

Caracterização fisiológica de leveduras selvagens isoladas de cerveja quanto ao crescimento à temperatura, presença de glicose e etanol.

Guilherme A. N. Souza¹ (IC), Karina F. D. N. Santos¹ (PG), Plínio Lazaro Faleiros (PQ); Claudia C. G. Martin-Didonet¹ (PQ)

e-mail: gui12alves@gmail.com

¹ Câmpus De Ciências Exatas E Tecnológicas – CCET, BR 153 n3105 - Fazenda Barreiro do Meio, Anápolis - GO, CEP 75132-903.

Resumo

A indústria cervejeira possui destaque na economia nacional, e tem como um dos insumos mais importantes as leveduras, que fornecem aromas e sabores característicos as cervejas. Desta forma este trabalho se propõe a isolar leveduras selvagens nativas do Cerrado e determinar a capacidade de crescimento em glicose e a tolerância natural a diferentes concentrações de etanol dos isolados obtidos. Pelo isolamento foram selecionadas 70 leveduras, sendo 34 leveduras isoladas do mosto estilo Pilsen e 36 isolados do estilo Bock. Após a purificação, as cepas foram analisadas quanto ao crescimento utilizando glicose como fonte de carbono, e quantificadas em espectrofotômetro (D.O._{600nm}), todos isolados apresentaram crescimentos nessa fonte. Na análise de tolerância a etanol (1; 2,5; 5 e 8%), utilizando a mesmo método de quantificação do crescimento D.O._{600nm}, todas as cepas se multiplicaram nas concentrações de 1 e 2,5%. Sendo que, a 5 e 8% de etanol 66 e 49 isolados, respectivamente, cresceram. Esse mecanismo de seleção prévia pode auxiliar na escolha de leveduras candidatas a serem testadas em ensaios posteriores para produção de cervejas.

Palavras-chave: Leveduras nativas, produção de cerveja, resistência a etanol.

Introdução

A indústria da cerveja movimenta uma imensa rede que envolve desde a pesquisa, o cultivo, o processamento e a comercialização de insumos e matérias-primas até a entrega do produto ao consumidor, no ponto de venda. O setor é um dos mais relevantes da economia brasileira e sua atuação movimenta uma extensa cadeia produtiva que é responsável por 1,6% do PIB e 14% da indústria de transformação nacional (CERVBRASIL, 2016).

O Brasil é o terceiro produtor mundial de cerveja com produção anual de 10,8 milhões de litros ao ano (SINDICERV, 2017). O mercado de cervejas no Brasil é dominado por grandes cervejarias, mas as cervejas artesanais vêm ganhando espaço. As micro-cervejarias estão em torno de 200 fábricas no Brasil presente predominantemente nos estados do sul, sudeste e centro-oeste (SINDICERV, 2017).

A cerveja possui alto valor nutritivo e é fácil e rapidamente assimilada pelo organismo. Seus componentes variam de vitaminas, minerais, carboidratos e proteínas, além do álcool que, se consumido sem exagero, também é benéfico (SINDICERV, 2017).

O processo de fabricação da cerveja envolve três etapas básicas: a produção do mosto, a fermentação e etapas de acabamento ou pós-tratamento (VENTURINI FILHO, 2000; PRIEST & STEWART, 2006).

A elaboração de cervejas com diferentes sabores depende do tipo de processo utilizado e do tipo da levedura para fornecer o sabor e as características a cada tipo de cerveja. As leveduras utilizam os açúcares da formulação da cerveja como substrato para a fermentação produzindo etanol e outros produtos. As leveduras mais utilizadas na cervejaria são do gênero *Saccharomyces cerevisiae* (ale) e *S. uvarum* (lager) (RUSSELL, 1994; WALKER, 2000; PRIEST & STEWART, 2006, LIBKIND et al. 2011).

Além da aplicação na produção de cervejas, estas leveduras são tradicionalmente utilizadas na indústria alimentícia, na produção de outras bebidas alcoólicas como vinho e sake, e também na fermentação em panificação. Mais recentemente, *S. cerevisiae* vem sendo utilizadas na indústria de bioetanol e na produção de compostos heterólogos como insulina humana, vacina para hepatite e papiloma vírus (HOUET et al., 2012).

A seleção de linhagens de levedura para a utilização na produção de cerveja passa por vários itens de triagem em busca das características desejáveis para a cervejaria. Entre estas características estão a produtividade, a eficiência de fermentação sem inibição por concentração de açúcares e etanol, ainda a tolerância as temperaturas ideais de fermentação de cada tipo de cerveja entre outros devem ser consideradas no momento da seleção (GUTIERREZ; ANNICCHINO; LUCATTI, 1990; PRIEST & STEWART, 2006). Assim, este trabalho avaliou 70 leveduras selvagens isolados de cerveja quanto a capacidade de crescimento em glicose, termotolerância e tolerância a etanol, visando a seleção para testes de fermentação de cerveja in vitro.

Material e Métodos

Isolamento e manutenção de leveduras

Para o isolamento foi utilizado 100 mL das cervejas da família lager dos estilos bock (B) e pilsen (P) sem leveduras. Estes foram colocados em ambiente

externo na área de Reserva Ecológica da UEG (coordenadas geográficas: Latitude: 16°22'54.5"S e Longitude: 48°56'44.2"W) por 24h, para promover o contato de leveduras selvagens com os mostos para a captura das mesmas. Depois estas amostras foram mantidas em ambiente na temperatura indicada para este estilo de cerveja (em torno de 15°C) para promover o desenvolvimento de leveduras selvagens que se instalaram no mosto isca. Após 7 dias foram plaqueadas em meio sólido YPD (maltose 1%, extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5% e ágar 2%, acrescidos de 0,001% de cloranfenicol) (NETO; MENDES-FERREIRA, 2005).

As placas foram inoculadas com 100 uL e espalhados com alça de drigalski sendo incubadas á temperatura de 20°C por 7 dias. A partir destas placas foram coletadas as amostras de cada mosto. As amostras foram estocadas em glicerol á 30% e congeladas a -20 °C em freezer, para serem utilizadas nos testes posteriores.

Caracterização fisiológica das leveduras

Com as leveduras selvagens isoladas das amostras dos mostos, foram avaliadas em relação à capacidade de fermentar e assimilar diferentes fontes de carbono (maltose e glicose), termotolerância (10, 20 e 37 °C) e resistência a diferentes concentrações de etanol (VAN DER WALT & YARROW, 1984). Neste último teste realizado em condições aeróbicas, onde 10 µL de inóculo foram inoculados em um 1mL de meio YPD, em micro placas de 96 poços, e crescidas sob agitação (130 rpm) por 48 horas. Após este período cada amostra foi analisada no espectrofotômetro no comprimento de onda 600nm pela leitura da absorbância (ABS), utilizando o meio sem inóculo como referência.

Foi elaborado uma convenção quanto a ABS obtida sendo elaborado uma análise grafica representative do ensaio. Foram consideradas com crescimento ótimo, as leveduras com valores de ABS de >1,7 a ≥1,4; crescimento bom com ABS de <1,4 a ≥1; com crescimento mediano com ABS de <1 a ≥0,5; com crescimento baixo com ABS de <0,5 a ≥0,3; crescimento muito baixo com ABS de <0,3 a ≥0,1 e crescimento nulo com ABS de <0,1 a 0.

Análise de dados

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os dados analisados utilizado o teste de média de Tukey (5%) através do software Sisvar (FERREIRA, 2011).

Resultados e Discussão

Na etapa de isolamento as leveduras selvagens presentes nas cervejas bock e pilsen exposta ao ambiente externo, e mantidas a 20 °C por 15 dias, sendo posteriormente plaqueadas em meio YPD, e quando crescidas, as colônias foram contadas e realizada a coleta destas. Através desta estratégia foram coletadas 34 leveduras isoladas de pilsen (P), e 36 isolados de bock (B). Estes foram avaliados em relação à capacidade de crescimento em meio contendo apenas glicose (10 mM) e a termotolerância. Os 70 isolados mostrou-se capazes de crescerem em glicose revelando uma característica importante no seu metabolismo que é a assimilação de uma fonte distinta de carbono ainda mais porque a glicose pode ser empregada em pequenas quantidades para dar início mais rápido ao processo fermentativo. E além desta característica, todas as leveduras isoladas cresceram nas três temperaturas utilizadas para a análise (10, 20 e 37 °C), indicando maior campo de aplicação destes organismos em ambientes com diferentes temperaturas.

A próxima etapa foi verificar a resistência a diferentes concentrações de etanol das cepas isoladas de B e P (Figura 1). Foi possível observar pelos dados que nas concentrações de 1; 2,5 e 5% de etanol todos os isolados (B e P) cresceram, inclusive a cepa comercial que utilizada somente como controle. Na avaliação de tolerância com 8% de etanol, houve a inibição de crescimento de 9 isolados: B 17, B 18, B 20, B 21, B 23, B 26, P 5, P 7 e P 10 (Figura 1 A e B).

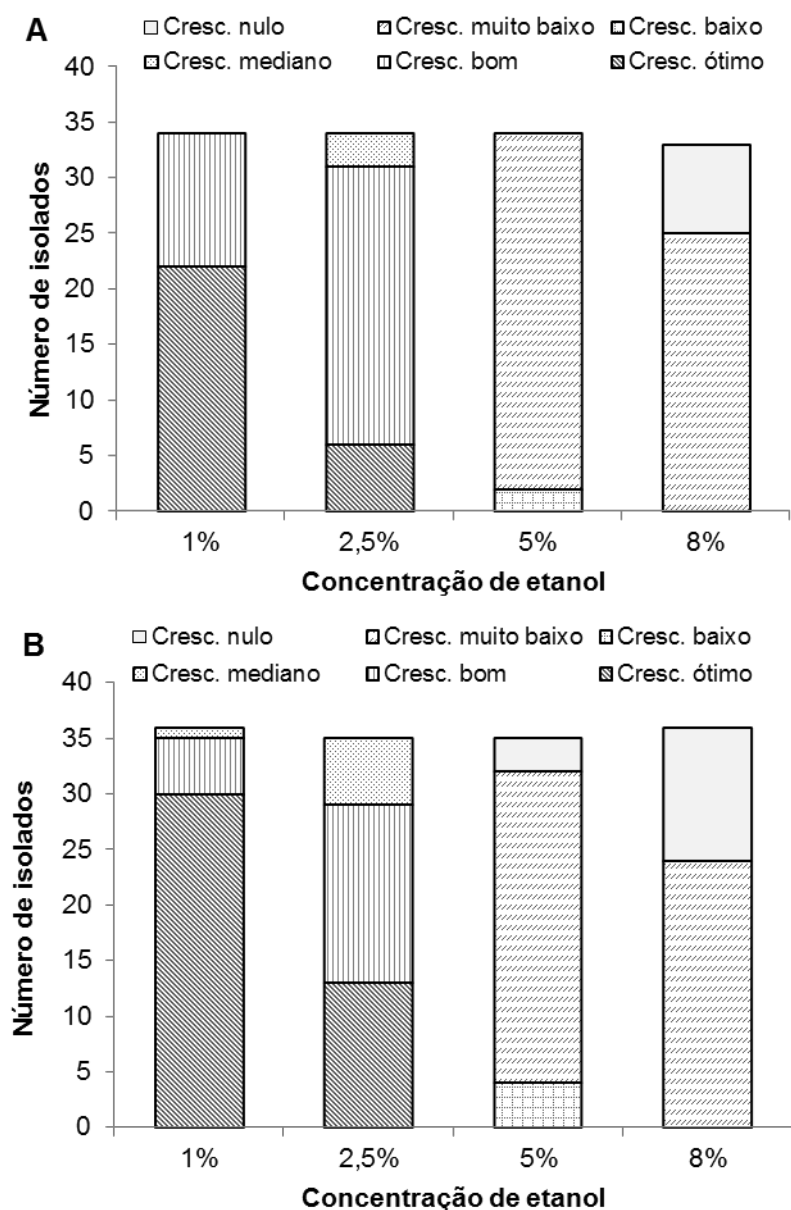
Foi possível observar a partir dos dados de densidade para os isolados P que em etanol 1% 23 apresentaram crescimento muito alto e 12 com crescimento alto (Figura 1 A). Já a 2,5%, 7 isolados apresentaram ótimo crescimento, 25 isolados bom e 3 com crescimento mediano.

Para os isolados B a 1% 30 isolados apresentaram crescimento ótimo, 5 com crescimento bom e 1 isolados (B 12) com crescimento mediano (Figura 1 B). Na avaliação com 2,5% de etanol, 13 foram considerados ótimo, 16 com bom crescimento e 6 isolados com mediano (Figura 1 B).

Com 5 % de etanol foi observada uma diminuição do crescimento para os isolados B sendo que 4 foram considerados com crescimento baixo, 28 como muito baixo e 3 isolados com ausência de crescimento (Figura 1 B). Para os isolados P houve uma diminuição do crescimento sendo que 33 foram considerados de crescimento baixo, comportamento um pouco diferente dos isolados P, onde apenas 2 com crescimento baixo e 33 muito baixo (Figura 1 A).

Na presença de 8% de etanol houve uma diminuição do crescimento em geral independente da fonte de isolamento sendo que todos passaram a se desenvolver muito pouco ou apresentou ausência de crescimento (Figura 1 A e B).

Figura 1 – Avaliação de leveduras isoladas de cerveja quanto a capacidade de crescimento na presença de quatro concentrações de etanol. A- 34 leveduras isolados P e B-36 leveduras isolados B crescidas sob agitação por 48hs nas concentrações de etanol de 1, 2,5, 5 e 8%



Assim a maior tolerância dos isolados ocorreu nas concentrações de 1 e 2,5% onde 61 isolados, e a cepa comercial foram capazes de se multiplicar com crescimento ótimo e bom. Pela variação da tolerância a etanol, observado nos

grupos de isolados (P e B) foi possível de evidenciar a diversidade desses microrganismos.

A presença de etanol pode afetar o crescimento de leveduras com aumento da toxidez diretamente relacionado com o aumento da concentração (QUEROL et al., 2003). Os principais efeitos relacionados a presença do etanol é o aumento da fluidez da membrana plasmática com uma desorganização celular, mas que as leveduras tolerantes podem resistir a esta fluidização e apresentar a tolerância e manutenção do crescimento (DING et al., 2009).

Assim é possível observar que os isolados obtidos tem tolerância até a concentrações de 5% de etanol no meio de cultivo, foi observado que apenas 4% do 70 isolados testados apresentou crescimento nulo, já em 8% de etanol 30% dos isolados não apresentaram crescimento ou seja foram sensíveis a presença de etanol. Os isolados selvagens do Cerrado estudados foram considerados de média tolerância a etanol nas condições testadas, podendo ser possível sua utilização futura, mediante a indução de mutação natural como proposto por Bückner (2014)

Segundo Rosa et al.(2006) e Bitu (2009) a cerveja possui em média de 4,5 a 6% de etanol, o que sugere que algumas das cepas nativas do Cerrado isoladas poderão ser utilizadas nos testes de fermentação de cervejas, sendo a etapa seguinte do trabalho.

Considerações Finais

Foi possível obter 70 isolados de leveduras nativas do Cerrado, sendo que todos os isolados cresceram em glicose e apresentaram crescimento nas temperaturas testadas (10, 20 e 37°C).

Todas as leveduras nativas do Cerrado apresentaram resistência a 1%; 2,5% e menor capacidade de crescimento com 5% de etanol e com menor tolerância a 8% nas condições de aerobiose.

Foi possível observar a variabilidade fisiológica dos isolados sendo que os isolados P foram mais tolerantes a etanol do que os isolados B, e testes de fermentação deverão ser realizados para determinar a efetividade dos isolados nas condições da fabricação de cerveja do tipo lager.

Agradecimentos

A UEG pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica, ao Curso de Farmácia ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e a CCET, Campus Anápolis, GO pelo apoio.

Referências

- BITU, H.L. **Cervejas especiais – curso da Semana da Química**. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.
- Bücker, A. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a tolerância ao etanol**. Tese de Doutorado UFSC, Florianópolis, SC, 2014, 111p.
- CERVBRASIL. **Anuário 2016**. Disponível em :<http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130_CervBrasilAnuario2016_WEB.pdf>. Acesso em 20 de maio de 2017.
- DING, J. et al. **Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 85, p. 253-263, 2009.
- GUTIERREZ, L. E.; ANNICCHINO, A. V. K. O.; LUCATTI, L. **Capacidade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ácidos graxos**. In: ANAIS DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”, 1990, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, v. 47, p. 575-95, 1990.
- HOU J, TYO KE, LIU Z, PETRANOVIC D & NIELSEN J. **Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae***. FEMS Yeast Research., v. 12, p. 491–510, 2012.
- LIBKIND, D.; et al. **Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast**. PNAS, v.108, p. 14539-14544, 2011.
- NETO, L. ; MENDES-FERREIRA, A. A.. **Pesquisa de Atividade Sulfito Redutase em Leveduras de Origem Enológica**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 25(2): 275-278, abr.-jun. 2005.
- PRIEST, F. G.; STEWART, G.G. **Hand book of Brewing**. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2006, 829p.
- QUEROL, A. et al. Adaptive evolution of wine yeast. International Journal of Food Microbiology, v. 86, p. 3–10, 2003.
- PROBAC DO BRASIL. **Escala nefelométrica de Mc Farland**. Disponível em:<<http://www.probac.com.br/bulas/nefelobac.pdf>>. Acesso em: 26 de junho de 2016.
- ROSA, S.E.S.; COSENZA, J.P.; LEÃO, L.T.S. **Panorama do setor de bebidas no Brasil**. BNDES Setorial, n. 23, p. 101-150, 2006.

RUSSELL, I. Yeast In: **Hand book of Brewing** Ed. Hardwick, W. A.. New York: Marcel Dekker, p.169-202, 1994.

SINDICERV. Disponível em:<<http://www.sindicerv.com.br>>. Acesso em: 28 de março de 2015.

VAN DER WALT, J. P. & YARROW, D. **The genus *Arxiozyma* gen. nov. (Saccharomycetaceae)**. South African Journal of Botany, 1984. v. 3, pg 340.

VENTURINI FILHO, W.G. **Tecnologia de cerveja**. Funep: Botucatu, 2000. 83p.

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