



ISOLAMENTO DE LEVEDURAS COM CAPACIDADE FERMENTATIVA DE MOSTO CERVEJEIRO ORIUNDAS DE FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE *MALPIGHIA GLABRA*

Murilo Dirksen ⁽¹⁾

Gabriela Muller ⁽²⁾

Resumo

Bebidas fermentadas são produzidas a milhares de anos por uma gama de micro-organismos encontrados no ar, dentre eles leveduras. A utilização de culturas puras para a fermentação e padronização da produção de cerveja é relativamente recente, e data de 1883, com o isolamento da primeira levedura lager (*bottom fermentation*) na cervejaria Carlsberg, na Dinamarca. Após essa descoberta, inúmeras leveduras foram isoladas de ambientes cervejeiros e também da natureza. É notório que as leveduras principalmente do tipo Ale, possuem características específicas de acordo com a região/país de onde foram isoladas. A possibilidade de encontrar novas leveduras para a produção de cerveja para um mercado crescente de consumidores ávidos por novidades, trouxe a curiosidade de analisar as variedades de micro-organismos encontrados na natureza. O objetivo desse trabalho foi isolar leveduras a partir de fermentações espontâneas de mosto cervejeiro com adição de frutas comumente encontradas no estado de Santa Catarina. A escolha pela acerola, *Malpighia glabra*, teve como base a sua produção orgânica e abundância das frutas no momento de início do trabalho. Para a fermentação espontânea foram selecionadas frutas machucadas e com sinais de fermentação em estágio inicial. As frutas selecionadas foram adicionadas a um mosto a base de malte sem adição de leveduras. A fermentação foi conduzida aberta e em temperatura ambiente por um período de cinco meses (janeiro a maio/2016). Amostras após o início da fermentação espontânea e próximo ao final da fermentação foram retiradas e analisadas quanto a presença de leveduras. Foram isoladas 22 leveduras e analisadas por um conjunto de testes que incluem: capacidade de fermentação de glicose, produção de gás, floculação, atenuação de mosto cervejeiro, resistência a CHX, produção de ácido, utilização de melibiose e morfologia celular. A partir das 22 leveduras isoladas, somente 03 leveduras foram selecionadas por apresentar capacidade fermentativa e morfologia celular compatíveis com leveduras comerciais utilizadas para a fermentação de cervejas. Essas leveduras foram propagadas e utilizadas para a produção de cervejas que serão apresentadas durante a realização do I Cervecon.

Palavras-chave: Cerveja; Leveduras; Fermentação Espontânea.

1 Introdução

A Microbiologia (do grego: *mikros*, pequeno; *bios*, vida e *logos*, ciência) é o estudo dos organismos microscópicos, que não podem ser observados a olho nu, e de suas atividades. O grupo inclui bactérias, fungos (leveduras e fungos filamentosos), protozoários e algas microscópicas. Também estão inclusos os vírus, entidades acelulares algumas vezes consideradas a fronteira entre seres vivos e não vivos.

Os microrganismos seguem as características comuns a todos os sistemas considerados biológicos: habilidade de se reproduzir, capacidade de ingerir ou assimilar substâncias (metabolizando-as para suas necessidades energéticas e de crescimento), habilidade de excreção de metabólitos, capacidade de reagir a alterações ambientais (adaptação) e suscetibilidade a mutações.

Os microrganismos também possuem muitas aplicações comerciais, sendo usados na síntese de produtos químicos como ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas, álcoois e muitas drogas. A indústria de

¹Escola Superior de Cerveja e Malte

²LevTeck - Tecnologia Viva
murilo.dirksen@gmail.com



alimentos utiliza microrganismos para produzir: vinagre, chucrute, picles, azeitonas verdes, molho de soja, manteiga, queijos, iogurte, pão, embutidos, bebidas fermentadas, etc.

A história da associação de leveduras com a sociedade humana está diretamente ligada com a criação do pão, cervejas e vinhos, sendo considerada uma das práticas biotecnológicas mais antigas do mundo, datadas de mais de 5.000 anos.

O uso de micro-organismos encontrados na natureza está intimamente ligado a história da fermentação, sendo a fermentação espontânea a primeira forma de fermentação descoberta. Muitos historiadores têm relatado que a produção de bebidas fermentadas foi um dos fatores culminantes para que as pessoas da época mudassem seus hábitos de caçadores e coletores para agricultores (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). A prática de produzir cerveja passou a ser herança familiar, e o reuso do fermento de uma batelada para iniciar a outra tornou-se uma prática comum, iniciando a domesticação de leveduras, mesmo sem ter conhecimento da existência da mesma.

Durante a execução de uma fermentação espontânea, diversos tipos de micro-organismos entram em contato com o mosto, sendo possível encontrar *Brettanomyces ssp*, *Lactobacillus ssp*, *Pediococcus ssp.*, *Saccharomyces ssp.*, *Acetobacter ssp.* entre outros, que serão responsáveis por fermentar e acidificar o mosto (SPARROW, 2005). A presença de leveduras em um ambiente normalmente está relacionada a presença de fontes de açúcar, sendo a superfície de frutas, grãos de cereais, folhas e flores excelentes locais para encontrar pequenas populações de *Saccharomyces* (TIKKA et al., 2013; WHITE; ZAINASHEFF, 2010; SOUZA, 1969, apud MATIENZO, 2002).

Em uma fermentação espontânea, geralmente é encontrada uma sucessão de populações de micro-organismos que atuam consumindo os açúcares do mosto. Estudos analisados revelam que Enterobactérias e leveduras oxidativas dominam o início da fermentação, sendo seguidas pelo aparecimento no período de 1 a 2 meses do começo da fermentação por leveduras *Saccharomyces ssp.*, que irão realizar a fermentação alcoólica, e *Pediococcus*, que irão acidificar o mosto pela produção de ácido láctico. Após um ano de fermentação o processo é dominado por *Brettanomyces ssp.* que irão finalizar a fermentação (VANOEVERLEN et al., 1977; SPARROW, 2005).

Leveduras cervejeiras pertencem ao gênero *Saccharomyces*. Em soluções aquosas ácidas (mosto), elas são capazes de adsorver açúcares dissolvidos, fontes de nitrogênio (amino ácidos e peptídeos simples), vitaminas, íons através da sua membrana plasmática. Após, realizam uma estruturada série de reações metabólicas para seu crescimento e fermentação.

Saccharomyces cerevisiae possui a habilidade de metabolizar um amplo espectro de açúcares, como: glicose, frutose, manose, rafinose, galactose, sacarose, maltose e maltotriose. Entretanto, espécies próximas como *Saccharomyces diastaticus* e *Saccharomyces pastorianus* (lager) conseguem metabolizar dextrinas e melibiose, respectivamente. Obviamente, *S. cerevisiae* e espécies relacionadas não são capazes de metabolizar todos os açúcares encontrados na natureza. Exemplos de açúcares não metabolizados são: pentoses (ribose, xilose e arabinose), celobiose (resultado do produto de hidrólise da celulose e hemicelulose), lactose (açúcar do leite), insulina e celulose.

Leveduras utilizadas na produção de cerveja são microrganismos anaeróbios facultativos, que significa que são capazes de crescer na presença ou ausência de oxigênio. A formação do etanol ocorre Via Embden-Meyerhof-Parnas (conhecida como Via Glicolítica), onde, teoricamente, 1 g de glicose irá render 0,51 g de etanol e 0,49 g de CO₂. Porém, como algumas glicoses são desviadas para produção de biomassa, é mais correto considerar um rendimento de 0,46 g de etanol e 0,44 g de CO₂ partindo de 1 g de glicose (ANNEMÜLLER et al, 2011).

As características como aroma e sabor em qualquer cerveja, é em grande parte determinada pela cepa de levedura utilizada. Além do mais, propriedades como floculação, habilidade de fermentação, tolerância a etanol, à concentração salina e as exigências de oxigênio tem um impacto determinante sobre o desempenho da fermentação (BOULTON; QUAIN, 2001).



2 Metodologia

2.1 Propagação e inoculação de micro-organismos

As frutas de acerola foram selecionadas conforme características previamente determinadas (frutos maduros e com machucados) e adicionadas a um mosto cervejeiro sem lúpulo com extrato de 10 °P, e agitação intermitente. Após 4 dias, o líquido foi transferido para o mosto cervejeiro com 12,4 °P e 9 IBU.

2.2 Isolamento e análise das colônias

Após o trigésimo dia de fermentação, uma amostra contendo porções de líquido e matéria sólida da fermentação foi retirada para plaqueamento em placas *TeckLev #3* (sem cicloheximida). As amostras foram diluídas 1000 vezes em solução salina (NaCl 0,9 %) e 0,1 mL da amostra diluída foi plaqueada pela técnica de plaqueamento em superfície no meio *TeckLev #3* e as placas incubadas por 72 horas a 28 °C. As colônias formadas com características idêntica a de *Saccharomyces* (colônias de bordas arredondadas, coloração bege e elevadas) foram repicadas em novas placas *TeckLev #3* para isolamento e verificação da produção de ácido e também inoculadas em meio contendo um inibidor de leveduras cervejeiras, cicloheximida (CHX). Amostras das colônias foram analisadas em microscópio óptico em ampliação de 400X para determinação da morfologia celular.

2.3 Testes bioquímicos

Para análise do crescimento em glicose o meio utilizado foi o YPD (extrato de levedura 1 %, peptona 2 %, glicose 2 %) e adicionado um tubo de Duran. Para o crescimento em melibiose, o meio utilizado foi YNB 0,67 %, melibiose 2 % e ágar 2 %. O teste fermentativo de mosto cervejeiro foi realizado em tubos de ensaio contendo 10 mL de mosto com 10 °P, sem lúpulo. Os meios foram autoclavados a 121 °C e 1 atm. por 15 minutos. Os resultados foram lidos em intervalos de 24 horas.

2.4 Produção de cerveja com as cepas isoladas e análise sensorial

Foi produzido mosto de puro malte pilsen com extrato de 12 °P e 10 IBU para a produção de cerveja utilizando as cepas isoladas com características compatíveis com *Saccharomyces*. A fermentação foi conduzida em temperaturas entorno de 18 °C por 7 dias. Foi medida a quantidade inicial de células em cada fermentação utilizando câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio ótico e determinada a viabilidade de cada inoculo com o corante azul de metileno (SAMI; IKEDA; YABUUCHI, 1994). As cervejas produzidas foram analisadas em um painel sensorial para determinação de aromas gerados pelas cepas analisadas.

3 Resultados e Discussões

3.1 Fermentação e amostragem

Após 5 dias da inoculação, a formação de espuma (*Krausen*) indicou o início da fermentação espontânea. Ao longo da fermentação, o *Krausen* sofreu alterações que indicaram a sucessão de micro-organismo, tendo o período entre 30 e 60 dias o aparecimento de *Krausen* típico de fermentação de *Saccharomyces* (bege e denso), como mostra a Figura 01.

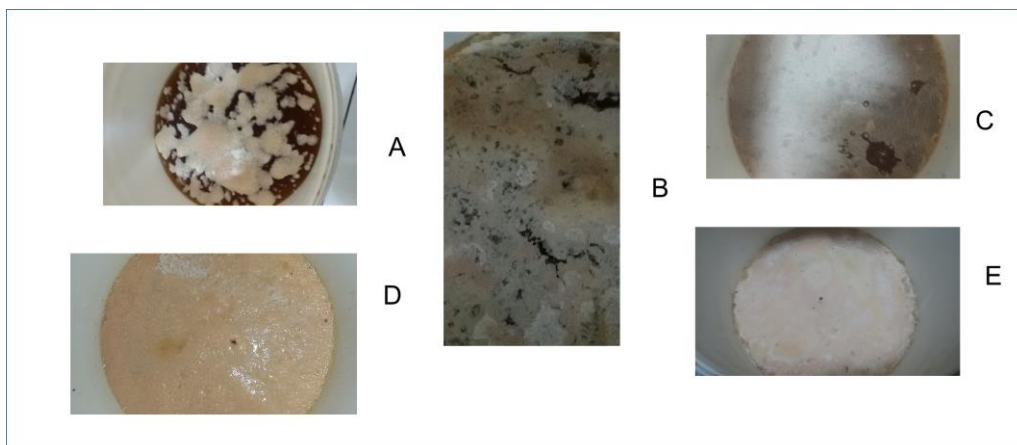


Figura 01: A) Após 5 dias; B) Após 15 dias; C) Após 40 dias; D) Após 60 dias; E) Após 130 Dias

3.2 Análises Bioquímicas e morfológicas

Das diversas colônias formadas nas placas *TeckLev #3*, 22 apresentaram características macro morfológicas compatíveis com *Saccharomyces* e foram selecionadas para o trabalho. Das 22 colônias selecionadas, 10 colônias não apresentaram crescimento no meio *TeckLev #6*, o qual continha um inibidor de crescimento de leveduras cervejeiras, indicando que as mesmas poderiam pertencer as espécies *S. cerevisiae*. As demais colônias (12 colônias) apresentaram crescimento no meio *TeckLev #6*, podendo ser consideradas leveduras selvagens, descartadas como cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Após o crescimento das leveduras sensíveis a CHX no meio *TeckLev #3*, foi observado que 02 colônias produziram ácido, alterando a coloração do meio de verde para amarelo (Tabela 01), sendo descartadas quanto ao seu potencial para a utilização na produção de cerveja.

Quanto a morfologia celular das 10 colônias resultantes após a avaliação da produção de ácido, foi observado que somente 07 colônias possuíam células ovais, de tamanho regular a grande, com brotamentos multilaterais (Tabela 01).

O teste mais importante para selecionar as colônias com potencial para a fermentação de mosto cervejeiro e produção de cerveja foi o teste de atenuação de mosto. Somente três isolados apresentaram a capacidade de atenuação do mosto cervejeiro, sendo elas 4C1-C1, 3C2(C5), 3C8, que atenuaram o mosto em 33 %, 19,2 % e 17,5 %, respectivamente (Tabela 01). As demais leveduras sensíveis à CHX não foram capazes de consumir o principal açúcar do mosto cervejeiro, a maltose.

Para finalizar os ensaios bioquímicos foi testado o crescimento em melibiose, onde leveduras *Saccharomyces cerevisiae* possuem consumo variável desse açúcar. Como resultado obtivemos que somente as cepas 3C2(C5) e 3C8 apresentaram crescimento nesse açúcar. Testes moleculares serão necessários para a identificação correta de gênero e espécie dessas leveduras com aplicação em potencial na produção de cervejas.

As leveduras com capacidade fermentativa, que se encontram destacadas na Tabela 01, foram escolhidas por possuírem características encontradas em *Saccharomyces cerevisiae*, como atenuação de mosto cervejeiro, sem resistência a CHX, sem produção de ácido e morfologia celular idêntica com reprodução por brotamento, sendo utilizadas para a produção de cerveja a partir de um mosto 11 °P e 10 IBU.



AMOSTRA	RESISTÊNCIA CHX	PRODUÇÃO DE ÁCIDO	FERMENTAÇÃO GLICOSE	BROTAMENTO	MORFOLOGIA CELULAR	Atenuação (5 dias)	Produção de Gás	Crescimento Melibiose (5 dias)
4C8	+	não	NEGATIVA	Sim	Celulas ovais regulares, individuais e em cadeias de 2 a 5 células. Algumas apresentam vacuolos grandes	0%	+	+
4C9	+	não	FRACA	sim	Celular ovais e achatadas aglomeradas, formando cadeias e se sobrepondo. Algumas individuais. Bortamentos laterais	0%	+	-
3C1	+	sim	FORTE	sim	Células achatadas pequena e grandes, células redondas grandes, células irregulares grandes.	4%	+	++
3C3	+	não	FORTE	Sim	Leveduras grandes, achatadas e alongadas, finas parecendo bacilos.	0%	+	-
3C4	+	não	FORTE	sim	Células ovais grandes, achatadas grandes e pequenas. Células alinhadas seguindo uma direção	0%	+	+
4C2	+	não	FRACA	sim	Celulas ovais grandes e pequenas. Individuais	0%	+	+
4C3	+	sim	FRACA	Sim	Celulas achatadas com brotamento, individuais e em cadeia.	4%	+	++
4C4	+	sim	NEGATIVA	Sim	Celulas ovais regulares e pequena, formando cadeias de 2 a 5 células com brotamentos. Algumas individuais	0%	+	-
4C5	+	não	FORTE	sim	Celulas ovais regulares e pequena, células alongadas grandes. Brotamento. Formam cadeias com muitas células.	19,20%	++	-
4C7	+	não	FRACA	sim	Celulas ovais regulares individuais e em cadeias. Brotamento	4%	++	-
3C4	-	não	FRACA		Celulas regulares e pequenas, individuais	0%	++	-
4C1	-	não	FRACA	sim	Celulas ovais pequenas e grandes	0%	++	-
4C2	-	não	FRACA		Celulas ovais pequenas	0%	++	-
4C3	-	sim	FORTE	sim	Celulas ovais grandes e pequenas.	0%	++	-
4C4	-	sim	NEGATIVA	sim	Cocobacilos pequenos resistentes a clorfenicol	0%	-	-
4C1-C1	-	não	FRACA	sim	Celulas ovais regular, algumas individuais e outras formando cadeias de 2 a 6 células, algumas se sobrepondo. Algumas células aparecem alongadas.	33%	++	-
4C6	-	não	FORTE	sim	Celulas ovais regulares. Algumas individuais outras formando cadeias de 3 a 6 células. Brotamento de 1 e/ou 2 células	0%	++	-
3C1	-	não	FRACA	sim	Celulas ovais regulares. Individuais e em cadeias. Brotamento lateral	0%	++	-
3C2 (C5)	-	não	FRACA	sim	Celulas ovais grandes em sua maioria com algumas pequenas espalhadas individuais. As grandes encontram-se individuais ou em cadeias de 2 a 5 células, sobrepondo as vezes. Brotamento lateral	19,20%	-	++
3C3	-	não	FORTE	sim	Celulas ovais regulares e pequenas, individuais e em cadeias de 2 a 6 células.	0%	++	-
3C8	-	não	FORTE	sim	Celulas ovais grandes. Individuais e em cadeias. Brotamento	17,50%	-	+

Tabela 01: Resultado testes bioquímicos - = ausência crescimento/produção de gás + = crescimento/produção de gás fraca ++ = crescimento/produção de gás forte



3.3 Análise sensorial das cervejas produzidas com as cepas 3C2(C5), 4C1-C1 e 3C8

3.3.1 Cerveja produzida com a cepa 3C2(C5)

Após a propagação dessa cepa, o número de células e a viabilidade determinada foram $2,26 \times 10^8$ cel/mL e 96,9%, respectivamente. A cerveja produzida apresentou perfil sensorial aromas de malte, leve aroma de lúpulo, médio éster de frutas amarelas, leve aroma doce lembrando baunilha, médio fenólico lembrando cravo e pimentas pretas, leve álcool e acidez. No palato apresentou corpo médio-baixo, carbonatação média-alta, médio sabor de malte e lúpulo e leve acidez. A cerveja obteve uma atenuação aparente de 73 % e um grau alcoólico de 4,7 % abv. Foram sugeridos alguns estilos de cerveja para a utilização dessa cepa, e o mais indicado foi o estilo Weizen Ale ou Blond Ale.

3.3.2 Cerveja produzida com a cepa 4C1-C1

Após ser propagado, foram contados $7,95 \times 10^7$ cel/mL com viabilidade de 89,3%. A cerveja produzida com esta cepa apresentou um perfil sensorial com aroma de malte e miolo de pão, leve aroma fenólico lembrando cravo e pimenta branca e leve éster lembrando frutas amarelas. No palato corpo baixo com final seco, sabor lembrando miolo de pão, leve sabor de especiarias, leve acidez, leve sabor de lúpulo no retrogosto e sabor picante lembrando canela. A cerveja obteve uma atenuação aparente de 78 % e um grau alcoólico de 5 % abv. Para essa linhagem, o estilo de cerveja sugerido foi WitBier.

3.3.3 Cerveja produzida com a cepa 3C8

Após a propagação dessa cepa, o número de células e viabilidade foram determinados, sendo encontrados valores de $1,17 \times 10^8$ cel/mL e 71,4% respectivamente. A cerveja produzida apresentou perfil sensorial com aroma de pão, leve aroma de lúpulo, leve aroma frutado de ésteres de frutas amarelas, leve aroma fenólico lembrando cravo e pimenta branca e um leve acetaldeído (maça verde). No palato corpo médio-baixo e carbonatação média alta, sabor de malte, leve sabor de lúpulo, leve amargor de lúpulo, leve acetaldeído, e um leve picante lembrando canela. A cerveja obteve uma atenuação aparente de 83% e um grau alcoólico de 5,4 % abv, sendo considerada a mais neutra de todas as cervejas produzidas.

4 Considerações finais

As três cepas isoladas a partir da fermentação espontânea de *Malpighia glabra*, apresentaram características com potencial para a utilização na indústria cervejeira. As variações ocorridas no *Krausen*, como alteração de cor e densidade, indicam uma sucessão de micro-organismo agindo no mosto, trazendo a possibilidade de outras leveduras serem encontradas em coletas posteriores ao trigésimo dia. Uma posterior análise genética das 3 cepas isoladas poderá indicar qual a linhagem delas. As cervejas produzidas a partir das cepas selecionadas apresentaram bom equilíbrio aromático e de sabor. Cabe salientar que alguns aromas encontrados nas cervejas produzidas a partir das cepas isoladas são conseguidos em cervejas comerciais somente pela utilização de matérias primas contendo compostos chamados precursores (normalmente originários de malte específicos como o de trigo).

Referências bibliográficas

ANNEMÜLLER, Gerolf; MANGER, Hans-J; LIETZ, Peter. The Yeast in the Brewery: Management, Pure yeast cultures, Propagation. Berlin: VLB Berlin, 2011.

BOULTON, Chris; QUAIN, David. **Brewing Yeast and Fermentation**. Oxford: Blackwell Science, 2001.



MATIENZO, Patricia Anchorena. **Re-Identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares.** 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Agrônômica, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-08012003-081903/publico/patricia.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

SAMI, M; IKEDA, M; YABUUCHI, S. **Evaluation of the Alkaline Methylene Blue Staining Method for Yeast Activity Determination.** Journal Of Fermentation And Bioengineering. Tóquio, p. 212-216. 04 jul. 1994.

SPARROW, Jeff. **Wild Brews:** Beer beyond the influence of brewer's yeast. Colorado: Brewers Publications, 2005.

TIKKA, Chiranjeevi et al. **Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains.** 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670125/>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

VANOEVELEN, D et al. Microbial aspects of spontaneous fermentation in production of lambic and gueuze. **Journal Of The Institute Of Brew.** London, p. 356-360. 12 abr. 1977. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1977.tb03825.x/epdf>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

WHITE, Chris; ZAINASHEFF, Jamil. **Yeast:** The Practical Guide to Beer Fermentation. Colorado: Brewers Publications, 2010.