

BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA.

Autores: ISABELLA GUIMARÃES PEREIRA, LAUANY MATOS DE NOVAIS CAPUCHIINHO, HENRIQUE MAIA VALÉRIO

Introdução

As bebidas alcoólicas são consumidas há cerca de 6.000 anos a.C. A produção de início, era feita de maneira empírica por diferentes povos como os fenícios, assírios, babilônios, hebreus, egípcios, chineses, germanos, gregos e romanos. (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1993).

As leveduras são fungos unicelulares com desenvolvimento aeróbico ou anaeróbico. Dentre algumas delas existem as que são consideradas selvagens, ou seja, são aquelas que diferem das leveduras domesticadas de cultivo em laboratório e das comerciais, utilizadas na elaboração de determinada cerveja, vinho e outras bebidas fermentadas.

Diversos autores citam em seus trabalhos o isolamento de leveduras partindo de frutos do Cerrado, e avaliaram algumas dessas leveduras selvagens numa fermentação para a produção de etanol, constatando um ótimo desempenho fermentativo, sendo estas, os gêneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* e *Kluyveromyces*, sendo que nenhuma destas espécies apresentou características patogênicas (ANDRIETTA *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2013).

Linhagens de leveduras selvagens do gênero *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* podem ser promissoras para uma eficiente fermentação alcoólica em cerveja, especificamente a *S. cerevisiae*, por possuir atividade fermentativa excelente sobre os açúcares de 6 carbonos, notadamente a maltose.

A seleção de linhagens de *Saccharomyces* sp, ou não-*Saccharomyces* selvagens para a produção de cervejas artesanais ainda é pouco realizada no Brasil, logo, essa falta de informações exige estudos sobre o uso dessas linhagens na fabricação de cerveja, como sendo extremamente valiosa e promissora (MONTANDON, 2016).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi o isolamento e caracterização de leveduras selvagens a partir da coleta de frutos de espécies nativas do Cerrado, que tenham potencial na produção de cerveja e que sejam potencialmente promissoras para uma eficiente fermentação alcoólica sobre maltes puros e outras fontes fermentáveis.

Materiais e Métodos

Para realização do trabalho, foram coletados 45 frutos, 15 de cada espécie de planta em três árvores distintas (Araçá (*Psidium* sp.), Panã (*Annona crassiflora*) e Mangaba (*Hancornia speciosa*)), a fim de se comparar a diversidade de leveduras isoladas de cada amostra. Os frutos foram embalados em sacos estéreis e levados em recipientes térmicos ao Laboratório de Ecologia de Microrganismos e Microbiologia Ambiental/LEMMA da UNIMONTES – Universidade Estadual de Montes Claros, onde novamente foram selecionados quanto ao estágio de maturação e integridade, antes de serem isolados.

Os frutos foram submetidos a dois tipos de procedimentos. O primeiro foi o esfregão da carposfera de cada fruto com o auxílio de um *swab* e posterior estriamento deste nas placas de petri e em triplicata, contendo os meios de cultura. O segundo foi o corte transversal de 1 grama da casca do fruto, onde colocou-se em 40 ml de solução salina. As amostras foram diluídas (10-3) com água salina estéril 0,9% e, então, 100 µL desta diluição foram transferidos para placas de Petri com Meio Mínimo de Potencorvo adaptado para selecionar *Saccharomyces* e o YEPD outras cepas possíveis, espalhando o inóculo com o auxílio de uma alça de *Drigalski*. Aguardou-se 48 horas em BOD a 28°.

As amostras foram submetidas ao teste de tolerância ao etanol, avaliação do metabolismo de glicose e maltose e, por fim, à produção da cerveja.

Resultados e Discussão

O teste de tolerância ao etanol os resultados demonstraram que após as 48 horas, observou-se crescimento incontável na maioria das inoculações. Observou-se ainda que na presença de etanol, as células mostraram-se mais sensíveis que as células crescidas em condições controle, no mesmo período de tempo. No entanto, cabe ressaltar que em muitas amostras, principalmente nas concentrações de 5% e 7,5%, as UFCs (Unidade Formadora de Colônias), cresceram tão significativamente que não puderam ser contadas, bem como na de 10% cresceram em vinte isolados e 12% em dez dos isolados, por fim, em 15% sete amostras cresceram incontáveis.

Para o teste de fermentação com maltose e glicose em eppendorf 110 isolados foram submetidos a uma fermentação em maltose, no entanto, nenhuma das amostras apresentou crescimento expressivo, esse fato pode ter ocorrido porque, mesmo que essas leveduras tenham sido isoladas em meio Pontecorvo contendo apenas maltose como fonte de açúcares, elas o fizeram pela via oxidativa, e não por via fermentativa, como no teste de atenuação.

Submeteram-se então as amostras a uma fermentação em glicose a 12,1° Brix (o recomendado em produção de cerveja). As amostras passaram por um processo de readaptação às concentrações de glicose partindo de 2%, 4%, 8% e 12%.

A viabilidade celular manteve-se mediana durante todas as transferências de concentrações de glicose, observadas visualmente, e os valores de Brix oscilando na maioria das transferências entre 40 e 70% na medição final. No total foram 4 transferências. De todas as amostras, foram escolhidas 4 as quais apresentaram valores expressivos, a amostra comercial e a A18 e A20, reduziram o açúcar a 0 nas concentrações de 2%, 4% e 8%, em 12% de glicose reduziram 60% e as amostras A26 e A34 ficaram em 70% de consumo de glicose nas concentrações de 2%, 4% e 8%, em 12% reduziram cerca de 30%.

A cerveja produzida foi do tipo Ale, com receita adaptada para o estilo Kolsch, as cepas de leveduras utilizadas para esta produção foram, A18, A20, A26 e A34. Foi observado que os valores de teor alcoólico final ficaram entre 1,91 a 3,9%, onde este último referia-se à amostra controle e à A18 I. Os valores expressam menor teor em relação aos encontrados na literatura que sugerem para esse estilo com valores de etanol entre 4,4 e 5,2%.

Considerações finais

Das 110 leveduras isoladas a partir da carposfera dos frutos Mangaba, Araçá e Panã e etapas de resistência ao etanol e processo fermentativo inicial, foram obtidas leveduras com perfil compatível com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que foi possível observar a tolerância bem como características apropriadas às condições estabelecidas em um processo de produção de cerveja.

A etapa de fermentação em maltose e glicose, permitiu a seleção de 2 leveduras que obtiveram 100% de consumo da glicose e outras com um consumo variando entre 50 e 70%. De maneira geral, as análises físico-químicas mostraram que todas as amostras apresentaram elevadas concentrações de acidez, ésteres, turbidez e coloração, ou seja, fora do padrão determinado pela literatura.

Será dada continuidade a esta pesquisa, finalizando-a com a identificação das linhagens que não foram sequenciadas e análises Físico-Químicas e testes sensoriais após a finalização da maturação das 4 linhagens selvagens testadas em relação ao controle.

Referências

- [1] ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial (Processos Fermentativos e Enzimáticos) v.3, p. 01-43. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.
- [2] ANDRIETTA, M.G.S; ANDRIETTA, S.R, STECKELBERG, C; STUPIELLO, E.M.A. Brazil 30 years of Proálcool. International Sugar Journal Campinas 109(1299): 195-200, 2007.
- [3] AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORGANI, W. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgard Blücher, 243 p.: il (Biotecnologia 5)1993.

Figuras

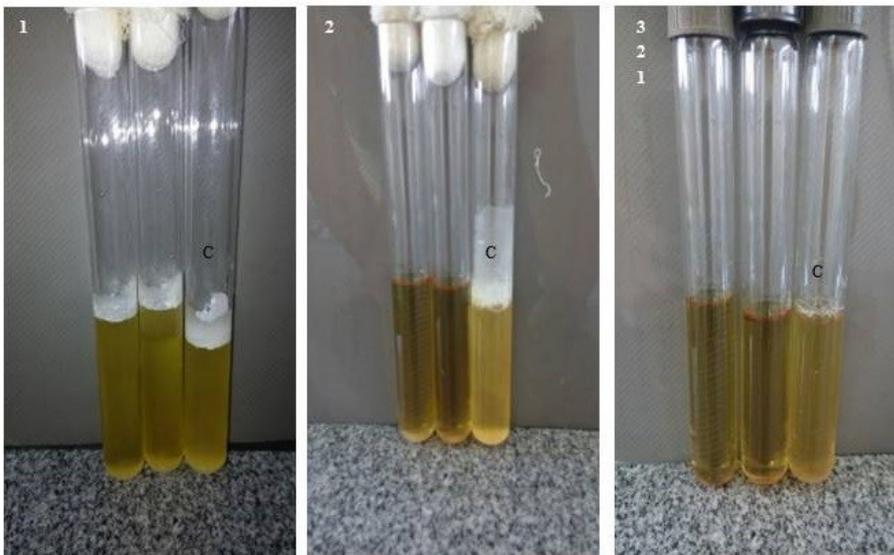


Figura 1. Teste de viabilidade celular na ausência ou presença de etanol 5%, 7,5%, 10%, 12% e 15% de etanol em meio líquido YEPD, submetidos a análise de densidade óptica (600nm).

Legenda figura 1. 1-Crescimento na superfície / 2 – Crescimento: controle na superfície e amostras fundo / 3 – Crescimento no fundo.

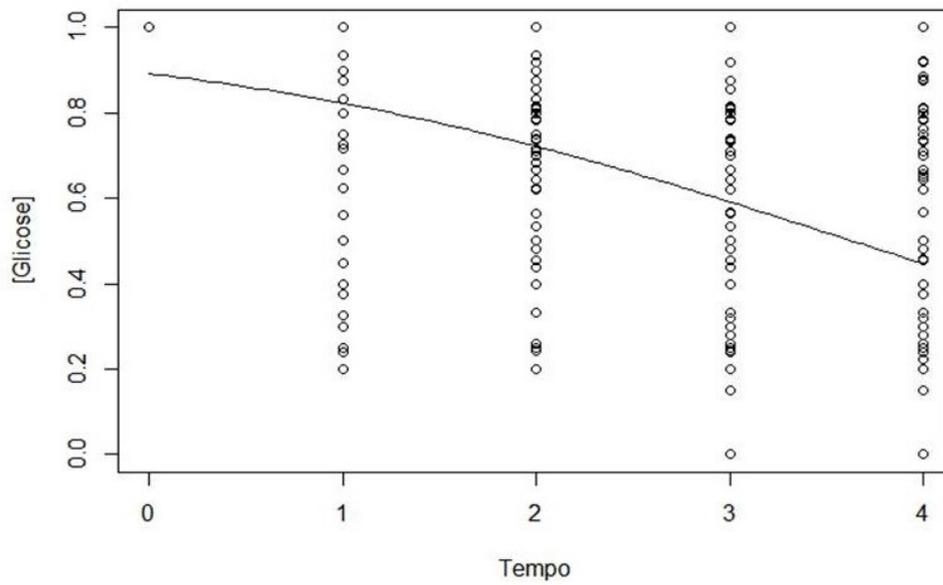


Figura 2. Capacidade de atenuação em diferentes concentrações de glicose partindo das melhores linhagens no teste de resistência ao etanol

Legenda figura 2. 1 equivale a 24 horas após a inoculação, 2 – 48h, 3 – 72h, 4 – 96h