

## Padronização de meio de cultivo para crescimento de levedura cervejeira.

Pedro Machado Medeiros de Albuquerque<sup>1</sup>; Cleomar da Silva<sup>2</sup>; Yasmine Alves Menegon<sup>3</sup>; Rodrigo Casquero Cunha<sup>4</sup>; Fábio Pereira Leivas Leite<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – albuquerque95pedro@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – ccleos@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – yasminealves27@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha\_vet@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

A produção cervejeira artesanal atualmente vem ganhando destaque no mercado, principalmente no que diz respeito à manufatura caseira. A qualidade da levedura, como parte fundamental desse processo, deve ser capaz de evoluir em conjunto com a demanda, para suprir os anseios do consumidor.

As leveduras são fungos unicelulares responsáveis pela fermentação alcoólica no processo de fabricação da cerveja (BOKULICH e BAMFORTH, 2013). São duas as principais espécies utilizadas são *Saccharomyces cerevisiae*, para cervejas do tipo Ale de alta fermentação, e *Saccharomyces pastorianus*, para cervejas do tipo Lager de baixa fermentação (DUNN e SHERLOCK, 2008).

A levedura selecionada do banco de microrganismos do laboratório YT001 (*S. cerevisiae*) é usada para a fabricação de cervejas do tipo Ale. Essa levedura tem a característica de gerar cervejas balanceadas, de média sedimentação e média gravidade. Tais peculiaridades são possíveis pelas suas particularidades genéticas, diferindo-a de outras cepas. Cada cepa apresenta genes específicos que permitem a manutenção de sua estabilidade e metabolismo característico (DUNN e SHERLOCK, 2008).

Diversos fatores determinam como esses organismos devem ser cultivados, como a taxa de crescimento, alterações no metabolismo e custo dos reagentes (BERGMAN, 2001). Foi apontado que a concentração elevada de açúcares, por exemplo, altera a rota metabólica das leveduras. Esse fator pode levar a cerveja fermentada a ter seu sabor alterado, prejudicando assim a qualidade do produto final (SILVA et al., 2009).

Este trabalho traz como objetivo comparar o crescimento da levedura cervejeira YT001 em três meios de cultivo diferentes e estabelecer qual seria o melhor em termos de custo-benefício.

### 2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas. Os experimentos foram realizados com os três meios de cultivo de leveduras mais utilizados nesse laboratório: YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*), Sabouraud e YM (*Yeast Mold*) (ZIMBO et al., 2009). Os meios foram preparados em sua forma líquida de acordo com os componentes presentes na tabela 1. O preço pago por reagente está representado na tabela 2.

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo.

Reagente	YPD	Sabouraud	YM
Peptona de Soja (KASVI)	2%	1%	0,5%
Dextrose (Synth)	2%	2%	1%
Extrato de Levedura (KASVI)	1%		0,3%
Extrato de Malte (Malteshop)			0,3%

Tabela 2. Preço dos reagentes por quilograma.

Reagente	Preço
Peptona de Soja (KASVI)	R\$ 726,14
Dextrose (Synth)	R\$ 30,16
Extrato de Levedura (KASVI)	R\$ 678,00
Extrato de Malte (Malteshop)	R\$ 30,00

Foram preparadas alíquotas em triplicata de 50 mL de cada meio. Esses foram inoculados com uma colônia isolada de YT001 cada. O cultivo foi incubado por 24 h a temperatura de 28 °C a 200 rpm em frascos Erlenmeyer de 250 mL. A etapa seguinte foi a de expansão de cada cultivo para o volume final de 500 mL. Para isso, adicionaram-se os 50 mL iniciais em 450 mL do respectivo meio em Erlenmeyer de 2L. Esses foram incubados por 30 h a 28 °C e 200 rpm. Após o período de cultivo, foi colhida uma amostra de cada frasco para realização de coloração de Gram, para verificar sua pureza, e quantificação em Câmara de Neubauer. Após a contagem, foi feita uma correlação entre o preço dos reagentes e a concentração de células. As diferenças entre as médias das triplicatas foi estimada pelo teste t de Student e considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A levedura YT001 apresentou crescimento diferenciado nos diferentes meios, uma vez que foram observados valores diferentes na contagem de células. O maior rendimento celular foi observado em meio YPD, seguido pelos meios YM e Sabouraud, respectivamente. Os valores podem ser vistos na tabela 3. O custo para a fabricação de Yeast Mold se mostrou mais de três vezes menor que o para a produção de YPD, como mostra a tabela 4.

Tabela 3. Contagem de células totais de YT001 e relação de custos em diferentes meios de cultivo.

Meio	Contagem celular	Preço de 500 mL	Porcentagem de custos*	Relação de custos**
YPD	$6 \times 10^6$	R\$ 10,98	100,0%	3,66 ×
Sabouraud	$3 \times 10^6$	R\$ 3,93	35,8%	1,31 ×
YM	$4,2 \times 10^6$	R\$ 3,00	27,3%	1

\*Foi calculada estabelecendo-se que YPD é 100%

\*\*Foi calculado estabelecendo-se que o valor do YM é igual a 1

Apesar do meio YPD ter sido o mais eficaz em crescimento microbiano, o YM foi o mais viável economicamente. Isto se dá, pois mesmo que com uma produção menor, aumentando-se o volume de produção, o YM alcançaria  $6 \times 10^6$  células por um valor de aproximadamente R\$ 4,29, mesmo assim mais barato que os R\$ 10,98 que seriam gastos com o YPD para a obtenção da mesma quantidade celular. A tabela 5 compara esse custo-benefício entre os meios.

Tabela 5. Comparativo de custo-benefício entre os meios.

Reagente	Preço de 500 mL	Produção em 500 mL	Preço para $6.10^6$ células
YPD	R\$ 21,91	$6.10^6$ células	R\$ 10,98
YM	R\$ 6,00	$4.2.10^6$ células	R\$ 4,28

Além do custo benefício, a nutrição da cepa cervejeira em YM mantém um metabolismo mais próximo quando passa do cultivo para a produção da cerveja. Isso se dá pelo fato dela já iniciar fermentando a maltose contida no extrato de malte. Enquanto o YPD não contém esse reagente, ele ainda por cima tem uma concentração maior dos outros reagentes.

#### 4. CONCLUSÕES

Estudar o custo-benefício dos meios utilizados para produção de levedura cervejeira é um passo importante para se chegar a um produto viável comercialmente. Neste caso, o melhor custo-benefício foi estabelecido com a produção de levedura em meio YM. Isso porque este meio tem baixa concentração dos insumos mais caros em sua composição. Desta maneira, o presente trabalho pode contribuir para o mercado de produção de leveduras cervejeiras.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUNN, B.; SHERLOCK, G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. **Genome Research**, New York, v.18, n.1, p.1610–1623, 2008.

SILVA, A.E.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V.R.; JUNIOR, C.G.H.; HECKTHEUER, L.H.R.; REICHERT, F.S. Elaboração de cerveja com diferentes teores alcoólicos através de processo artesanal. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.3, p.369–374, 2009.

BERGMAN, L.W. Growth and maintenance of yeast. In: CLIFTON, N. J. **Methods in molecular biology**. New Jersey: Humana Press Inc, 2001. Cap.2, p.9–14.

BOKULICH, N.A.; BAMFORTH, C.W. The Microbiology of Malting and Brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Davis, v.77, n.2, p.157–172, 2013.

ZIMBRO, M.J.; POWER, D.A.; MILLER, S.M.; WILSON, G.E.; JOHNSON, J. A.

**Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media.** Maryland: BD  
Diagnostics, 2009.