

Multiplicação de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) cervejeiras utilizando meios de cultura a base de açúcar mascavo

BORTOLI, Daiane Aline da Silva
DOS SANTOS, Flávio;
STOCCO, Nádia Monique
ORELLI Jr., Alessandro
TOM, Ariel
NEME, Fernanda Faganello
DEFAVARI DO NASCIMENTO, Daniela

Resumo

A disponibilidade de leveduras comerciais nacionais para o setor cervejeiro ainda é muito escassa, grande parte das leveduras utilizadas durante o processo produtivo é de origem importada. Dessa forma, foi realizado um estudo para promover a multiplicação de leveduras cervejeiras, com o objetivo de manter suas características morfológicas e pureza, testando ainda o desempenho das leveduras multiplicadas na produção de cerveja. A partir de duas cepas distintas de leveduras, uma comercial e outra de reciclo, foram testados diferentes tipos de meios de cultura caseiros a base de açúcar mascavo. Após o processo de fermentação, as leveduras originadas foram submetidas à caracterização molecular, que permitiu observar a possível presença de leveduras selvagens, mesmo na linhagem comercial, uma vez que produtos de amplificação apresentaram padrões diferentes após multiplicação celular e produção das cervejas. Após a fermentação, as amostras foram avaliadas através de análises químicas (teor alcoólico e de Diacetil) e sensorial para verificar a aceitação do produto. O crescimento celular em diferentes meios de culturas permitiu avaliar a viabilidade econômica e a relação custo-benefício dos meios de cultura empregados. Dentre as quatro formulações de meios de cultura testadas, a formulação que resultou em maior rendimento celular foi a de maior custo, porém, visando economizar durante o processo de multiplicação, o meio de cultura constituído apenas de açúcar mascavo pode ser considerado o mais viável, embora seja necessário aumentar a escala de produção para obter equivalente quantidade de massa celular. Para manter a pureza da cultura, antes de iniciar a multiplicação, é essencial isolar a cepa em meios de cultura específicos. Entretanto, para que a multiplicação seja certificada torna-se essencial a caracterização molecular antes e após a multiplicação para garantia de obtenção de culturas puras.

Palavras-chave: Leveduras; Meios de Cultura; Multiplicação.

Abstract

The availability of commercial yeast for the national beer industry is still very scarce, most of the yeast used in the production process is of imported origin. Thus, a study was conducted to promote the

multiplication of brewing yeasts, with the goal of maintaining their morphological characteristics and purity, further testing the performance of multiplied yeast for brewing. From two distinct strains of yeasts, and other recycled were tested various types of home culture media based of brown sugar. After the fermentation process, the yeast derived underwent molecular characterization, which allowed observing the possible presence of wild yeasts, even at commercial line, since amplification products showed different patterns after cell multiplication and production of beers. After fermentation, the samples were evaluated by chemical (alcoholic and Diacetyl) and sensorial analysis to verify the acceptance of the product. Cell growth in different culture media allowed to evaluate the economic feasibility and cost-benefit of culture media employed. Among the four culture media formulations tested, the composition that resulted in the highest cell yield was the one of the highest cost, however, in order to save money during the multiplication process, the culture medium consisting of brown sugar is the most viable although it is necessary to increase the scale of production to obtain equivalent amount of cell mass. To maintain the purity of the culture before starting the multiplication, it is essential to isolate the specific strain in culture media. However, for the multiplication, to be certified, is essential molecular characterization before and after multiplication to guarantee obtaining pure cultures.

Keywords: Yeast, Culture Medium; Multiplication.

Resumen

La disponibilidad de levadura nacional comercial para la industria de la cerveza es todavía muy escasa, la mayor parte de la levadura usada en el proceso de producción es de origen importado. Por lo tanto, se realizó un estudio para promover la multiplicación de la levadura, con el objetivo de mantener sus características morfológicas y de la pureza, además probar el rendimiento de la levadura multiplicado para elaborar cerveza. A partir de dos cepas distintas de levaduras, y otro de recicló se probaron varios tipos de medios caseros de cultivo a base de azúcar moreno. Después del proceso de fermentación, la levadura derivada fue sometida a la caracterización molecular, que permitió observar la posible presencia de levaduras silvestres, incluso en la línea comercial, ya que los productos de amplificación mostraron diferentes patrones después de la multiplicación celular y la producción de cervezas. Después de la fermentación, las muestras se evaluaron mediante análisis químico (alcohólica y diacetilo) y sensorial para verificar la aceptación del producto. El crecimiento celular en diferentes medios de cultivo permitió evaluar la viabilidad económica y la rentabilidad de los medios de cultivo empleados. Entre los cuatro medios de cultivo de las formulaciones ensayadas, la composición que dio como resultado el mayor rendimiento fue la de mayor costo, sin embargo, con el fin de ahorrar durante el proceso de multiplicación, el medio de cultivo compuesto de azúcar moreno sólo puede ser la más viable, aunque es necesario aumentar la escala de producción para obtener una cantidad equivalente de la masa de células. Para mantener la pureza del cultivo antes de iniciar la multiplicación, es esencial aislar la cepa en medios de cultivo específicos. Sin embargo, para la multiplicación a ser certificado, es esencial caracterización molecular antes y después de la multiplicación, para garantizar la obtención de cultivos puros.

Palabras-clave: Levaduras, medios de cultivo, multiplicación.

INTRODUÇÃO

Atualmente as leveduras tem grande importância na indústria em vários seguimentos, dentre eles a produção de cervejas. Muitos autores citam que as leveduras dão às cervejas sabor, aromas e textura. É o agente biológico que transforma o mosto cervejeiro em produto final. Para cada tipo de cerveja como as Belgas, Inglesas e outras, são selecionadas determinadas cepas de leveduras. Como a maioria desse material não é produzida no Brasil, o custo de aquisição acaba sendo elevado. Visando redução de custos, esse trabalho teve como objetivo avaliar diferentes meios de cultura a base de açúcar mascavo, para multiplicação de leveduras cervejeiras do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, multiplicando uma cepa comercial (T58) do laboratório *Fermentis*, e outra cepa (Nottingham) de reciclo obtida de uma dorna de fermentação.

REVISÃO DE LITERATURA

As necessidades nutricionais dos microrganismos são basicamente iguais às de todos os seres vivos, que, para renovar seu protoplasma e exercer suas atividades, exigem fontes de energia e de materiais plásticos. (ALTERTHUM, 2001).

O meio de cultura é caracterizado como um conjunto de nutrientes necessários para suprir os microrganismos durante sua fase de multiplicação, manutenção ou transporte (CARVALHAL, 2001).

A composição de um meio adequado se dá através do conhecimento fisiológico dos microrganismos em estudo. Basicamente, existem dois grandes grupos de meios de cultura: os sintéticos e os complexos. Os sintéticos possuem sua composição qualitativa e quantitativamente conhecida (ALTERTHUM, 2001). Já os meios mais complexos, empregados na maioria dos processos fermentativos em grande escala, como o caldo de cana-de-açúcar, melaços, farinhas diversas, água de maceração do milho, entre outros, apresentam sua composição química desconhecida, podendo-se conhecer apenas os teores de açúcares disponíveis, nitrogênio, fósforo, não se conhecem os teores de sais minerais, devido ao fato de serem meios com grande número de constituintes (SCHMIDELL, 2007).

A avaliação do crescimento de microrganismos pode ser realizada pelo aumento da massa celular ou pelo número de células, e é resultado de um conjunto de eventos altamente coordenados e enzimaticamente catalisados (MORAES, 2007) e pode ser determinada de diversas maneiras, como determinação da massa de matéria seca ou úmida; determinação química de componentes celulares, e através de turbidimetria (ALTERTHUM, 2001).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura de grande importância econômica para as áreas de panificação, cervejaria e de produção de etanol (CARVALHO *et al.*, 2006). Cepas desta

espécie são usadas em processos fermentativos para produção de bebidas alcoólicas. Em meio oxigenado, as leveduras convertem os açúcares em dióxido de carbono, gerando as “bolhas de ar” no pão.

A cerveja é uma bebida basicamente feita através de malte fermentado pela ação de leveduras. A fermentação tem a função de transformar carboidratos em etanol. Os grãos de cevada utilizados têm na sua composição amido, um carboidrato que as leveduras fermentadoras não conseguem hidrolisar. Estes grãos são colocados para germinar e, nesse processo, produz enzimas α -amilase e β -amilase. A α -amilase liquefaz o amido e a β -amilase estimula a formação de açúcares (Jay, 2005). Ainda de acordo com este autor, as leveduras de alta fermentação resultam uma cerveja tipo Ale de pH aproximadamente 3,8, enquanto leveduras de baixa fermentação proporcionam uma cerveja tipo Lager com pH entre 4,1 e 4,2.

Tradicionalmente, na fabricação de cervejas, utiliza-se água, malte, lúpulo (*Humulus lupulus*) e levedura. Em muitos processos utilizam-se também adjuntos (LEWIS & YOUNG, 2002), embora a antiga lei de pureza da cerveja (Reinheitsgetbot) publicada em 1516, na Bavária (Alemanha), estabeleça que essa bebida deva ser produzida exclusivamente com malte, lúpulo e água (VENTURINI & CEREDA, 2008).

Adjuntos são considerados qualquer produto ou material que forneça carboidratos para o mosto cervejeiro desde que seja permitido por lei. Os mais usados são centeio, aveia, batata e mandioca. Mas pode-se usar também: milho, arroz, cevada, trigo, sorgo, açúcar cristal, xarope ou melado de cana-de-açúcar. A vantagem do uso de adjuntos é principalmente econômica, embora melhore a qualidade físico-química e sensorial da cerveja acabada. Cervejas que utilizam adjuntos em sua composição são mais leves e refrescantes, normalmente apresentam cor mais clara e maior brilho (VENTURINI & CEREDA, 2008).

O processo de produção de cerveja pode ser dividido basicamente em seis etapas: moagem do malte; mosturação ou brassagem; filtração; fervura; fermentação e maturação. Detalhes sobre estas etapas podem ser encontradas em artigo de Revisão de Literatura sobre o tema (Bortoli *et al.*, 2013).

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho de pesquisa utilizou leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* comerciais (T-58) e leveduras de reciclo (Nottingham), fornecidas, respectivamente, pelo Comerciante Afonso Landini, da “Turma da Cerveja – Cerva Paulista” e pelo professor Alessandro Antonio Orelli Júnior. Estas leveduras foram submetidas à multiplicação em meios de cultura caseiros a base de açúcar mascavo.

Para estabelecimento das culturas, foi necessário o preparo de um meio de cultura para ativação das leveduras. Nesse caso foi utilizado o meio YEP (2% extrato de levedura; 4%

peptona e 4% glicose, pH=5) e após essa etapa utilizou-se quatro diferentes formulações de Meios de cultura caseiros para a multiplicação das leveduras. O crescimento nos meios caseiros foi realizado em três etapas, apenas aumentando o volume de meio conforme as leveduras foram se multiplicando.

Na primeira fase do crescimento o volume de meio utilizado foi 60 mL, na segunda 220 mL e na terceira 1020 mL, para cada tipo de meio.

As formulações dos meios de cultura caseiros foram identificadas como A, B, C e D, de acordo com sua composição final. Meio A: solução de açúcar mascavo 4%; Meio B: solução de açúcar mascavo 4% e Extrato de Levedura 0,1%; Meio C: solução de açúcar mascavo 4% e Peptona 0,1%; Meio D: solução de açúcar mascavo 4%, Extrato de Levedura 0,1% e Peptona 0,1%.

Todos os meios tiveram seu pH ajustado para 5 e foram submetidos à análise de Brix em refratômetro de bancada e posteriormente esterilizados em autoclave por 15 minutos, a 1 atm e temperatura de 121°C.

Inoculação das leveduras

Para a ativação das leveduras utilizou-se fluxo laminar limpo e estéril, onde com a alça de platina foi retirada uma alíquota da amostra de levedura da placa de petri e mergulhada no meio YEP. Após a inoculação, o erlenmeyer foi colocado em mesa agitadora a 150 rpm, 28°C, por 24 horas.

Passadas 24 horas, as leveduras foram retiradas da mesa agitadora e, novamente no fluxo, removeu-se 1 mL da cultura ativada e transferiu-se para o meio de cultura da primeira fase, esse procedimento foi realizado para os quatro tipos de meio de cultura caseiros (A, B, C e D). Eles foram levados novamente para a mesa agitadora a 175 rpm, 28°C, por 24 horas.

Após o crescimento da primeira fase retirou-se os erlenmeyers da agitação e, no fluxo laminar, foram separados alíquotas de: 2 mL para leitura de Densidade Ótica; outra alíquota de 10 mL para a leitura de pH, Brix e análise de células vivas em câmara de Neubauer (esta com diluição de 10:1); e o restante de cultura da primeira fase (~48mL) foi transferido para o meio de cultura da segunda fase de crescimento. Esse procedimento foi realizado para os quatro meios de cultura (A, B, C e D). Após inoculação foram mantidos em mesa agitadora por 24 horas a 175 rpm e 28°C.

Terminado o crescimento da segunda fase, retiraram-se os meios da agitação e, em fluxo laminar, foram retiradas alíquotas para análise de Densidade Ótica (2mL), leituras de pH e Brix e contagem de células vivas em câmara de Neubauer (10mL). O restante da cultura (~256mL) foi transferido para o meio da terceira fase de crescimento. Novamente, esse procedimento foi

realizado para os quatro tipos de meios de cultura caseiros. Os erlenmeyers foram então levados para agitação por mais 24 horas, a 175 rpm, 28°C.

Com o crescimento da terceira etapa finalizado, retirou-se os meios da mesa agitadora e as alíquotas para análise de Brix, pH e leitura de Densidade Óptica foram coletadas. O meio restante foi dividido em tubos de fundo cônico tipo falcon de 50 ml, previamente pesados e identificados pelo tipo de meio e submetidos à centrifugação.

A leitura da Densidade Óptica (OD) a 600nm foi feita, em triplicata, em espectrofotômetro da marca Eppendorf. O material coletado foi centrifugado por 10 minutos e rotação de 3000 rpm. Após a centrifugação, em câmara de fluxo laminar, foi descartado o sobrenadante (parte líquida) e os tubos foram pesados em balança analítica, anotando-se os valores da massa de fermento precipitado no fundo do tubo.

Contagem de células viáveis

A contagem de células foi realizada em microscópio óptico com objetiva de 40X, em câmara de Neubauer. Adicionou-se 1 mL de corante azul de metileno com citrato de sódio em 1 mL da amostra já diluída 1:10. Deixou-se o corante agir por 5 minutos e contaram-se as células não coradas para determinar o número de células viáveis por mL. Para determinar a viabilidade, as células coradas (mortas) e as não coradas foram contadas e anotadas.

Amostras das cepas T58 e da levedura de reciclo (Nottingham), ativadas em meio YEP, antes de passar para a primeira fase de crescimento, foram analisadas através de contagem para determinar o número de células iniciais. Foi Inoculado 1 mL dessa suspensão ativada em cada um dos meios A, B, C e D. E em cada uma das fases, retirava-se uma alíquota para fazer a contagem de células viáveis.

Produção das cervejas

Para preparar o mosto foram utilizados 50 litros de água, 17 quilos de malte de diferentes tipos: 5 Kg de malte *pilsen*, 10,5 Kg de *pale ale*, 750 g de *caramuniqué II*, 750 g de *cara-pils* e 350 g de lúpulo.

O mosto para o experimento foi feito na planta piloto da microcervejaria da Fatec Piracicaba pelo mestre cervejeiro Phillip Zanello, integrante da “Acerva Paulista”, que, muito gentilmente, cedeu cinco litros de mosto, para o teste de fermentação com as linhagens de levedura multiplicadas. A cerveja feita foi uma IPA (*Indian Pale Ale*), que se caracteriza por ser forte no teor alcoólico e amargor.

Todos os tipos de malte foram moídos juntos, em moinho de dois rolos motorizado. Após a trituração foi transferido para tina de cocção com água pré-aquecida a 65 °C, para ativação das enzimas. Essa temperatura foi mantida durante 90 minutos. Elevou-se a temperatura para 78 °C aumentando 1 °C por minuto, mantendo a 78 °C por 45 minutos. Neste momento foi retirada uma alíquota do mosto e adicionado 2 gotas de iodo. A cor roxa do iodo mudou para amarelo, com esse teste, foi possível comprovar que todo amido havia sido convertido. Em seguida, a temperatura foi elevada para 85 °C, mantendo mais 30 minutos para inativar todas as enzimas.

Terminada a mosturação, foi realizada a filtração. Para isto, o mosto foi bombeado para tina de filtração e ficou circulando até que se obtivesse um mosto livre de cascas. Concluída a filtração, a temperatura foi elevada até 100°C para fervura. Após a ebulição do mosto, adicionou-se 200 gramas de lúpulo. Decorridos 20 minutos, foi retirado 5250 mL para a fermentação em laboratório, quando se mediu o pH e o Brix.

O mosto foi dividido em 3 Erlenmeyers, previamente identificados (T1 a T3) lavados e esterilizados para que não houvesse qualquer tipo de contaminação, com capacidade de 2 litros cada, preenchendo um volume de 1750 mL. Foi inoculado 2g do fermento comercial T58 liofilizado no Erlenmeyer T1; 2 g do fermento comercial T58 previamente multiplicado em laboratório no T2; e 2 g do fermento de reciclo (Nottingham) no T3.

As amostras foram tampadas com rolha de borracha, com um furo no meio, onde foi colocada uma mangueira, tomando cuidado para não encostá-la no mosto, e a outra ponta da mangueira ficou mergulhada em uma garrafa de água, com a função de não deixar entrar ar no mosto durante a fermentação. Foram mantidas em B.O.D. a 18°C durante 2 semanas. Depois de constatado a diminuição da formação de gás carbônico, indicativo do final da fermentação, abaixou-se a temperatura para 10°C, por mais 2 semanas até completa finalização da fermentação. A cerveja foi transferida para outros recipientes com o auxílio de mangueiras sem sugar o fermento do fundo do erlenmeyer e mantida a 4°C.

Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada por integrantes da Acerva – Paulista, o método usado foi o descritivo, cada julgador analisou as características de aroma, odor, textura e cor de cada amostra codificada como T1, T2 e T3, seguindo mesma identificação do processo de fermentação.

Cada julgador preencheu um questionário (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), avaliando aparência, odor e aroma, sabor e gosto e sensação bucal. Depois, os resultados foram discutidos em uma mesa redonda e cada um contribuiu com o seu parecer.

Análises químicas

As análises de teor alcoólico e de Diacetil das amostras foram gentilmente feitas por Cromatografia gasosa CGMS da marca Agilent 7890A / 5975C, realizada no Laboratório de Açúcar e Álcool localizado no Centro de Tecnologia Canavieira-CTC pelo técnico de laboratório Marcos Rasera, através de metodologia própria e confidencial do CTC.

Análises Moleculares

O DNA genômico total foi extraído de amostras de leveduras, através do método CTAB adaptado de Doyle & Doyle (1987). Aproximadamente 1mL de solução celular de leveduras foram centrifugadas a 3000xg por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Os precipitados foram macerados em tubo *ependorf* autoclavado, juntamente com 700µL de tampão de extração sem β-mercaptoetanol (1,4M NaCl; 100mM Tris HCl pH=8; 20mM EDTA pH=8; 1% PVP; 2% CTAB) previamente aquecido (55°C). Em seguida foram agitados e mantidos por 15 minutos a 55°C, com homogeneização em intervalos de 5 minutos. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos, para posterior adição de 600µL de CIA 24:1 (24v clorofórmio : 1v álcool isoamílico). A homogeneização foi feita por inversão dos tubos (25 vezes) até a formação de uma emulsão, antes da centrifugação (18.000xg), à temperatura ambiente, por 7 minutos.

A fase aquosa (superior) foi transferida para tubo novo. A esse, adicionou-se 200µL de tampão de extração sem β-mercaptoetanol, e 600µL de CIA. Após a homogeneização, a amostra foi centrifugada (18.000xg), à temperatura ambiente, por 7 minutos. A fase aquosa superior foi novamente transferida para tubo novo, repetindo-se esse passo, uma segunda vez.

Após a centrifugação, a fase aquosa superior, contendo o DNA genômico, foi recuperada. A precipitação foi feita pela adição de 600µL de isopropanol, seguida de centrifugação (18.000xg), a 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado lavado com 600µL de etanol 70%, mantido a -20° C por 20 minutos, antes da centrifugação por 15 minutos, 4° C, a 18.000xg. O precipitado, após a secagem, foi ressuscitado em 30µL de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH=7,5), contendo 10µg/mL de RNase, e mantido a 37°C por 1 hora, antes de ser armazenado a 4°C. A verificação da qualidade do DNA total e a quantificação foram realizadas por eletroforese em gel de agarose (1%). As bandas foram visualizadas através de coloração com brometo de etídeo (0,01ng/µL) sob luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989) e comparadas com padrões de peso molecular.

A reação de PCR do DNA genômico das leveduras com 4 pares de *primers* específicos para caracterização molecular de cepas (Carvalho-Netto *et al.*, 2012), foi feita para um volume final de 20µL, utilizando-se Drem Taq[®] (Fermentas), conforme recomendações do fabricante.

A amplificação do segmento de DNA a levedura foi realizada em duas etapas, devido a diferenças na temperatura de anelamento dos pares de *primers*. Para dois pares (P1 e P2) o programa utilizado no termociclador TECHNE, modelo TC-4000, foi 5 minutos iniciais a 94°C, e 45 ciclos de 45 segundos a 94°C, 40 segundos a 54°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C; mais 2 minutos a 72°C, para extensão final. Para os outros dois pares de primers (P3 e P4), mudou-se apenas a temperatura de anelamento ficando, portanto: 5 minutos iniciais a 94°C, e 45 ciclos de 45 segundos a 94°C, 40 segundos a 57°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C; mais 2 minutos a 72°C, para extensão final (Carvalho-Netto *et al.*, 2012).

O produto de PCR (10µL de cada reação) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 0,5x, submetido a corrente de 75V por 60 minutos, tendo como marcador de peso molecular 1kb DNA *Ladder* (Fermentas), todos acrescidos de tampão de amostra (*Dye* IV) (Sambrook *et al.*, 1989). As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01ng/µL) sob luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através de análise da Tabela 1, onde estão apresentadas as medições realizadas para cada parâmetro e cepas estudadas, pode-se observar que, em todas as fases, o meio D tendeu a apresentar maior consumo de açúcar pelas leveduras em relação às demais formulações de meios. Isso se explica devido à composição do meio D, que contém além da fonte de carboidrato (açúcar mascavo), o extrato de levedura e a peptona, favorecendo o crescimento e consequentemente, maior consumo de açúcar pelas leveduras.

Tabela 1: Medidas de pH, Brix e Consumo de açúcar

Meio de Cultura	Cepa 1			Cepa 2			
	pH	Brix	Açúcar Brix	pH	Brix	Açúcar Brix	
Fase de Ativação	5,07	4,60		5,00	4,80		
Fase 1	A	4,45	2,10	2,50	3,45	1,90	2,90
	B	4,50	1,90	2,70	3,50	1,00	3,80
	C	4,38	1,50	3,10	3,38	0,90	3,90
	D	4,54	1,80	2,80	3,54	0,90	3,90
Fase 2	A	4,35	3,70	0,90	4,35	3,70	1,10
	B	4,52	2,10	2,50	4,52	1,10	3,70
	C	4,55	2,50	2,10	4,55	1,00	3,80
	D	4,67	1,60	3,00	4,67	1,00	3,80
Fase 3	A	4,63	4,10	0,50	4,63	3,90	0,90
	B	4,52	1,70	2,90	4,52	1,30	3,50
	C	4,50	1,90	2,70	4,50	1,50	3,30
	D	4,50	1,10	3,50	4,50	1,00	3,80

As leituras da densidade óptica (OD) foram realizadas no comprimento de onda de 600 nm e como amostra padrão (branco) foi utilizado, 1mL de cada meio de cultura (A, B, C ou D). Foram efetuadas leituras no tempo 0, antes de iniciar a multiplicação e após 24 horas, ou seja, após multiplicação, para avaliar o crescimento celular. Através da diferença entre as leituras da densidade óptica, antes e após multiplicação, foi possível obter a taxa média de multiplicação para cada meio, em cada fase (Figura 1).

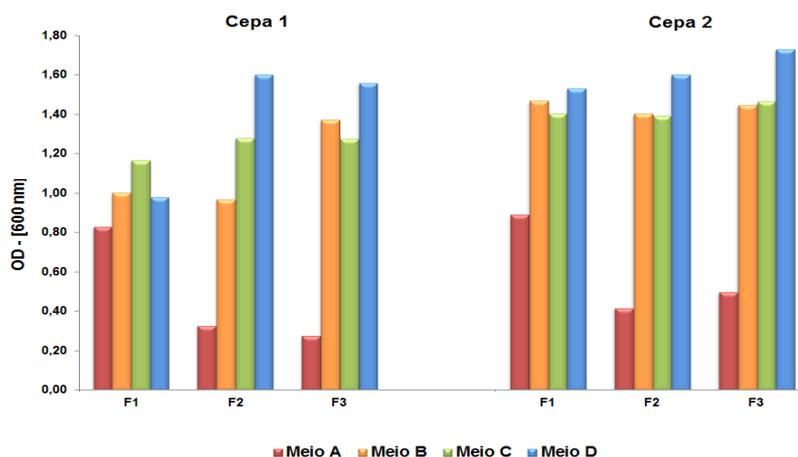


Figura 1: Leitura da densidade óptica (OD), valores médios para multiplicação.

Observa-se que a formulação do meio A, para as duas cepas, e após a fase 1 de multiplicação, promove queda de rendimento em relação aos demais meios de cultura, provavelmente, devido ao fato de sua formulação conter apenas açúcar mascavo. O açúcar mascavo possui em sua composição química, além de carboidratos, alguns sais minerais como potássio (60-400mg/100g), magnésio (35-80mg/100g), cálcio (50-350mg/100g), fósforo (30-80mg/100g), ferro (4-10mg/100g), manganês (1-5mg/100g), zinco (1-4mg/100g) e sódio (40-70mg/100g) (Natalino, 2006). Para um adequado crescimento de leveduras, além da fonte de carboidratos, é essencial, para um meio mínimo, também o suprimento de nitrogênio, fósforo e de quantidades mínimas de metais (Bergman, 2001). Como na constituição química do açúcar mascavo não se detecta nitrogênio, pode-se mencionar que nitrogênio deve ser um o principal fator limitante ao crescimento da levedura, seguido de necessidade de complementação de fósforo e de demais micronutrientes. Estes complementos se encontram na formulação do meio de cultura D, que contém peptona e extrato de levedura, suprindo as necessidades nutricionais para a multiplicação celular e promovendo, assim, na maioria das fases, rendimento celular superior para ambas as cepas.

Como parâmetro para determinar o crescimento celular, foram obtidos também os pesos em gramas de cada tubo tipo falcon de 50 mL. Para as duas cepas, observa-se que o meio de cultura D foi o que apresentou maior massa de fermento produzido durante as fases de crescimento. Os meios de cultura B e C apresentaram massa de leveduras equivalentes e o meio

de cultura A foi o que apresentou menor quantidade de massa de levedura produzida durante a multiplicação. Demonstrando coerência na comparação com os resultados obtidos das leituras de densidade óptica.

Contagem de células viáveis

A ativação da Cepa 1 (T-58) resultou em uma suspensão com 2×10^7 células. mL⁻¹, enquanto que a Cepa 2 (levedura de reciclo - Nottingham) resultou em uma suspensão com $2,64 \times 10^7$ células. mL⁻¹. A concentração comparativa de células viáveis para cada composição de meio e para cada fase de desenvolvimento pode ser observada na figura 2, para as cepas 1 (T58) e 2 (Nottingham de reciclo).

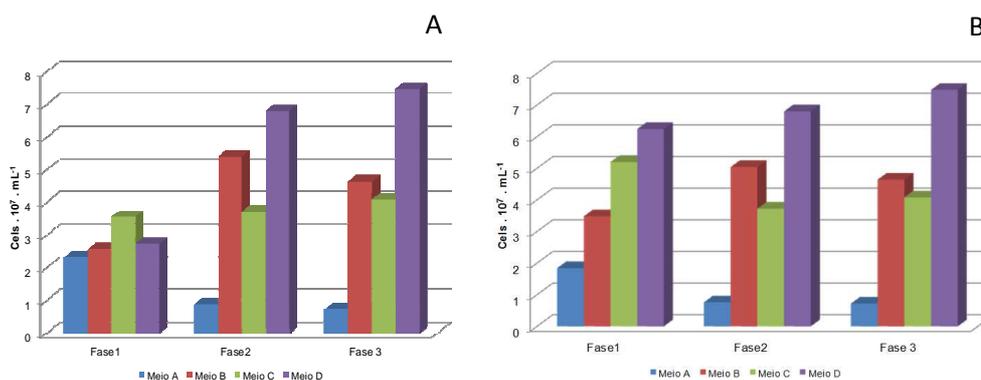


Figura 2: Concentração de células viáveis em cada meio e fase de desenvolvimento A. Células viáveis - Cepa 1 (T 58); B. Células viáveis - cepa 2 (levedura de reciclo - Nottingham).

Na fase 1 a cepa 1 teve uma quantidade menor de células viáveis, comparado com a cepa 2, para a composição do meio D como pode ser observado nas Figuras 7 e 8. Provavelmente a cepa 1 estava em uma fase de adaptação, a cepa 2 já tinha saído de um processo fermentativo, e foi repicada varias vezes em laboratório, com isso já estava ambientada ao meio de cultura.

Ambas as cepas tiveram melhor resultados no meio de cultura D, por ser um meio mais rico em nutrientes, com fonte suplementar de nitrogênio, fósforo e demais nutrientes. Já o meio A é o mais pobre em nutrientes, e não tem uma fonte de nitrogênio necessária para que as leveduras metabolizem os nutrientes e assim, se multipliquem, acumulando massa.

Análise sensorial

Os mestres-cervejeiros entrevistados durante análise sensorial chegaram à conclusão que as três amostras não diferiram visualmente entre si na cor, amarelo escuro. As amostras apresentavam um leve aroma de etanol, não sendo detectado aroma amanteigado ou rançoso (indicando presença de Diacetil), de fermento (indicativo de fermentação incompleta), nem de ácido acético (indicativo de contaminação por bactérias). As cervejas T1 (cerveja preparada com levedura T 58 comercial) e T2 (cerveja preparada com levedura T 58 multiplicada no laboratório da Fatec Piracicaba) apresentaram um aroma de lúpulo com notas frutadas. A amostra T3 (cerveja preparada com levedura de reciclo Nottingham multiplicada no laboratório da Fatec Piracicaba) não apresentou aroma de lúpulo tão acentuado como as demais, mesmo tendo sido preparada a partir do mesmo mosto cervejeiro e com a mesma receita. Foi constatada uma diferença no aroma da cerveja T3 em relação às T1 e T2. Entre a T1 e T2 não tiveram grandes diferenças de aroma, apenas da intensidade do aroma: a amostra T2 teve seu aroma atenuado.

Durabilidade do fermento em meio líquido

O fermento armazenado em meio D (açúcar mascavo + extrato de levedura + peptona), a uma temperatura de 4°C, por um período de três meses, manteve-se com bom número de células viáveis, conforme observado em exame microscópico usando azul de metileno e citrato de sódio como corantes.

Segundo Costa (1991), dos métodos de conservação, o congelamento a -180 °C, com nitrogênio líquido e glicerol 20% ou óleo mineral, é o mais empregado. Quando se deseja manter o microrganismo para uso em um período de três meses, o uso de meio líquido contendo fontes de energia para a levedura também pode ser utilizado para minimizar o estresse em relação à queda de temperatura.

Caracterização Molecular das leveduras

Pela análise de PCR do DNA genômico das leveduras, com *primers* específicos para a caracterização molecular (Carvalho-Netto *et al.*, 2012), foi possível identificar as duas cepas de leveduras testadas. Dada a diferenças de altura de bandas, em gel de agarose (Figura 3), dos produtos de reação PCR com os primers P2 e P4 pode-se claramente caracterizar os dois genótipos: T 58 (amostras 1, 2, 5 e 6) e Nottingham de reciclo (amostras 3, 4 e 7). A possível

presença de leveduras selvagens também pode ser observada ao analisar os produtos de PCR da amostra 5 (T 58 comercial) com os primers P1 e P4 (Figura 3), pois os produtos de amplificação resultantes apresentam padrões diferentes após crescimento celular e produção das cervejas, apresentam bandas adicionais (Figura 3). Sabe-se, através de indicação nas próprias embalagens comerciais de leveduras, que estas não são puras, podendo ter a presença de até 10% de leveduras selvagens. De posse dos resultados, há indícios de que as leveduras contaminantes levam vantagens durante a multiplicação nos meios de cultura e por este motivo, após etapa de crescimento, a presença de outro genótipo (devido à presença de banda adicional) pode ser detectada.

Para se obter um fermento puro a ser comercializado, garantindo 100% de qualidade, faz-se necessário, antes de iniciar o processo de multiplicação da levedura, purificar a amostra original (comercial) em placa de petri, com meio seletivo, isolar uma colônia, fazer seu crescimento em meio líquido e realizar a genotipagem da cepa, garantindo que não haja presença de outras espécies contaminantes. Só a partir de a caracterização iniciar o processo de multiplicação, tomando todo cuidado necessário de esterilização para evitar contaminações.

A técnica de PCR é a mais empregada por requerer uma pequena quantidade de DNA que revela um grande número de marcas polifórmicas, é rápido e automatizado. Dentre as literaturas estudadas, não encontramos muitos trabalhos sobre este tipo específico de levedura cervejeira, mas sim, para leveduras utilizadas na produção de etanol de segunda geração e para a área de ciências dos alimentos.

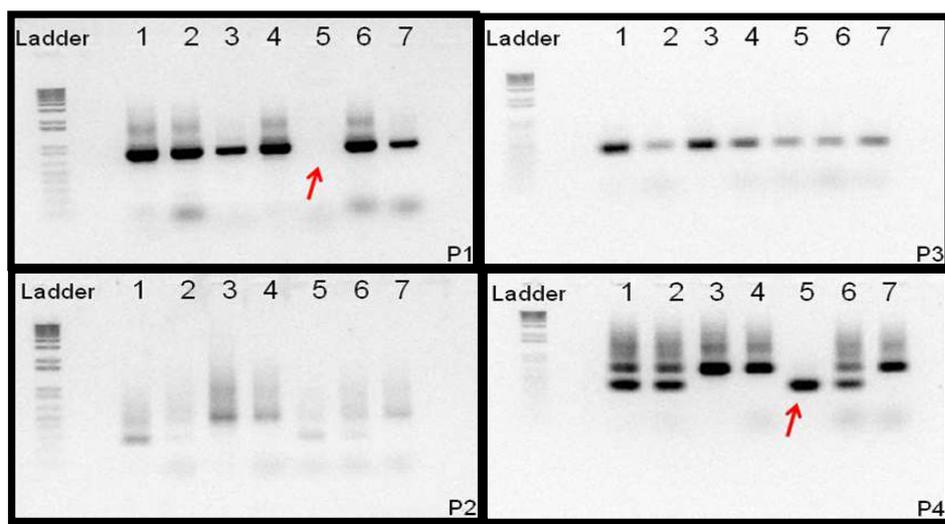


Figura 3: Caracterização molecular das leveduras. Produto de PCR de cada primer (P1 a P4) para cada amostra de DNA: 1- Levedura T 58 multiplicada em meio de cultura YEP; 2- Levedura T 58 multiplicada em meio de cultura caseiro A (açúcar mascavo); 3- Levedura de reciclo (Nottingham) multiplicada em meio de cultura YEP; 4- Levedura de reciclo (Nottingham) multiplicada em meio de cultura caseiro A (açúcar mascavo); 5- Levedura T 58 (comercial) após produção da cerveja; 6- Levedura T 58 (multiplicada em laboratório) após produção da cerveja; 7- Levedura de reciclo (Nottingham), multiplicada em laboratório, após produção da cerveja.

Teor alcoólico das cervejas produzidas

Para a fermentação a partir do fermento puro comercial T58, cerveja T1, foi obtido 6,037 °GL. Já para a cerveja T2, que foi fermentada a partir do fermento T58 multiplicado em laboratório, foi obtido 5,847 °GL e para a fermentação a partir do fermento de reciclo (Nottingham) (cerveja T3), obteve-se 5,798 °GL. Em comparação com as cervejas nacionais do tipo *Pilsen*, as amostras apresentam um teor alcoólico mais elevado, sendo que a cerveja da marca *Antarctica* apresenta 5 °GL e a marca *Skol*, 4,7 °GL (FARIA, 2012).

De acordo com Oliveira, 2009, as cervejas produzidas (T1, T2 e T3) são consideradas de elevado teor alcoólico, já que estão entre 4,5 e 7 °GL. Para cervejas com teor alcoólico médio e baixo, os valores ficam respectivamente, entre, 2 a 4,5 °GL e 0,5 a 2 °GL.

Concentração de Diacetil nas cervejas produzidas

A eliminação do Diacetil se deu através do repouso do material fermentado por um período de três semanas, sob refrigeração constante, a 10°C. A partir disso, a amostra B não acusou a presença de Diacetil, já a amostra C apresentou 0,87 mg/L e a amostra A, apresentou o maior teor de Diacetil com 1,46 mg/L. De acordo com Carvalho (2007), o Diacetil é o composto chave na determinação das características organolépticas do produto final, podendo variar de 0,12 a 0,15 mg/L. Acima disso, pode promover um sabor de manteiga na cerveja. Embora algumas amostras avaliadas tenham apresentado teor de Diacetil bem acima do recomendado, em análise sensorial, a presença deste composto não foi suficiente para alterar as propriedades organolépticas das cervejas produzidas, ao menos para o paladar de cervejeiros artesanais e demais apreciadores de cerveja, uma vez que os avaliadores não notaram sabor amanteigado ou rançoso nas amostras.

Viabilidade econômica

A partir do custo dos reagentes e de posse das proporções necessárias de cada um para preparado das formulações foi calculado o custo de produção de cada meio de cultura para as três fases de crescimento. Considerando-se a massa celular obtida do cultivo em cada meio de cultura, foi possível inferir o custo de produção de cada grama de levedura e identificar qual meio seria mais viável economicamente para multiplicação das leveduras cervejeiras. O Meio A, somente com açúcar mascavo, foi o meio que apresentou o menor custo por grama de levedura produzida (R\$0,01/g), apesar de ser o meio que apresentou o menor crescimento de células. Isso ocorreu devido à composição do meio de cultura não ser completo para suprir todas as necessidades exigidas durante o desenvolvimento das leveduras. O Meio D apresentou o maior crescimento de leveduras, porém é o meio mais caro (R\$0,08/g) devido ao custo dos reagentes de sua composição. Para multiplicação de leveduras com menores custos, o meio A seria o mais indicado, pois apesar de ter pouco rendimento em relação à produção de leveduras, pode-se aumentar a escala de produção para obter a quantidade de fermento desejado, sendo possível ainda, em trabalhos futuros, testar fontes alternativas, economicamente mais viáveis de nitrogênio e fósforo para enriquecimento do açúcar mascavo, visando maiores rendimentos na multiplicação celular.

CONCLUSÕES

Meios de cultura caseiros, à base de açúcar mascavo, são viáveis para a multiplicação de leveduras cervejeiras, mas possuem dependência suplementar de alguma fonte de nitrogênio e outros nutrientes.

Dependendo das condições ambientais, as leveduras contaminantes se desenvolvem em maior ou menor proporção, alterando características das cervejas produzidas;

É essencial purificar e caracterizar as leveduras comerciais antes de fazer a multiplicação em laboratório, para evitar crescimento elevado de cepas selvagens, presentes nas cepas comercializadas.

REFERÊNCIAS

ALTERTHUM, F. Elementos de microbiologia. In: *Biotecnologia Industrial-Fundamentos*. V. 1, São Paulo, Editora Edgard Blucher LTDA, 2001. Cap. 1, p. 1-32.

bioenergia em revista: diálogos, ano 3, n. 2, p. 50-68, jul./dez. 2013.

BORTOLI, Daiane Aline da Silva; SANTOS, Flávio dos; STOCCO, Nádia Monique; ORELLI Jr., Alessandro; TOM, Ariel; NEME, Fernanda Faganello; NASCIMENTO, Daniela Defavari do
Multiplicação de leveduras (Saccharomyces cerevisiae) cervejeiras utilizando meios de cultura a base de açúcar mascavo

BERGMAN, L. W. Growth and Maintenance of Yeast. In: MACDONALD, P.N. *Methods in Molecular Biology*, v.177, p.9-14. Doi: 10.1385/1-59259-210-4:009. 2001

BORTOLI, D. A. S; DOS SANTOS, F.; STOCCO, N.M.; ORELLI JR, A.; TON, A.; NEME, F.F.; DEFAVARI DO NASCIMENTO, D. Leveduras e produção de cervejas – Revisão. *Bioenergia em Revista: Diálogos*, v. 3, n.1, p. 45-58, 2013.

CARVALHO-NETTO, O.V.; *et. al.* High specificity PCR-based molecular markers for the efficient monitoring of yeast cell populations during bioethanol production. London: *Biotechnology for Biofuels*, (submitted on 05/2012).

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1ª parte- As leveduras. *Revista Analítica*. São Paulo, 2006.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: *Biociencia Industrial-Engenharia Bioquímica*. V. 2, São Paulo, Editora Edgard Blucher LTDA, 2007. Cap. 9, p. 193-204.

CARVALHAL, M. L. C. Técnicas básicas em microbiologia. In: *Biociencia Industrial-Fundamentos*. V. 1, São Paulo, Editora Edgard Blucher LTDA, Cap. 2, p. 32-61, 2001.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. *Preservação de microrganismos*. São Paulo. P. 263-268,1991.

FARIA, A. Teor alcoólico. *Geocities*. São Paulo. Disponível em:
<http://www.geocities.ws/emverdade/pesquisasbiblicas/bebidas/teor-alcoolico.html>. Acesso em: 02.05.12.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). *Métodos físicos – químicos para análise de alimentos*. (coord.) ZENEBON, O *et al*; São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JAY, J. M. *Microbiologia dos alimentos*. Trad. Eduardo Cesar Tondo *et al.* 6. Ed. Porto Alegre. Artmed, 2005. Cap. 8; 10, p. 169-170.

LEWIS, M.; YOUNG, T. W. *Brewing*. 2. ed. New York. Ed. KA/PP, 2002. cap. 1, p 4.

MORAES, I. de O. Produção de microrganismo. In: *Biociencia Industrial*, Processos fermentativos e enzimáticos. V. 3, São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2007. Cap. 9, p. 199-214.

NATALINO, R. *Caracterização de açúcar mascavo aplicando análise de componentes principais a dados espectrométricos*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2006.

bioenergia em revista: diálogos, ano 3, n. 2, p. 50-68, jul./dez. 2013.

BORTOLI, Daiane Aline da Silva; SANTOS, Flávio dos; STOCCO, Nádia Monique; ORELLI Jr., Alessandro; TOM, Ariel; NEME, Fernanda Faganello; NASCIMENTO, Daniela Defavari do
Multiplicação de leveduras (Saccharomyces cerevisiae) cervejeiras utilizando meios de cultura a base de açúcar mascavo

OLIVEIRA, M. A. B. de. *Cerveja: Análise Sensorial e Fabricação*. Espírito Santo: Noryam, 2009. Cap. 5, p. 42.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para a utilização industrial. In: *Biotecnologia Industrial-Engenharia Bioquímica*. V. 2, São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2007. Cap. 2, p. 5-18.

VENTURINI, W. G. F.; CEREDA, M. P. W. Cerveja. In: *Biotecnologia Industrial-Biotecnologia na produção de alimentos*. V. 4, São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2008. Cap. 4, p. 91-144.

- 1 Daiane A. da S. BORTOLI é Tecnóloga em Biocombustíveis pela FATEC Piracicaba.
- 2 Flávio dos SANTOS é Tecnólogo em Biocombustíveis pela FATEC Piracicaba.
- 3 Nádia M. STOCCO Possui graduação em Tecnologia em Biocombustíveis - Fatec Piracicaba (2012). Tem experiência nos laboratórios de Biotecnologia, Microbiologia e Química.
- 4 Alessandro A. ORELLI Jr. possui graduação em Engenharia Agrônoma pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP (1985). Atualmente é professor de graduação da FATEC-Piracicaba, da FATEP e professor do MBA do Instituto de Aperfeiçoamento Tecnológico - IAT., atuando principalmente nos seguintes segmentos: cervejaria, cana-de-açúcar, etanol, fermentação, destilação, usinas e destilarias.
- 5 Ariel TON possui graduação em Tecnologia em Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia de Piracicaba (FATEC) (2011), curso-técnico-profissionalizante pela Escola SENAI "MÁRIO DEDINI" - Piracicaba (2006) e curso-técnico-profissionalizante pela ETEC Cel. "FERNANDO FEBELIANO DA COSTA" - Piracicaba (2004).
- 6 Fernanda F. NEME é Graduada pela Faculdade de Tecnologia de Piracicaba - FATEC, no curso de Biocombustíveis. Tem conhecimento na área de Microbiologia, com ênfase em biologia molecular, produção de bebidas fermentadas e destiladas. Experiente em análises físico-químicas em açúcar, álcool e biodiesel, calibração em Infra Vermelho Próximo (NIR) para elaboração de equações, análises de componentes inorgânicos por espectrometria de absorção atômica e preparação de amostras de açúcar, álcool e caldo de cana para ensaios de proficiência.
- 7 Daniela Defavari do NASCIMENTO possui graduação em Engenharia Agrônoma pela Universidade de São Paulo (1997), graduação em Licenciatura Em Ciências Agrárias pela ESALQ/USP (1998), mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela ESALQ/USP (2000) e doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela ESALQ/USP (2005). Especialista (MBA) em Agronegócios pelo PECEGE/ESALQ/USP (2012). Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em Bioquímica e Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: cultura de tecidos, micropropagação de plantas, clonagem gênica, transformação genética de plantas (Tabaco, Arabidopsis, Eucalipto e cana-de-açúcar), análises moleculares, DNA e RNA. Desde 2010 é professora nas disciplinas: Biotecnologia do curso de Graduação em Biocombustíveis, Biologia Celular e Bioquímica Aplicada à Agroindústria do curso de Graduação em Agroindústrias todos da FATEC Piracicaba.