134	(++)	142	(++)	150	(++)	158	(+)	166	(+)	174	(+++)				
103	(++)	111	(-)	119	(++)	127	(++)	135	(++)	143	(++)	151	(++)	159	(++)	167	(++)	175	(+++)				

A produção de H<sub>2</sub>S pelas leveduras não é de interesse para a produção de bebidas de uma forma geral. De acordo com Saerens e colaboradores (2010), durante a fermentação de cervejas, há produção de H<sub>2</sub>S mesmo que em baixos níveis, isso ocorre no processo de biossíntese do aminoácido metionina. Ainda que este seja um passo importante do metabolismo celular, pequenas quantidades de sulfeto de hidrogênio já afetam prejudicialmente o sabor das cervejas. Segundo Rankine, B. C. (1964), o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é um produto secundário da fermentação alcoólica que possui aroma de ovo podre. Estudos como o de Neto e Mendes-Ferreira (2005) relataram defeitos em vinhos, devido à presença de H<sub>2</sub>S, e relacionaram o problema com a estirpe utilizada durante a produção vinícola. Desta forma a produção de H<sub>2</sub>S em qualquer nível poderia descaracterizar o produto alvo, cerveja sem álcool ou com baixo teor alcoólico, sendo as leveduras não produtoras desse volátil as de interesse para o presente estudo.

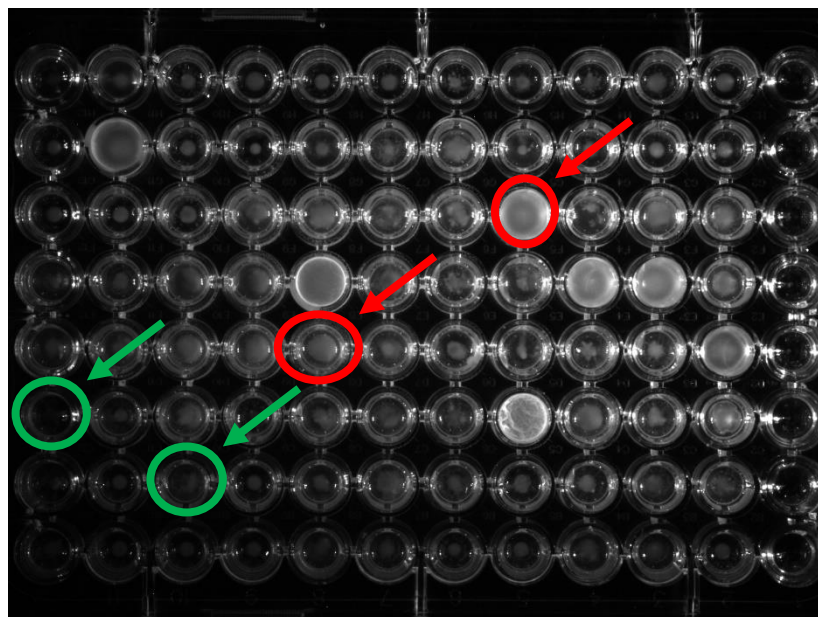
Quando as cepas avaliadas foram testadas quanto à capacidade de crescimento em meio contendo maltose 2%, das 182 analisadas foi verificado o não crescimento de 33 cepas, o que representa pouco mais que 18%. Após o período de incubação o crescimento foi avaliado pela turvação do meio, sendo que uma alta turvação significou alto crescimento. Desta forma, para todos os testes de crescimento foi atribuída uma escala: sem crescimento (-); crescimento médio (+); crescimento alto (++); crescimento muito alto (+++). A figura 2 representa uma foto do teste realizado para se mostrar a interpretação da análise dos resultados após a incubação das leveduras e o quadro 2 mostra o resultado detalhado. Como é possível verificar no quadro 2 as células pintadas de verde representam o resultado buscado nesse trabalho, cepas que não assimilam maltose em quantidades suficientes em seu metabolismo, logo, por exemplo, nesse teste, a cepa 75 obteve bom resultado.

Quando realizado o teste de crescimento em YP-maltose 4%, foi verificado o não crescimento de 28 cepas, o que representa aproximadamente 15% das cepas analisadas (quadro 2) e pode-se também ver conforme apontado na figura 3, uma foto da placa exemplificando a interpretação do crescimento das leveduras. Para o teste realizado em meio YP-extrato de malte 8%, meio laboratorial mais próximo ao mosto para fabricação de cerveja, foi verificado o não crescimento de 26 cepas, o que representa próximo de 14% das cepas testadas (quadro 2), para este último não foi feito registro fotográfico, mas para modo de entendimento como foi realizada a interpretação do teste ver as figuras 2 e 3.

**Figura 2:** Figura representativa do teste de crescimento em maltose 2%. As setas verdes representam resultados onde foi interpretado como não crescimento algum e foram esses os resultados mais esperados para os testes envolvendo crescimento em meio contendo maltose. Já os testes apontados com setas vermelhas representam cepas que foi visto um crescimento suficientemente alto característico da boa assimilação da maltose presente no meio. Considera-se para as demais escalas apresentadas no quadro, crescimentos entre estes demonstrados.



**Figura 3:** Figura representativa do teste de crescimento em maltose 4%. As setas verdes representam resultados onde foi interpretado como não crescimento algum e foram esses os resultados mais esperados para os testes envolvendo crescimento em meio contendo maltose. Já os testes apontados com setas vermelhas representam cepas que foi visto um crescimento suficientemente alto característico da boa assimilação da maltose presente no meio. Considera-se para as demais escalas apresentadas no quadro, crescimentos entre estes demonstrados.





**Quadro 2:** Quadro representativo das placas de 96 wells para os testes envolvendo crescimento em maltose, sendo, respectivamente na seguinte ordem: teste A, sendo em crescimento em meio YP-maltose 2%; teste B sendo em YP-maltose 4%; e teste C, sendo em extrato de malte 8%. Como assinalado no quadro Legenda: negativo (-); crescimento médio (+); crescimento alto (++); crescimento muito alto (+++). Estão marcadas de verde os testes com resultado de interesse. Foram selecionadas aquelas que não apresentaram crescimento cujo apresenta coloração verde (-).

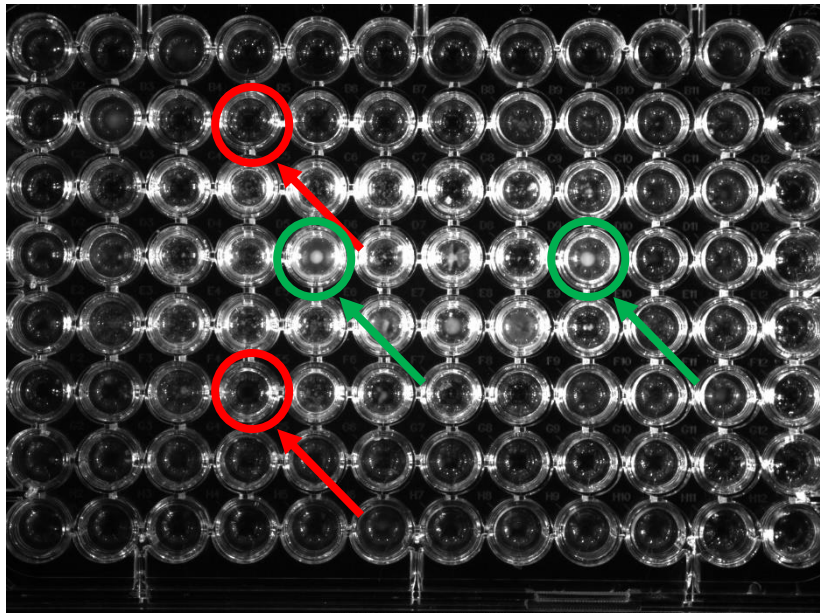
TESTE DE CRESCIMENTO EM MEIO CONTENDO YP-2% MALTOSE																							
CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC
0	+	8	++	16	++	24	+	32	+	40	+	48	+++	56	+	64	+	72	+	80	+	88	+
1	+	9	++	17	+	25	+	33	+	41	+	49	+	57	++	65	+	73	+	81	+	89	+
2	+	10	-	18	++	26	++	34	+++	42	++	50	+	58	+	66	+	74	-	82	+	90	-
3	+	11	-	19	+	27	+	35	+	43	++	51	+	59	++	67	+	75	-	83	++	91	-
4	+	12	-	20	+	28	+	36	++	44	+++	52	+	60	-	68	+	76	+	84	++	92	-
5	+	13	-	21	++	29	++	37	++	45	+++	53	+	61	-	69	+	77	++	85	++	93	++
6	+	14	++	22	+	30	++	38	+	46	+	54	+	62	-	70	+	78	+	86	+	94	+
7	+	15	+++	23	+	31	++	39	+	47	+	55	++	63	+	71	++	79	+	87	+	95	+
TESTE DE CRESCIMENTO EM MEIO CONTENDO YP-4% MALTOSE																							
96	-	104	-	112	+	120	+	128	+	136	+	144	++	152	++	160	+	168	++	176	++		
97	++	105	+	113	-	121	+	129	+	137	+	145	++	153	+	161	+	169	++	177	++		
98	+	106	+	114	+	122	-	130	+	138	+	146	-	154	-	162	-	170	++	178	++		
99	+	107	+	115	-	123	-	131	-	139	+	147	++	155	-	163	+	171	++	179	++		
100	+	108	-	116	+	124	+	132	+	140	-	148	++	156	-	164	+	172	++	180	-		
101	+	109	-	117	-	125	-	133	+	141	+	149	+	157	+	165	+	173	++	181	++		
102	-	110	+	118	-	126	+	134	+	142	+	150	+	158	+	166	+	174	++				
103	+	111	+	119	-	127	+	135	++	143	+	151	+	159	+	167	+	175	++				
TESTE DE CRESCIMENTO EM MEIO CONTENDO YP-4% MALTOSE																							
0	+	8	+	16	+	24	++	32	+	40	++	48	+++	56	+	64	+	72	+	80	+	88	+
1	+	9	++	17	-	25	++	33	++	41	++	49	++	57	+	65	+	73	+	81	-	89	+
2	+	10	+	18	++	26	++	34	+++	42	++	50	-	58	+	66	+	74	-	82	-	90	-
3	+	11	-	19	++	27	++	35	++	43	++	51	+	59	+	67	+	75	-	83	++	91	-
4	+	12	++	20	++	28	++	36	++	44	+++	52	+	60	-	68	+	76	+	84	++	92	+
5	+	13	-	21	+++	29	+++	37	++	45	+++	53	+	61	-	69	+	77	+++	85	+	93	+
6	+	14	++	22	+	30	+++	38	-	46	+	54	+	62	-	70	+	78	++	86	+	94	+
7	+	15	+++	23	+	31	+++	39	+	47	+	55	++	63	+	71	+++	79	-	87	+	95	+
TESTE DE CRESCIMENTO EM MEIO CONTENDO YP-EXTRATO DE MALTE 8%																							
96	-	104	-	112	+	120	+	128	+	136	+	144	+++	152	+	160	+	168	+	176	+		
97	+	105	+	113	+	121	+	129	+	137	+	145	+++	153	-	161	+	169	+	177	+		
98	+	106	+	114	+	122	-	130	+	138	+	146	++	154	-	162	+	170	+	178	+		
99	+	107	+	115	-	123	-	131	+	139	+	147	+++	155	-	163	+	171	+	179	+		
100	+	108	+	116	+	124	+	132	++	140	-	148	+++	156	-	164	+	172	+	180	-		
101	-	109	+	117	+	125	-	133	+	141	+	149	+	157	+	165	++	173	+	181	+		
102	+	110	+	118	+	126	+	134	++	142	+	150	+	158	+	166	++	174	+				
103	+	111	+	119	+	127	+	135	+++	143	+	151	++	159	+	167	++	175	+				
TESTE DE CRESCIMENTO EM MEIO CONTENDO YP-EXTRATO DE MALTE 8%																							
0	++	8	+	16	+	24	+	32	+	40	++	48	+++	56	++	64	+	72	+	80	+	88	+
1	+	9	+	17	++	25	++	33	++	41	+	49	+	57	+	65	+	73	+	81	+	89	++
2	+	10	-	18	+++	26	+++	34	+	42	+++	50	+	58	++	66	+	74	-	82	-	90	-
3	+	11	-	19	++	27	+++	35	+	43	+++	51	+	59	++	67	+	75	-	83	++	91	-
4	+	12	+	20	++	28	+	36	++	44	+++	52	+	60	+	68	+	76	+	84	++	92	+
5	+	13	-	21	+++	29	++	37	++	45	+++	53	+	61	+	69	+	77	-	85	+	93	+
6	+	14	+	22	+	30	+	38	+	46	+	54	+	62	+	70	+	78	+	86	+	94	+
7	+	15	+	23	++	31	+	39	+	47	+	55	++	63	++	71	+	79	+	87	+	95	-
TESTE DE CRESCIMENTO EM MEIO CONTENDO YP-EXTRATO DE MALTE 8%																							
96	+	104	+	112	+	120	+++	128	++	136	++	144	+	152	+	160	+	168	++	176	+		
97	+	105	-	113	-	121	++	129	++	137	++	145	+	153	-	161	-	169	+++	177	++		
98	+	106	+	114	+	122	+	130	+	138	+	146	+	154	+	162	+	170	+++	178	-		
99	+	107	+	115	+	123	+	131	-	139	++	147	+	155	-	163	+	171	+++	179	-		
100	+	108	-	116	+	124	+	132	-	140	+	148	+	156	+	164	+	172	+++	180	-		
101	++	109	-	117	-	125	+	133	++	141	++	149	+	157	-	165	++	173	++	181	-		
102	++	110	+	118	-	126	++	134	++	142	++	150	+	158	-	166	++	174	+				
103	+	111	++	119	+	127	+	135	+	143	++	151	+	159	+	167	++	175	-				

Testes relacionados com a capacidade de assimilação da maltose, principal açúcar do mosto cervejeiro (50 a 60%), está relacionado com a possível capacidade de baixa produção ou a não produção de álcool (Alves et al., 2008), o que é desejável para a produção de cerveja com baixo teor alcoólico ou sem álcool. Em trabalho realizado por Bellut et. al., (2018), foram utilizadas cepas de leveduras isoladas de kombucha com a intenção de analisar a metabolização da maltose para a produção de cerveja sem álcool ou com baixo teor alcoólico. Assim como em Bellut et. al., (2019), foram realizados testes com cepas de *Cyberlindnera jadinii*, leveduras utilizadas para produção de queijos, para verificar a assimilação da maltose em seu metabolismo. Na revisão realizada por Bellut, K., Arendt, E. K. (2019), é citado também uma série de estudos realizados com cepas de não-*Saccharomyces* onde também foram encontrados resultados muito promissores para a produção de cervejas com baixo teor alcoólico ou sem álcool, algumas destas cepas são: *Candida shehatae*, *Candida zemplinina*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia kudriavzevii*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Zygosaccharomyces rouxii* entre outras. A partir destas informações tem-se a expectativa de que as cepas selecionadas a partir deste *screening* serão leveduras que produzirão quantidade mínimas de álcool durante a fermentação alcoólica, fato que se provará em estudos fermentativos posteriormente em outros trabalhos.

Os testes de resistência às drogas (TFL, cerulenina e PFP) estão relacionados à potencial capacidade de produção de aromas pelas leveduras. Após a incubação das leveduras em meio contendo cerulenina, conforme apontado na figura 4, uma foto da placa exemplificando a interpretação do crescimento das leveduras. Foi verificado a resistência de um total de 75 cepas (41%) (quadro 3). Já para o teste de resistência das leveduras em meio contendo 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL), foi verificado a resistência de 165 cepas (91%). Para resistência às drogas, foi considerado

crescimento negativo (-) ou positivo (+) conforme apontado na figura 5, uma foto da placa exemplificando a interpretação do crescimento das leveduras. Já o resultado detalhado do teste de resistência ao TFL pode ser verificado no quadro 4. Quando realizado o teste de resistência ao  $p$ -fluoro-DL-fenilalanina (PFP), um total de 113 cepas (62%) apresentaram resistência (quadro 5). Não foi realizado registro da placa de Petri onde foi realizada o teste com PFP, entretanto, para entendimento da interpretação similar ao da figura 1. Os testes realizados com as respectivas drogas foram feitos com o intuito da caracterização das cepas quanto a possibilidade de produção de alguma substância aromática (Araújo et. al., 2008), o que pode aumentar a qualidade sensorial produzida por cepas resistente à tais drogas.

**Figura 4:** Figura representativa do teste de resistência em meio contendo cerulenina. As setas verdes representam resultados onde foi interpretado como que houve o crescimento e foram resistentes ao antibiótico presente no meio, sendo estes os resultados mais esperados para tais testes. Já os testes apontados com setas vermelhas representam cepas que foi visto um não crescimento, logo a não resistência a substância presente ao meio.



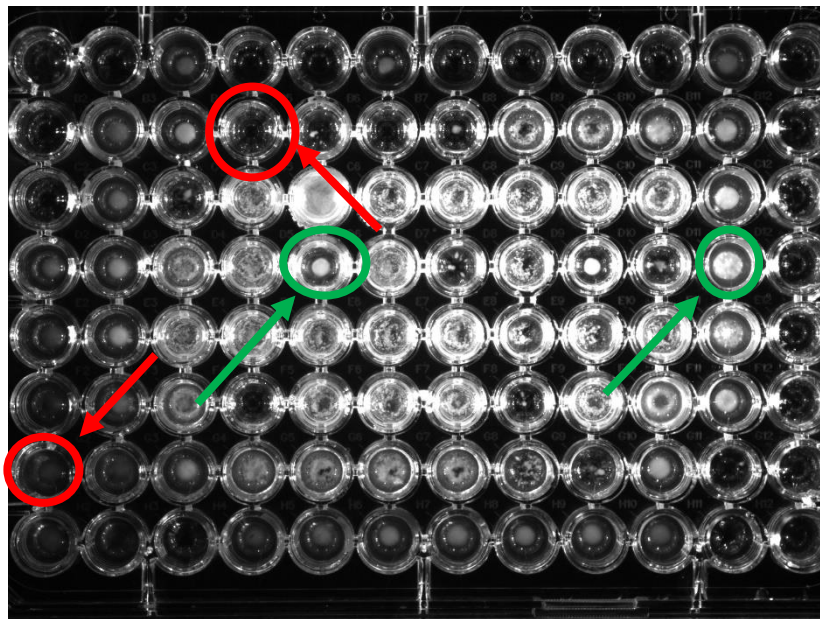
**Quadro 3:** Quadro representativo das placas de 96 wells do teste com cerulenina. Legenda: negativo (cinza) (-); positivo (verde) (+). Foram selecionadas aquelas que apresentaram crescimento cujo apresenta coloração verde (+).

CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC
0	-	8	-	16	-	24	-	32	-	40	-	48	-	56	-	64	-	72	-	80	-	88	-		
1	-	9	-	17	-	25	-	33	-	41	-	49	-	57	-	65	+	73	-	81	-	89	-		
2	-	10	-	18	-	26	-	34	-	42	-	50	-	58	-	66	-	74	+	82	-	90	-		
3	-	11	-	19	-	27	-	35	-	43	-	51	-	59	-	67	-	75	-	83	-	91	-		
4	-	12	-	20	-	28	-	36	-	44	+	52	-	60	-	68	-	76	-	84	-	92	-		
5	+	13	-	21	-	29	-	37	-	45	+	53	-	61	-	69	-	77	-	85	-	93	-		
6	+	14	+	22	-	30	-	38	-	46	-	54	-	62	-	70	-	78	-	86	-	94	-		
7	+	15	+	23	-	31	-	39	-	47	-	55	-	63	-	71	-	79	-	87	-	95	-		

CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC
96	+	104	+	112	+	120	+	128	-	136	-	144	+	152	+	160	-	168	+	176	+				
97	-	105	+	113	+	121	+	129	+	137	-	145	+	153	+	161	+	169	+	177	+				
98	+	106	+	114	+	122	+	130	+	138	+	146	-	154	+	162	-	170	+	178	+				
99	+	107	-	115	+	123	+	131	+	139	+	147	+	155	-	163	+	171	+	179	-				
100	+	108	-	116	+	124	-	132	-	140	+	148	+	156	+	164	+	172	+	180	+				
101	+	109	+	117	+	125	+	133	+	141	+	149	+	157	+	165	-	173	+	181	-				
102	+	110	+	118	+	126	+	134	+	142	+	150	-	158	-	166	-	174	+						
103	+	111	+	119	+	127	+	135	+	143	+	151	+	159	+	167	+	175	-						

**Figura 5:** Figura representativa do teste de resistência em meio contendo TFL. As setas verdes representam resultados onde foi interpretado como que houve o crescimento e foram resistentes ao antibiótico presente no meio, sendo estes os resultados mais esperados para tais testes. Já os testes apontados com setas vermelhas representam cepas que foi visto um não crescimento, logo a não resistência a substância presente ao meio.



**Quadro 4:** Quadro representativo das placas de 96 wells do teste com TFL. Legenda: negativo (cinza) (-); positivo (verde) (+). Foram selecionadas aquelas que apresentaram crescimento cujo apresenta coloração verde (+).

CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC
0	+	8	+	16	+	24	+	32	+	40	+	48	+	56	+	64	+	72	+	80	+	88	+
1	+	9	+	17	+	25	+	33	+	41	+	49	+	57	+	65	+	73	+	81	+	89	+
2	+	10	-	18	+	26	+	34	+	42	+	50	+	58	+	66	+	74	+	82	+	90	+
3	-	11	+	19	+	27	+	35	-	43	+	51	+	59	+	67	+	75	+	83	+	91	+
4	+	12	+	20	+	28	+	36	+	44	+	52	+	60	+	68	+	76	+	84	+	92	+
5	+	13	-	21	+	29	+	37	+	45	+	53	+	61	+	69	+	77	+	85	+	93	+
6	+	14	+	22	+	30	+	38	+	46	+	54	+	62	+	70	+	78	+	86	+	94	+
7	+	15	+	23	+	31	+	39	+	47	+	55	+	63	+	71	+	79	+	87	+	95	+

CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC
96	+	104	+	112	+	120	+	128	+	136	+	144	+	152	+	160	+	168	+	176	+		
97	+	105	+	113	-	121	-	129	+	137	+	145	+	153	+	161	-	169	+	177	+		
98	+	106	+	114	+	122	+	130	-	138	+	146	+	154	+	162	+	170	+	178	+		
99	+	107	+	115	+	123	+	131	-	139	+	147	+	155	-	163	+	171	+	179	+		
100	+	108	-	116	+	124	+	132	-	140	+	148	+	156	+	164	+	172	+	180	+		
101	+	109	-	117	+	125	+	133	+	141	+	149	+	157	+	165	-	173	+	181	+		
102	+	110	+	118	+	126	+	134	+	142	+	150	+	158	-	166	-	174	+				
103	+	111	+	119	+	127	+	135	+	143	+	151	+	159	+	167	+	175	+				

**Quadro 5:** Quadro representativo das placas de 96 wells do teste com PFP. Legenda: negativo (cinza) (-); positivo (verde) (+). Foram selecionadas aquelas que apresentaram crescimento cujo apresenta coloração verde (+).

CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC
0	+	8	-	16	-	24	-	32	+	40	+	48	-	56	+	64	-	72	+	80	+	88	-
1	+	9	+	17	-	25	-	33	+	41	-	49	-	57	+	65	+	73	-	81	+	89	+
2	+	10	+	18	-	26	-	34	-	42	+	50	-	58	+	66	-	74	+	82	+	90	-
3	-	11	-	19	-	27	-	35	+	43	+	51	-	59	+	67	-	75	+	83	+	91	-
4	-	12	-	20	-	28	-	36	+	44	+	52	+	60	-	68	-	76	+	84	+	92	+
5	-	13	-	21	+	29	+	37	+	45	+	53	+	61	-	69	+	77	-	85	+	93	+
6	+	14	-	22	-	30	+	38	+	46	+	54	+	62	+	70	+	78	+	86	-	94	+
7	-	15	+	23	-	31	+	39	+	47	+	55	+	63	-	71	-	79	+	87	+	95	-

CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC	CEPA	CRESC
96	+	104	-	112	-	120	-	128	-	136	-	144	-	152	-	160	-	168	-	176	+		
97	-	105	+	113	+	121	-	129	-	137	-	145	-	153	+	161	+	169	+	177	+		
98	-	106	-	114	-	122	+	130	+	138	+	146	+	154	+	162	+	170	+	178	+		
99	+	107	+	115	+	123	+	131	+	139	+	147	-	155	+	163	+	171	-	179	+		
100	+	108	+	116	+	124	+	132	+	140	+	148	+	156	-	164	+	172	+	180	+		
101	-	109	+	117	+	125	-	133	+	141	+	149	+	157	-	165	+	173	+	181	+		
102	+	110	+	118	+	126	+	134	+	142	+	150	+	158	-	166	-	174	+				
103	+	111	-	119	-	127	-	135	+	143	+	151	+	159	+	167	+	175	+				

Estudo realizado por Yoshizawa (1999), mostrou que cepas selvagens em presença de TFL promovem a incorporação do análogo de leucina nas proteínas e estas proteínas não funcionam normalmente, inibindo a síntese de L-leucina, portanto a célula não sobrevive quando exposta a este composto. Por sua vez, mutantes resistentes a TFL, não apresentam a inibição de L-leucina e desta forma, a célula não somente sobrevive como produz grandes quantidades de álcool isoamílico e de L-leucina, compostos de interesse para a cerveja final, já que são também relacionados a qualidade do sabor de outras bebidas que envolvem a fermentação alcoólica, como o saquê. Outro estudo realizado por Ichikawa et al. (1991) em busca pelo desenvolvimento de leveduras que produzissem elevados teores de álcoois

superiores e ésteres, isolou cepas de leveduras resistentes a cerulenina, o que foi relacionado com uma maior capacidade de produção de ácido capróico e de caproato de etila no processo de produção do saquê e propuseram que o ácido capróico tem relação direta com a síntese de ácidos graxos. A síntese de ácidos graxos na levedura é catalisada por uma enzima multifuncional, a ácido graxo sintetase. Sendo que a cerulenina é um inibidor específico desta enzima. E em Fukuda et al., 1990, também tratando sobre as correlações existentes entre a resistência a drogas com a produção de compostos voláteis por *S. cerevisiae*, mostrou dados que demonstram maior capacidade de produção de 2-feniletanol por leveduras resistentes ao p-fluoro-DL-fenilalanina (PFP). Portanto, espera-se que as leveduras listadas por sua resistência às respectivas drogas possam produzir não só uma, como várias substâncias aromáticas de interesse, já que algumas cepas foram resistentes a mais de uma das substâncias testadas, como por exemplo a cepa 75, que se acredita ter a produção de algum sabor característico do saquê e aromas rosados, uma vez que foi resistente respectivamente a TLF e PFP.

Após a realização de todos dos testes, os resultados dos mesmos foram compilados no quadro 6, de onde se pode concluir que algumas cepas acumularam características desejáveis para a produção de cerveja sem álcool ou com baixo teor alcoólico: baixa produção de H<sub>2</sub>S, baixo crescimento em meios contendo maltose e resistência às drogas TFL, cerulenina e PFP. Dentre as 182 cepas analisadas, 4 cepas se destacaram, sendo elas a cepa 75, a 113, a 125 e a 163 (quadro 7). Ao início do experimento era difícil mensurar quantas cepas seriam consideradas destaques a ponto de serem selecionadas para futuros testes em escala laboratorial, uma vez que muito diversa a lista de cepas utilizadas neste estudo, contudo, é consenso que foi um bom resultado uma vez que representam um grande potencial para com o futuro do

trabalho. Entre elas a cepa 75 foi a que apresentou o maior potencial, já que não produziu H<sub>2</sub>S, teve crescimento negativo em todos os testes envolvendo maltose e somente apresentou um resultado negativo no teste com cerulenina, porém, em contrapartida, teste positivo a resistência à PFP e TFL. A cepa 113 obteve bons resultados no teste envolvendo extrato de malte 8% e maltose 2%, já com o teste envolvendo a maltose 4% apresentou um crescimento mínimo, além da não produção de H<sub>2</sub>S e resistência a PFP e a cerulenina. Já a cepa 125 teve um resultado parecido com a cepa 113, pois não produziu H<sub>2</sub>S e nos testes envolvendo maltose não cresceu nem com 2 e 4% da substância, entretanto, apresentou crescimento mínimo para o teste com o extrato de malte 8%, além de resultados positivos com TFL e cerulenina. E por fim, a cepa 163 obteve crescimento mínimo nos testes envolvendo maltose 2 e 4% e também com o extrato de malte 8%, entretanto ótimos resultados envolvendo cerulenina, TFL e PFP. Estes resultados apontam 4 cepas potenciais para a produção cervejeira não alcoólica ou com baixo teor alcoólico.





**Quadro 7:** Quadro representativo das cepas selecionadas com potencial para produção cervejeira não alcoólica ou com baixo teor alcoólico. Cepas selecionadas: 75; 113; 125; 163

CEPAS SELECIONADAS							
CEPA	H <sub>2</sub> S	EXT MALTE 8%	MALTOSE 2%	MALTOSE 4%	PFP	TFL	CERULENINA
75	-	-	-	-	+	+	-
113	-	-	-	+	+	-	+
125	-	+	-	-	-	+	+
163	-	+	+	+	+	+	+

## 5 CONCLUSÕES

Cepas isoladas de dornas de fermentação de cachaça (182) foram testadas quanto ao potencial para produção de cerveja sem álcool ou com baixo teor alcoólico. Testes com características fenotípicas desejáveis foram realizados: baixa produção de H<sub>2</sub>S, baixo crescimento em meios contendo maltose e potencial para produção de compostos aromáticos. Das 182 cepas analisadas, 4 apresentaram-se com alto potencial para a produção de cerveja sem álcool ou com baixo teor alcoólico. São elas as cepas 75, a 113, a 125 e a 163. Entre estas, a cepa 75 foi a que apresentou o maior potencial, já que não produziu H<sub>2</sub>S, teve crescimento negativo em todos os testes envolvendo maltose e somente apresentou um resultado negativo no teste com cerulenina, porém, em contrapartida, teste positivo a resistência à PFP e TFL. Espera-se que com a utilização destas leveduras, em especial a cepa 75, seja possível a produção de uma cerveja com tais características, contudo, essa hipótese será confirmada a partir de protótipos em escala laboratorial em estudos posteriores.

## 6 REFERÊNCIAS

ALVES, S. L. et al. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the AGT1 permease. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1494-1501, 2008.

ARAÚJO, T. M. **Análises genômicas para otimização da produção de compostos aromatizantes por estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* isolada de produção de cachaça. (Tese de Doutorado)** - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

ASHIDA, S., E. ICHIKAWA, K. SUGINAMI, and S. IMAYASU. 1987. Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component. **Agric. Biol. Chem.** 51:2061–2065.

BRANYIK, T., SILVA, D.P., BASCZYNSKI, M., LENHNERT, R., SILVA, J., 2012. A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. **Journal of Food Engineering** 108, 493-506.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Decreto no 4062, de 21/12/2001; **Diário Oficial da União 26/12/2001**, seção 1, p. 4.

BELLUT, K., MICHAEL, M., ZARNKOW, M., HUTZLER, M., JACOB, F., ATZLER, J. J., ... ARENDT, E. (2018). **Application of Non-Saccharomyces Yeasts Isolated from Kombucha in the Production of Alcohol-Free Beer. Fermentation**, 4(3), 66.

BELLUT, K., ARENDT, E. K. (2019). Chance and Challenge: Non-Saccharomyces Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing – A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 1–15.

BELLUT, K., MICHAEL, M., ZARNKOW, M., HUTZLER, M., JACOB, F., ATZLER, J. J., ... ARENDT, E. K. (2019). **Screening and Application of Cyberlindnera Yeasts to Produce a Fruity, Non-Alcoholic Beer. *Fermentation*, 5(4), 103.**

CALUWAERTS, H.J.J. Process for the manufacture of an alcohol-free beer having the organoleptic properties of a lager type pale beer. **U.S. Patent 5,384,135**, 1995.

DIFCO Laboratories & BBL. **Manual**, 2nd Edition

FUKUDA, K. et al. Breeding of brewing yeast producing a large amount of  $\beta$ phenylethyl alcohol and  $\beta$ -phenylethyl acetate. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 269-271, 1990.

FUKUDA, K.; WATANABE, M.; ASANO, K. Altered regulation of aromatic amino acid biosynthesis in  $\beta$ -phenylethyl-alcohol-overproducing mutants of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 3151-3156, 1990.

FUKUDA, K. et al. Isolation and genetic study of p-fluoro-dl-phenylalanineresistant mutants overproducing  $\beta$ -phenethyl-alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 20, n. 6, p. 449-452, 1991.

KUNZE, W., 2004. **Technology Brewing and Malting**, Int ed. VLB Berlin 3<sup>a</sup> edition, Berlin, pp. 214 – 255.

ICHIKAWA, E. et al. Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 2153-2154, 1990.

ICHIKAWA, E., N. HOSOKAWA, Y. HATA, Y. ABE, K. SUGINAMI, and S. IMAYASU. 1991. Breeding of sake yeast with improved ethyl caproate productivity. **Agric. Biol. Chem.**

MEUSSDOERFFER, F.G., 2009. A comprehensive history of beer brewing. In: Esslinger, H.M. (Ed.), **Handbook of Brewing**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, pp. 1–42.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (Brasília). **Instrução Normativa Nº 65, de 10 de dezembro de 2019**. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. [S. l.], 11 dez. 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>. Acesso em: 29 abr. 2020.

MONTANARI, L., MARCONI, O., Mayer, H., FANTOZZI, P., 2009. Production of alcohol-free beer. In: **Preedy, V.R. (Ed.), Beer in Health and Disease Prevention**. Elsevier Inc., Burlington, MA, pp. 61–75.

MULLER, R., 1993. Flavour in low-alcohol beers. **Chemistry Review** 3 (1), 2–7.

NETO L., MENDES-FERREIRA A., (2005) Pesquisa de atividade Sulfito Redutase em Leveduras de origem enológica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos Campinas**. 25:275–278.

SAERENS, S.M.G.; DUONG, C.T.; NEVOIGT, E. (2010). Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 86:1195–1212.

S. PORRETTA., G. DONADINI., 2008. A Preference Study for No Alcohol Beer in Italy Using Quantitative Concept Analysis. **The Institute of Brewing & Distilling., J. Inst. Brew.** Vol. 114 Nº4, 315–321.

RANKINE, B.C. Hydrogen sulphide production by yeast. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.15, p.872-877, 1964.

YOSHIZAWA, K. (1999). Sake: Production and Flavor. **Food. Rev. Int** **15(1)**, 83-107.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Ouro Preto pelo Ensino de gratuito de qualidade. A todos os seus funcionários, especialmente os do Departamento de Alimentos e da Escola de Nutrição que estiveram presentes no meu dia-a-dia e contribuíram de alguma forma nos meus estudos.

Gostaria de agradecer aos meus familiares pelo incentivo e apoio financeiro, além de toda dedicação que possibilitaram os meus estudos.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Aureliano Claret da Cunha, e aos Colaboradores, Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão, Profa. Dra Izinara Rosse da Cruz, Dra. Débora Faria Silva e aos demais funcionários e amigos do NUPEB/LBCM por todo apoio e orientação que possibilitaram a realização deste trabalho e também pelo aprendizado adquirido.

A minha amiga Thaís Evangelista que também contribui com grande dedicação ao trabalho.

Gostaria também de agradecer a Gloriosa República Pronto Socorro e seus moradores e ex-alunos por todos os conselhos, direcionamentos e amizades que contribuíram com a minha estadia na cidade e tornaram este período da minha vida mais agradável.

Por fim a minha companheira Daniela Ebner pelo apoio e correções ortográficas que foram fundamentais.

## DECLARAÇÃO DE AUTORIA E RESPONSABILIDADE

Eu, Pedro Henrique Carvalho Silva Gomes, Silva Gomes P. H. C. declaro, para fins de submissão à Revista Food Science Technology, que o artigo Potencial uso de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça para a produção de cerveja sem álcool, é original, inédito e não foi submetido a outro periódico, bem como expresse anuência acerca da submissão e da política editorial, diretrizes para publicação e declaração de direito autoral, que se aplicará em caso de publicação do trabalho supracitado. Declaro, também, na qualidade de autor do manuscrito "Potencial uso de leveduras isoladas de dornas de fermentação de cachaça para a produção de cerveja sem álcool", que participei da construção e formatação deste estudo, e assumo a responsabilidade pública pelo conteúdo deste. O trabalho conta com a contribuição do Prof. Dr. Aureliano Claret da Cunha, Cunha A. C. [aureliano.cunha@ufop.edu.br](mailto:aureliano.cunha@ufop.edu.br); Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão, Brandão R. L. [rbrand@ufop.edu.br](mailto:rbrand@ufop.edu.br); Profa. Dra. Izinara Rosse da Cruz, Rosse, I. [izinara.cruz@ufop.edu.br](mailto:izinara.cruz@ufop.edu.br); Dra. Débora Faria Silva, Silva D. F. [debora.faria@ufop.edu.br](mailto:debora.faria@ufop.edu.br), onde os mesmos contribuíram com a realizações dos testes, análises e intepretações dos resultados, com a redação do texto, entre outros pontos fundamentais para realização e apresentação do trabalho.

---

Praça Juvenal Santos, nº 21, Bairro Pilar, CEP: 35400-000; Telefone: +553198931-7182; e-mail: [pcarv4@outlook.com](mailto:pcarv4@outlook.com).

Laboratório de Biologia Celular e Molecular - LBCM/ Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP. Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

## **RELEVÂNCIA DO TRABALHO**

Este trabalho tem como relevância a possibilidade de fornecer a todas as cervejarias, principalmente as de pequeno porte, uma alternativa de baixo custo para a produção de cervejas sem álcool de qualidade superior às existentes no mercado atualmente, através da utilização de cepas incapazes de metabolizar maltose e maltotriose.

## **POTENTIAL USE OF YEASTS ISOLATED FROM CACHAÇA FERMENTATION VATS FOR THE PRODUCTION OF ALCOHOL-FREE BEER**

### **CACHAÇA'S YEASTS FOR PRODUCTION ALCOHOL-FREE BEER**