

PIRAINE; Renan Eugênio Araujo¹, BOCHMAN; Matthew L.²

RESUMO

1. INTRODUÇÃO

O mercado cervejeiro atual demanda cada vez mais novos produtos e tecnologias. Cervejas produzidas com ingredientes locais, novos sabores, de baixa caloria e com baixo ou nenhum teor de álcool são uma tendência do mercado. Restringir a diversidade microbiana a apenas *Saccharomyces cerevisiae* na produção de cerveja limita as características sensoriais e reduz a complexidade do produto final (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014). Este fato pode ser contornado pela aplicação de diferentes cepas de leveduras e bactérias comercialmente disponíveis, ou então presentes em diferentes ambientes tais como na superfície de frutas ou no interior de barris de maturação (DE ROOS; VAN DER VEKEN; DE VUYST, 2019; SPITAEELS et al., 2014). Assim, produtores em larga-escala têm buscado a utilização de leveduras não-convencionais como alternativas para obter novos sabores, texturas, acidez, controle de contaminação, entre outras características (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

A bioprospecção de novas leveduras depende principalmente de características como a tolerância ao etanol, consumo de diferentes açúcares (ex: maltose, frutose, maltotriose), atenuação, sobrevivência em meios com pH ácido, entre outros (OSBURN; AHMAD; BOCHMAN, 2016). Microrganismos podem ser isolados a partir de sua forma selvagem e aplicados na fermentação alcoólica, dependendo apenas da sua domesticação, como ocorrido com *S. cerevisiae* há milhares de anos (LEE et al., 2011; STEENSELS et al., 2019). Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar o potencial para fermentação de cerveja do isolado da levedura selvagem *Moniliella megachiliensis*.

2. METODOLOGIA

2.1. Isolamento e identificação das leveduras selvagens

Quinze amostras compreendendo solo, raízes, cascas de árvores, folhas e flores foram coletadas no Olympic National Park (Port Angeles, Washington, US) em Agosto de 2019. Uma parte de cada amostra foi extraída e inoculada em meio YPM8E5 (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 80 g/L maltose, 5% etanol (v/v), 50 g/mL kanamycin, 50 g/mL chloramphenicol). As amostras foram incubadas sob agitação durante 72 h a 30 °C. Foram utilizados 10 uL de cada amostra para o isolamento em meio Wallerstein Laboratory Nutrient agar (WLN), sendo as placas incubadas sobre as mesmas condições anteriores.

A partir do cultivo de cada isolado em meio YPD líquido, 200 uL foram utilizados para extração do DNA genômico. Foi utilizado 0,5 uL de gDNA como template para a reação de PCR com os primers NL1 (5' - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5' - GGTCCGTGTTTCAAGAC GG - 3') para o domínio variável (D1/D2) de 26S rDNA, o qual resulta na amplificação de um fragmento de em torno 600 bp. Os fragmentos amplificados foram purificados, quantificados e submetidos ao sequenciamento pela empresa ACGT, Inc (Wheeling, IL). O resultado do sequenciamento foi analisado e comparado quanto a homologia de sequências do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando

¹ Biotecnologista e Doutorando em Biotecnologia na Universidade Federal de Pelotas, renanbiotec@gmail.com

² Biologista Molecular pelo Juniata College (EUA) - Professor na Graduação e Pós-Graduação da Indiana University (EUA), bochman@indiana.edu

2.2. Análise filogenética

O sequenciamento de cada uma das sequências amplificadas do domínio D1/D2 do gene 26S rDNA foi utilizado para a análise das relações filogenéticas entre as leveduras selvagens, utilizando o software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) v. 10.1.7 (<https://www.megasoftware.net/>) para o alinhamento, construção e visualização da árvore filogenética. O alinhamento das sequências foi realizado com o uso da ferramenta ClustalW, e a árvore filogenética usando o método Bootstrap com 1000 replicações, a partir do método estatístico Neighbor-joining.

2.3. Testes de fermentação

As leveduras isoladas *Yamadazyma scolyti*, *Debaryomyces hansenii*, *Starmerella riidocensis* e *Moniliella megachiliensis* foram cultivadas em dois tubos até a obtenção de aproximadamente 1×10^9 cells/mL. Um dos tubos foi utilizado para testar a fermentação de 400 mL de extrato de malte 100% Pilsner, densidade 1.040 g/cm^3 e pH 5.4, enquanto o segundo tubo foi utilizado para testar a fermentação de 400 mL de mosto de cerveja IPA (India Pale Ale), 1.049 g/cm^3 , pH 5.5, 80 IBU, produzido e fornecido pela cervejaria Upland Brewery Company (Bloomington, Indiana, US). Os frascos foram mantidos sem agitação, com air-lock para saída do CO_2 originado da fermentação, durante 14 dias a aproximadamente 23°C .

2.4. Avaliação das características importantes de *Moniliella megachiliensis* para fermentação de cerveja

Os testes para caracterização da levedura *Moniliella megachiliensis* isolado ONP131 foram realizados em placas de 96-well, em triplicata, em três independentes experimentos. Para cada well, 100 μL da diluição em D.O.660nm 0.06 de *Moniliella megachiliensis* ou *Saccharomyces cerevisiae* WLP001 (White Labs, San Diego, CA) foi misturado com 100 μL do meio em teste, na concentração de 2x, e sobreposto com óleo mineral para evitar a evaporação. A curva de crescimento foi acompanhada durante 48 h a 30°C , através de leituras da densidade óptica a cada 15 min no Synergy H1 Plate Reader (Biotek, Winooski, VT) com o Gen5 Microplate Reader and Imager Software (Biotek, Winooski, VT).

O consumo de diferentes carboidratos foi testado a partir das concentrações de 2% glucose (p/v), 2% maltose (p/v) e 2% sucrose (p/v), enquanto a tolerância ao estresse osmótico foi avaliado utilizando-se as concentrações de 10%, 20% e 30% de glucose (p/v), e 5%, 10%, 20% e 30% de maltose (p/v). Todas as condições anteriores foram analisadas com YP como base para formulação do meio. Ainda, a tolerância a salinidade no meio foi testada utilizando YPD + 0.5%, 1%, 5% e 10% (p/v) de NaCl. A capacidade das leveduras suportarem etanol foi avaliada a partir das concentrações de 2%, 4%, 5%, 6%, 8%, 10% e 15% (v/v) de etanol adicionado no meio YPD. Como controle, foi realizado o teste utilizando apenas YPD para avaliação da curva de crescimento das cepas.

A capacidade de crescimento em diferentes pHs foi avaliada a partir da incubação de *M. megachiliensis* em meios YPD de pHs ácidos 2.5, 3.0, 3.5, 5.0 e pH básico de 8.0, ajustados com HCl 1M e NaOH 2M. Ainda, houve a avaliação de capacidade de crescimento nos mesmos pHs com ajuste sendo realizado com Ácido Lático 85%. A

¹ Biotecnologista e Doutorando em Biotecnologia na Universidade Federal de Pelotas, renanbiotec@gmail.com

² Biologista Molecular pelo Juniata College (EUA) - Professor na Graduação e Pós-Graduação da Indiana University (EUA), bochman@indiana.edu

habilidade de tolerar diferentes concentrações de α -acids and β -acids – compostos presentes no lúpulo e que possuem atividade antimicrobiana - foi avaliada a partir do uso das concentrações de 10 ppm até 200 ppm de isomerized hop extract 30% (Hopsteiner, Mainburg, Germany) e 100 ppm a 200 ppm de Beta Bio 45% (Hopsteiner, Mainburg, Germany). Por fim, a curva de crescimento durante a incubação a 37 °C também foi avaliada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de PCR foi capaz de amplificar um fragmento de 597 pb correspondendo ao basidiomiceto *M. megachiliensis* em duas amostras do Olympic National Park. Essas leveduras formaram colônias com margens filamentosas, células com aproximadamente duas vezes o tamanho de *S. cerevisiae* WLP001 e que geralmente estão dispostas em agregados celulares. Ainda, após 72 h de crescimento em meio de cultivo sólido, as colônias apresentaram coloração preta.

O isolado ONP131 foi capaz de realizar uma atenuação aparente entre 40 e 50% nos mostos fermentados, com pH final entre 4.05 a 4.28 em ambos os testes. Em uma análise sensorial simples, aromas como esterificado e fenólico puderam ser notados. Essas características demonstram sua adaptabilidade ao meio de fermentação, destacando também sua influência positiva nos sabores produzidos. Essa foi a primeira vez que o potencial da levedura na fermentação de cerveja foi avaliado; na literatura há apenas o destaque para sua utilização em processos fermentativos que visam a obtenção de eritritol (adoçante).

A fase de crescimento exponencial em meio YPD foi alcançada mais rápido (~7h) que o observado para *S. cerevisiae* (12h), no entanto *S. cerevisiae* alcança uma maior densidade celular final. A levedura selvagem foi capaz de crescer em meios contendo somente sacarose ou maltose como fonte de carbono, tolerar concentrações até 30% de glicose ou maltose, etanol e NaCl até a concentração de 5%, e não demonstrou ter seu crescimento afetado nas maiores concentrações de α -acids e β -acids. *M. megachiliensis* foi capaz de crescer em meios com pH em torno de 2.5, o que desperta o interesse em seu uso para cervejas ácidas. A habilidade de tolerar a incubação a 37 °C faz da levedura uma boa opção para processos que dependam de temperaturas mais altas.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, foi possível isolar a levedura *M. megachiliensis* de amostras do ambiente, caracterizá-la quanto sua capacidade metabólica de diferentes carboidratos e avaliar pela primeira vez sua tolerância às condições de estresse, às quais as leveduras são expostas em fermentações de cerveja. Como perspectivas futuras, o grupo tem como objetivo produzir uma cerveja utilizando o isolado ONP131, buscando confirmar o perfil sensorial atribuído pela levedura *M. megachiliensis* quando utilizada como única levedura e quando aplicada em processos de fermentação mista com outras leveduras e bactérias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE ROOS, J.; VAN DER VEKEN, D.; DE VUYST, L. The interior surfaces of wooden barrels are an additional microbial inoculation source for lambic beer production. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 85, n. 1, p. 1–18, 2019.

LEE, Y. J. et al. Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. *Mycobiology*, v. 39, n. 1, p. 33–39, 2011.

¹ Biotecnologista e Doutorando em Biotecnologia na Universidade Federal de Pelotas, renanbiotec@gmail.com

² Biologista Molecular pelo Juniata College (EUA) - Professor na Graduação e Pós-Graduação da Indiana University (EUA), bochman@indiana.edu

OSBURN, K.; AHMAD, N. N.; BOCHMAN, M. L. Bio-prospecting, selection, and analysis of wild yeasts for ethanol fermentation. *Zymurgy*, v. 39, p. 81–89, 2016.

SPITAEELS, F. et al. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, 2014.

STEENSELS, J. et al. Review Domestication of Industrial Microbes. *Current Biology*, v. 29, n. 10, p. R381–R393, 2019.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annual Review of Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 61–80, 2014.

PALAVRAS-CHAVE: Cerveja, Levedura selvagem, *Moniliella megachiliensis*

¹ Biotecnologista e Doutorando em Biotecnologia na Universidade Federal de Pelotas, renanbiotec@gmail.com

² Biologista Molecular pelo Juniata College (EUA) - Professor na Graduação e Pós-Graduação da Indiana University (EUA), bochman@indiana.edu