

## AValiação DE LEVEDURAS SELVAGENS ISOLADAS DO KOMBUCHA PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA

Diego Pádua de Almeida<sup>1</sup>; Hygor Lendell Silva de Souza<sup>2</sup>;  
Cintia Lacerda Ramos<sup>3</sup>.

### RESUMO

Novo nicho cervejeiro a ser explorado é a aplicação de leveduras não convencionais na produção de cerveja, as quais são capazes de proporcionar características sensoriais diferenciadas. Kombucha é uma bebida que possui alta diversidade de microrganismos sendo importante fonte de leveduras. Neste presente trabalho, leveduras isoladas do Kombucha foram avaliadas para produção de cerveja tipo *lager* à 10°C por 240 h de fermentação. As espécies de leveduras *B. bruxellensis*, *P. kluyveri* e *S. ludwigii* foram avaliadas e apresentaram alta viabilidade durante toda fermentação. Foi possível observar queda da densidade do mosto, e aumento do teor alcóolico variando de 0,80% a 1,31% (v/v) para as cepas de *P. kluyveri*. A espécie de levedura *S. ludwigii* e *B. bruxellensis* apresentaram teores alcóolico mais baixos, 0,13% e 0,34% (v/v), respectivamente. Estes dados mostram potencial uso destas leveduras para elaboração de cervejas sem álcool ou com baixo teor alcóolico. No entanto, avaliação dos compostos voláteis deverá ser realizados.

### INTRODUÇÃO

Cerveja é umas das bebidas mais consumidas no mundo e os primeiros relatos da sua produção são datados por volta de 6000 anos a.C. A sua produção consiste na utilização de insumos simples, como água, malte, lúpulo e levedura (1).

Levedura é o principal transformante do mosto cervejeiro em cerveja, o qual utiliza os açúcares fermentescíveis oriundos do malte, bem como glicose, sacarose, maltose e maltotriose, para seu crescimento celular na fase aeróbia, ou para produção de etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na fase anaeróbica (fermentação alcóolica). *Saccharomyces cerevisiae* é espécie levedura mais utilizada para produção de cervejas tipo *ales*, a temperatura de fermentação varia de 14 a 25 °C, e são cervejas mais aromáticas e alcóolicas. Por outro lado, levedura *Saccharomyces pastorianus* é mais usualmente empregada na fabricação de cervejas tipo *lagers*, em que a temperatura de fermentação ocorre por volta 6 a 15°C, e apresenta características de cervejas menos aromáticas e de coloração clara (2; 3). A busca por leveduras não convencionais vem sendo cada vez mais explorada com o intuito de obter cervejas com diferentes características aromáticas, além de propriedades tecnológicas, como baixo ou sem teor alcóolico e com possíveis propriedades probióticas (4; 5).

Kombucha é uma bebida fermentada ácida, moderadamente gaseificada e poder ser alcóolica ou não. É obtida da fermentação da infusão do chá preto ou verde (*Camillia sinensis*) acrescida do açúcar sacarose, e do biofilme *start* denominado de *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* (SCOBY). Os principais gêneros de leveduras encontrados na Kombucha são *Brettanomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Torulospora* e *Zygosaccharomyces* (6; 7). As leveduras presentes na bebida podem ser uma alternativa na aplicação para fermentações diversas, como por exemplo na elaboração de cervejas.

<sup>1</sup> – Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, ICT/UFVJM

<sup>2</sup> – Doutorando do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA

<sup>3</sup> – Docente do programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, ICT/UFVJM

## OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a performance fermentativa de leveduras selvagens não convencionais isoladas do Kombucha para a produção de cerveja.

## MATERIAL E MÉTODOS

As leveduras foram obtidas no Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Ciências Básicas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus JK. As identificações das leveduras estão descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1.: Identificação das Leveduras Selvagens isoladas do Kombucha.

Leveduras			
Código	Identificação	Código	Identificação
L131	<i>Pichia kluyveri</i>	L431	<i>Pichia kluyveri</i>
L231	<i>Pichia kluyveri</i>	L472	<i>Pichia fermentans</i>
L331	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	L652	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
		SC26	<i>Saccharomyces pastorianus</i>

Fonte: Autores, 2022.

Inicialmente foi realizado a propagação das leveduras. 1 mL de levedura crescida em caldo YEPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona de soja e 2% de glicose) e 1g da levedura comercial liofilizada (controle) foram inoculadas em 10 ml de caldo YEPG, incubadas por 24 horas à 30°C. Então, as leveduras foram inoculados em 90 mL de meio YEPG por mais 24 horas na mesma temperatura. Após crescimento, as leveduras foram centrifugadas (4000 rpm por 10 minutos) e lavadas com água destilada estéril para remoção do meio de cultura.

Para a preparação do mosto cervejeiro foi adicionado o extrato de malte em 3 L de água destilada aquecida à 80 °C e em seguida foi adicionado o lúpulo (iso- $\alpha$ -ácido a 30%). As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers contendo 10 mL de mosto e incubadas à 10 °C. Um fluxograma das etapas do trabalho é mostrado na **Figura 1**.

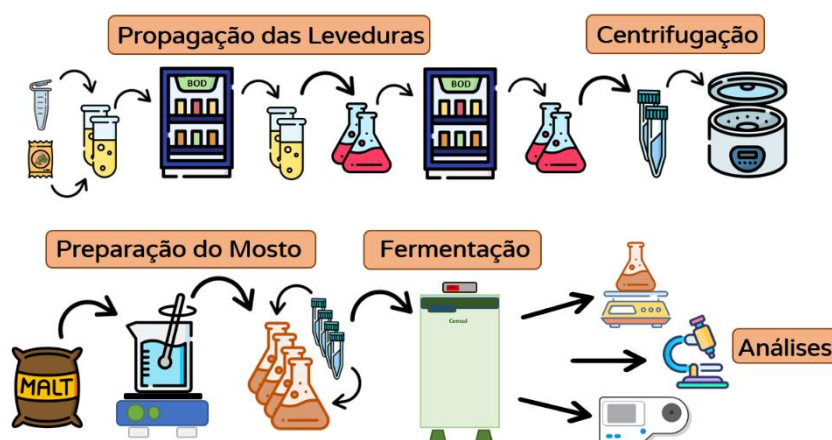


Figura 1 – Fluxograma da propagação das leveduras, preparação do mosto cervejeiro e fermentação do mosto. Fonte: Autores, 2022.

Foram realizadas análises de peso para avaliação do desprendimento de CO<sub>2</sub>, Brix em refratômetro digital e contagem de células em câmara de Neubauer nos tempos de 48, 96, 144, 192 e 240 horas. A análise estatística dos dados foi realizada usando o software Sisvar através do teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

No processo de produção da cerveja o decaimento da densidade do mosto é um parâmetro indicativo positivo que levedura esteja metabolizando os açúcares fermentescíveis (6). Pode ser observado na **Tabela 2** o valor do °Brix diminuindo durante as 240h fermentação. As leveduras não convencionais (*P. kluyveri* L131, L231, L431 e L472; *S. ludwigii* L331; *B. bruxellensis* L652), apresentaram lenta fermentação, em relação a levedura comercial (SC26), sendo observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) após 144h de fermentação. Leveduras não convencionais, já foram citadas em produção de cerveja com baixo ou sem teor alcóolico, devido a baixa preferência da fermentação dos açúcares maltose e maltotriose (2).

Tabela 2.: Avaliação do °Brix durante a fermentação do mosto cervejeiro.

Amostra	°Brix				
	48h	96h	144h	192h	240h
<b>L131</b>	15,000 <sup>a</sup> ± 2,828	12,750 <sup>a</sup> ± 0,071	12,200 <sup>b</sup> ± 0,566	13,100 <sup>b</sup> ± 0,424	12,500 <sup>b</sup> ± 0,283
<b>L231</b>	12,250 <sup>a</sup> ± 1,061	12,000 <sup>a</sup> ± 1,131	12,300 <sup>b</sup> ± 1,131	12,600 <sup>b</sup> ± 0,990	12,000 <sup>b</sup> ± 0,843
<b>L331</b>	13,000 <sup>a</sup> ± 0,141	12,800 <sup>a</sup> ± 0,424	13,400 <sup>b</sup> ± 0,283	13,000 <sup>b</sup> ± 0,141	12,750 <sup>b</sup> ± 0,071
<b>L431</b>	12,850 <sup>a</sup> ± 0,212	13,750 <sup>a</sup> ± 0,212	13,150 <sup>b</sup> ± 0,354	12,900 <sup>b</sup> ± 0,424	13,050 <sup>b</sup> ± 0,354
<b>L472</b>	13,100 <sup>a</sup> ± 0,141	13,400 <sup>a</sup> ± 0,283	13,900 <sup>b</sup> ± 0,000	13,300 <sup>b</sup> ± 0,424	13,250 <sup>b</sup> ± 0,071
<b>L652</b>	12,900 <sup>a</sup> ± 0,141	12,150 <sup>a</sup> ± 0,212	12,400 <sup>b</sup> ± 0,141	12,300 <sup>b</sup> ± 0,000	12,250 <sup>b</sup> ± 0,354
<b>SC26</b>	12,500 <sup>a</sup> ± 0,000	10,400 <sup>a</sup> ± 0,141	7,700 <sup>a</sup> ± 0,141	7,350 <sup>a</sup> ± 0,354	7,700 <sup>a</sup> ± 0,141

As letras diferentes na mesma coluna indicam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as médias no teste *Scott-Knott*. Os valores de ± indicam o desvio padrão. Autores, 2022.

A cinética da perda de peso por meio da produção de CO<sub>2</sub> é apresentado na **Tabela 3**. Estes resultados juntamente com queda da densidade observada, podem inferir que houve a fermentação no período de 240h. No geral, as leveduras não convencionais apresentaram maior desprendimento de CO<sub>2</sub> nas primeiras 48 h de fermentação, enquanto que, levedura comercial *S. pastorianus* mostrou maior desprendimento de CO<sub>2</sub> no tempo 144h (2,785g). A levedura *B. bruxellensis* L652 demonstrou baixa atividade fermentativa já que apresentou baixo desprendimento de CO<sub>2</sub> somente nos tempos de 96h (0,02g) e 144h (0,465g). Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os dados.

Tabela 3.: Avaliação do desprendimento de CO<sub>2</sub> durante a fermentação.

Amostra	Desprendimento de CO <sub>2</sub> (g)				
	48h	96h	144h	192h	240h
<b>L131</b>	1,795 <sup>a</sup> ± 0,233	0,475 <sup>a</sup> ± 0,672	0,485 <sup>a</sup> ± 0,417	1,080 <sup>a</sup> ± 0,375	0,470 <sup>a</sup> ± 0,665
<b>L231</b>	1,675 <sup>a</sup> ± 0,445	0,660 <sup>a</sup> ± 0,933	1,355 <sup>a</sup> ± 1,237	1,125 <sup>a</sup> ± 1,124	0,715 <sup>a</sup> ± 0,841
<b>L331</b>	1,290 <sup>a</sup> ± 0,325	0,585 <sup>a</sup> ± 0,007	0,880 <sup>a</sup> ± 0,113	0,465 <sup>a</sup> ± 0,156	0,150 <sup>a</sup> ± 0,071

<b>L431</b>	0,530 <sup>a</sup> ± 0,750	0,450 <sup>a</sup> ± 0,042	0,080 <sup>a</sup> ± 0,014	0,420 <sup>a</sup> ± 0,382	0,290 <sup>a</sup> ± 0,184
<b>L472</b>	1,625 <sup>a</sup> ± 0,007	0,850 <sup>a</sup> ± 0,537	0,071 <sup>a</sup> ± 0,014	0,365 <sup>a</sup> ± 0,035	0,160 <sup>a</sup> ± 0,014
<b>L652</b>	0,000 <sup>a</sup> ± 0,000	0,020 <sup>a</sup> ± 0,028	0,465 <sup>a</sup> ± 0,205	0,000 <sup>a</sup> ± 0,000	0,000 <sup>a</sup> ± 0,000
<b>SC26</b>	0,420 <sup>a</sup> ± 0,141	1,610 <sup>a</sup> ± 0,099	2,785 <sup>a</sup> ± 0,064	0,570 <sup>a</sup> ± 0,000	0,015 <sup>a</sup> ± 0,021

As letras diferentes na mesma coluna indicam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as médias no teste *Scott-Knott*. Os valores de  $\pm$  indicam o desvio padrão. Autores, 2022.

A **Tabela 4** traz dados de viabilidade celular. Pode-se observar que em determinados tempos houve diferença significativa, podendo destacar os períodos de fermentação de 48h, 96h e 240h. Para o período de 48h, espécie *B. bruxellensis* (L652) apresentou maior ( $p < 0,05$ ) viabilidade celular. Durante o tempo de 96h, a cepa *P. kluyveri* (L431) e *B. bruxellensis* (L652) apresentaram maiores ( $p < 0,05$ ) viabilidade celular.

Em relação ao tempo 240h de fermentação, a levedura comercial (SC26) apresentou diferença significativa como a menor ( $p < 0,05$ ) contagem celular, quando comparadas com as demais no mesmo tempo. Contudo, nos demais períodos não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as cepas de leveduras analisadas. Estes resultados demonstram que todas as leveduras demonstraram alto número de células ( $> 8 \text{ Log células/mL}$ ) durante todo processo fermentativo.

Tabela 4.: Avaliação da população das leveduras em contagem da câmara de Neubauer.

Amostra	Contagem Log <sub>10</sub> células/mL				
	48h	96h	144h	192h	240h
<b>L131</b>	8,390 <sup>b</sup> ± 0,024	8,300 <sup>b</sup> ± 0,032	8,380 <sup>a</sup> ± 0,001	8,427 <sup>a</sup> ± 0,041	8,449 <sup>a</sup> ± 0,017
<b>L231</b>	8,404 <sup>b</sup> ± 0,010	8,302 <sup>b</sup> ± 0,104	8,332 <sup>a</sup> ± 0,014	8,379 <sup>a</sup> ± 0,006	8,363 <sup>a</sup> ± 0,015
<b>L331</b>	8,326 <sup>c</sup> ± 0,041	8,328 <sup>b</sup> ± 0,029	8,370 <sup>a</sup> ± 0,040	8,390 <sup>a</sup> ± 0,039	8,403 <sup>a</sup> ± 0,009
<b>L431</b>	8,416 <sup>b</sup> ± 0,021	8,333 <sup>a</sup> ± 0,005	8,384 <sup>a</sup> ± 0,012	8,418 <sup>a</sup> ± 0,017	8,426 <sup>a</sup> ± 0,013
<b>L472</b>	8,258 <sup>c</sup> ± 0,046	8,359 <sup>b</sup> ± 0,029	8,369 <sup>a</sup> ± 0,013	8,432 <sup>a</sup> ± 0,044	8,432 <sup>a</sup> ± 0,033
<b>L652</b>	8,499 <sup>a</sup> ± 0,028	8,452 <sup>a</sup> ± 0,055	8,493 <sup>a</sup> ± 0,015	8,473 <sup>a</sup> ± 0,028	8,424 <sup>a</sup> ± 0,056
<b>SC26</b>	8,290 <sup>c</sup> ± 0,017	8,556 <sup>b</sup> ± 0,009	8,279 <sup>a</sup> ± 0,069	8,352 <sup>a</sup> ± 0,027	8,243 <sup>b</sup> ± 0,022

As letras diferentes na mesma coluna indicam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as médias no teste *Scott-Knott*. Os valores de  $\pm$  indicam o desvio padrão. Autores, 2022.

Os resultados demonstrados na **Tabela 5** correspondem ao teor alcoólico aparente produzido durante a fermentação. *P. kluyveri* (L131) e a levedura comercial (SC26) apresentaram maiores ( $p < 0,05$ ) valores de teor alcoólico que as demais leveduras avaliadas. De acordo com estudos feitos por Laureys (10), leveduras não-*Saccharomyces* podem fermentar mosto de cerveja, produzindo cervejas com baixo teor alcoólico ou sem álcool. Bellut (6) elaborou cerveja com teor alcoólico de 0,50% (v/v) a partir de mosto de densidade 6 °P fermentado por 72h à 25°C. Nos estudos observados por Michel (8), fermentação de mosto 16 °P por 10 dias à 28 °C utilizando *B. bruxellensis* resultou em cerveja com 4% (v/v) de teor alcoólico. Estes dados mostram que os parâmetros densidade do mosto, temperatura e levedura são fatores determinantes na concentração de etanol obtida.

Tabela 5.: Resultados do teor alcoólico aparente produzido durante a fermentação.

Teor Alcoólico			
Amostra	%(v/v)	Amostra	%(v/v)
L131	1,313 <sup>a</sup> ± 1,336	L431	0,106 <sup>b</sup> ± 0,074
L231	0,132 <sup>b</sup> ± 0,111	L472	0,079 <sup>b</sup> ± 0,0,37
L331	0,132 <sup>b</sup> ± 0,037	L652	0,342 <sup>b</sup> ± 0,111
		SC26	2,520 <sup>a</sup> ± 0,074

As letras diferentes na mesma coluna indicam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as médias no teste de *Scott-Knott*. Os valores de  $\pm$  indicam o desvio padrão. Autores, 2022.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram potencial utilização de leveduras não convencionais para elaboração de cervejas. Foi possível observar alta viabilidade celular ( $> 8$  Log células/mL) para todas as leveduras avaliadas. As leveduras não convencionais mostraram maior atividade fermentativa nas primeiras 48 h de fermentação, enquanto que a levedura comercial apresentou maior atividade fermentativa de 96 a 144 h de fermentação, observadas pelo desprendimento de CO<sub>2</sub>. Em relação aos teores alcoólicos obtidos, foi possível observar uma variação de 0,079 a 1,313 % para as leveduras não convencionais, enquanto que a levedura comercial apresentou teor alcoólico de 2,520%. Estes dados mostram um potencial das leveduras não convencionais para elaboração de cerveja tipo *larger* com baixos teores alcoólicos. As espécies de leveduras em estudo já são conhecidas como possíveis produtoras de cervejas com baixo ou sem teor alcoólico. No entanto, análises de compostos voláteis são necessárias para avaliação de compostos que possam afetar as características sensoriais da bebida. Contudo, leveduras isoladas do Kombucha demonstraram potencialidade para produção de cerveja e sendo assim promissora para estudos futuros.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) - APQ-01951-21.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- MATRAXIA, M. et al. Non-conventional yeasts from fermented honey by-products: Focus on *Hanseniaspora uvarum* strains for craft beer production. *Food Microbiology*, v. 99, n. April, p. 103806, 2021.
- BAMFORTH, C. W.; COOK, D. J. *Food, Fermentation, and Micro - organisms*. 2. ed. [s.l.] WILEY BLACKWELL, 2019.
- LI, Q.; WANG, J.; LIU, C. Beers. In: PANDEY, A. et al. (Eds.). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*. China: Elsevier, 2017. p. 305–351.
- CANONICO, L. et al. Assessment of non-conventional yeasts with potential probiotic for protein-fortified craft beer production. *Lwt*, v. 145, n. March, p. 111361, 2021.
- SENKARCINOVA, B. et al. Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Lwt*, v. 100, n. October 2018, p. 362–367, 2019.
- LAUREYS, D.; BRITTON, S. J.; DE CLIPPELEER, J. Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, p. 1–10, 2020.
- MARSH, A. J. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, v. 38, p. 171–178, 2014.
- MICHEL, Maximilian et al. Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 122, n. 4, p. 569-587, 2016.
- BELLUT, K. et al. Application of non-Saccharomyces yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. *Fermentation*, v. 4, n. 3, 2018.
- GSCHAEDLER, A. Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. *Current Opinion in Food Science*, v. 13, p. 73–77, 2017.