

Potencial de utilização de leveduras “killer” para produção de cachaça¹

Potential of killer yeasts utilization for “cachaça” production

Jaqueline Rabelo de Lima², Laura Maria Bruno³, Jonas Luiz Almada da Silva⁴

e Antônio Renato Soares de Casimiro⁵

Resumo - Duzentas e trinta leveduras foram isoladas de amostras de caldo de cana para fabricação de cachaça e avaliadas quanto à presença do fenótipo “killer”. Dezesesseis (7,0%) isolados foram positivos para essa característica. A temperatura de incubação e o pH do meio de cultivo influenciaram a produção de toxina “killer”. Quando a temperatura de incubação foi 25 °C, todos os isolados produziram toxina em pH 4,2; 4,5 e 5,0. No entanto, não foi detectada atividade “killer” nem quando os microrganismos foram cultivados em pH 3,0, nem a medida que a temperatura de incubação foi elevada acima de 30 °C. Também foi testada a capacidade dos isolados em fermentar caldo de cana e produzir etanol. O rendimento da fermentação do isolado 188 foi 45,8%, com 85,1% de eficiência fermentativa. A presença de caráter “killer” e as características de fermentação do isolado 188 mostram que este é um microrganismo promissor para ser usado em processos fermentativos para produção de etanol.

Palavras-chave: Atividade “killer”. Fenótipo “killer”. Fermentação.

Abstract - Two hundred and thirty yeasts were isolated from “cachaça” sugarcane juice and evaluated for the presence of killer phenotype. Sixteen (7.0%) isolates were positive for this characteristic. Incubation temperature and pH of cultivation environment influenced killer toxin production. When incubation temperature was 25 °C all isolates produced toxin at pH 4.2; 4.5 and 5.0. However, killer activity was not detected nor when microorganisms were growth at pH 3.0, nor when incubation temperature was raised above 30 °C. Isolates ability to ferment sugarcane juice and ethanol production was also tested. The fermentation yield of isolate 188 was 45.8%, with 85.1% of fermentative efficiency. The killer character presence and fermentation characteristics of isolate 188 show that it is a promising microorganism to be used on fermentative processes for ethanol production.

Key words: Killer activity. Killer phenotype. Fermentation.

¹ Recebido para publicação em 28/06/2007; aprovado em 31/07/2007

Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada ao Dep. de Tecnologia de Alimentos, CCA/UFC, CE.

² Eng. de Alimentos, M.Sc., Profa. do Dep. de Biologia, FAEC/EUCE, CEP:63.700.000, Crateús-CE, jackrabelo@uece.br

³ Eng. de Alimentos, D. Sc., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Imbruno@cnpat.embrapa.br

⁴ Eng. de Alimentos, M.Sc., UFC, CE, jl.almada@ig.com.br

⁵ Eng. Químico, D. Sc., Prof do Dep. de Tecnologia de Alimentos, CCA/UFC, Campus do Pici, CEP:60.455.970, Fortaleza-CE, cisso@ufc.br

Introdução

A cachaça é uma bebida típica brasileira, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo da cana de açúcar. No Brasil a produção atinge cerca de 1,3 bilhões de litros anuais, ocorrendo em todas as regiões, sendo a maior parte nos estados de São Paulo, Pernambuco, Ceará, Rio de Janeiro, Goiás e Minas Gerais. Desse total, quase 15 milhões de litros são vendidos para mais de 60 países (PROGRAMA BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO DA CACHAÇA, 2005). No entanto, apesar da importância econômica e social da aguardente de cana de açúcar brasileira, os estudos sobre a qualidade da bebida ainda são escassos (CARDELLO; FARIA, 1998). Além disso, embora parte da produção seja industrializada, a fabricação da bebida ainda é muito artesanal, o que contribui para falta de padronização do produto e, conseqüentemente, para seu baixo valor comercial que, em última instância, desestimula investimentos no processo.

Um dos principais aspectos da produção artesanal de cachaça é a preparação do fermento iniciador, que consiste na propagação da microbiota fermentativa numa mistura de caldo de cana com milho, arroz e/ou farinha de soja. O processo ocorre dentro da cuba de fermentação e pode durar de cinco a 20 dias, até que a população de leveduras seja suficiente para iniciar o ciclo fermentativo. As comunidades de leveduras presentes em tais fermentações estão em contínua sucessão e as espécies presentes no caldo de cana fresco são constantemente introduzidas no microambiente da fermentação (PATARO et al., 2002).

As características fisiológicas das espécies de leveduras isoladas do mosto fermentado têm grande relevância na compreensão dos mecanismos envolvidos na colonização do mosto e na determinação das condições ótimas para se manter uma fermentação saudável (PATARO et al., 2002). Dessa forma, a seleção do fermento é considerada uma das medidas que podem contribuir para melhoria do processo de fabricação de cachaça.

As linhagens de leveduras comumente empregadas na produção de bebidas alcoólicas apresentam algumas limitações como: ineficiência na fermentação do mosto, com baixa conversão dos carboidratos a etanol, devido ao excessivo crescimento da levedura e a sua inabilidade em fermentar todo o açúcar presente no mosto; variações nas propriedades floculantes das leveduras; baixa termoestabilidade, tolerância a etanol e pressão osmótica; contaminação da fermentação por outros microrganismos (HAMMOND, 1995). Assim, leveduras com capacidade de produzir metabólitos antimicrobianos poderiam ser usadas como fermento para evitar a proliferação de contaminantes.

Algumas espécies de leveduras secretam toxina protéica ou glicoprotéica de baixa massa molecular, denominada toxina “killer”. Leveduras “killer” matam células de leveduras do mesmo gênero ou de gêneros relacionados, sendo elas mesmas imunes a sua própria toxina, mas sensíveis à toxina secretada por outras leveduras (SCHMITT; BREINIG, 2002). Nos processos fermentativos, o caráter “killer” pode ser usado para combater leveduras *Saccharomyces* contaminantes selvagens, como no caso da fabricação de vinho, onde *S. cerevisiae* “killer” são usadas para iniciar a fermentação, melhorando tanto o processo, como a qualidade do produto (CIANI; FATICHENTI, 2001). O objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar leveduras “killer” com potencial fermentativo para serem usadas no processo de produção de cachaça.

Material e Métodos

Amostragem e isolamento de microrganismos

Foram coletadas, em uma indústria produtora de cachaça do Ceará, 35 amostras de caldo de cana, no período de agosto a novembro de 2003. As amostras foram diluídas (10^{-3} ; 10^{-4} e 10^{-5}), plaqueadas em ágar YEPD (extrato de levedura 10 g L^{-1} , peptona 20 g L^{-1} , glucose 20 g L^{-1} , ágar 20 g L^{-1} , pH 4,2, ajustado com tampão citrato-fosfato 100 mM) e incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Colônias foram selecionadas aleatoriamente e reisoladas em meio YEPD, nas mesmas condições anteriores, e, posteriormente, foram testadas em relação ao fenótipo “killer”.

Ensaio para o fenótipo “killer”

A presença de fenótipo “killer” foi testada em meio YEPD suplementado com 0,003% de azul de metileno (YEPD-azul de metileno), pH 4,2. Células sensíveis padrão (*Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 e *Candida glabrata* NCYC Y-55) foram ativadas em ágar YEPD-azul de metileno a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e suspensas em solução salina, numa concentração de aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células mL^{-1} , a qual foi espalhada com swab estéril sob a superfície de ágar YEPD-azul de metileno. As placas foram incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. As leveduras a serem testadas para atividade “killer” também foram ativadas em ágar YEPD-azul de metileno a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e inoculadas como um único ponto na superfície das placas semeadas com as leveduras sensíveis. Em seguida as placas foram novamente incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. A presença de halo de inibição ao redor do ponto de inoculação indicou a positividade do teste.

Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade “killer”

As leveduras “killer” selecionadas foram ativadas em ágar YEPD-azul de metileno a 25 °C por 24 horas. Em seguida foram inoculadas, como pontos únicos, sobre a superfície de placas previamente semeadas com leveduras sensíveis em ágar YEPD-azul de metileno ajustado em diferentes valores de pH: 3,5; 4,2; 4,5 e 5,0. As placas correspondentes a cada pH foram incubadas, em triplicata, em cada uma das temperaturas subseqüentes: 25; 30; 35 e 40 °C.

Determinação de açúcar

A determinação de açúcar no meio foi realizada pela mensuração do Brix (sólidos solúveis), utilizando Alcoômetro de Gay-Lussac e Cartier, ARBRA (escala 0 – 100), a temperatura de 20 °C, no momento da inoculação (tempo 0) e após 24 h de fermentação.

Preparo do inóculo para fermentação

Os isolados que apresentaram fenótipo “killer” foram inoculados em 10 mL de meio de propagação (sacarose 100 g L⁻¹; MgSO₄ 0,65 g L⁻¹; KH₂PO₄ 5 g L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O 0,65 g L⁻¹, pH 4,5) e incubados a 25 °C por 24 horas, sob agitação constante em “shaker” (120 rpm). Após esse período, 90 mL de meio de propagação foi adicionado ao inóculo inicial e o crescimento celular foi promovido por mais 24 horas, sob as mesmas condições. Finalmente, mais 400 mL de meio de propagação fresco foi adicionado à batelada anterior e o crescimento foi promovido por mais 24 horas, sob as mesmas condições. Em seguida, o meio foi centrifugado (5000 rpm/5 minutos) e foi obtida uma massa de leveduras úmida, usada como inóculo para fermentação.

Fermentação

Cada isolado de levedura com fenótipo “killer” (19,5 g L⁻¹ em massa úmida) foi inoculado em frascos de 250 mL contendo 100 mL de caldo de cana padronizado a 10 °Brix e pH 4,5. A fermentação foi conduzida sob agitação constante em “shaker” (120 rpm), a temperatura ambiente por 24 horas. O processo foi acompanhado pela determinação da evolução da massa de CO₂, tendo por base o peso do frasco em função do tempo. Essa medida também foi usada para estimar a produção de etanol. O rendimento da fermentação foi calculado ao final de 24 horas pela relação entre produção de etanol e consumo de açúcar, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \{(1,045 \times P) / (S_0 - S)\},$$

Onde:

1,045 - relação entre as massas moleculares de etanol e CO₂ ;

P - perda de peso após 24 horas de fermentação;

S₀ - concentração inicial de açúcar; e

S - concentração final de açúcar.

O cálculo da eficiência da fermentação (%) foi realizado com base no conteúdo alcoólico do meio e na concentração inicial de açúcar redutor, de acordo com a estequiometria da fermentação, onde 1 g de açúcar redutor produz 0,51 g de etanol.

Resultados e Discussão

Isolados com fenótipo “killer”

Leveduras morfológicamente diferentes foram isoladas a partir das amostras de caldo de cana estudadas. Desse total, apenas 16 (7,0%) isolados foram positivos para o fenótipo “killer”. Hidalgo e Flores (1994), estudaram 270 isolados de leveduras de amostras oriundas de três diferentes estágios da fermentação para fabricação de vinhos, na Espanha, e encontraram 115 (42,6%) isolados positivos para o caráter “killer”, demonstrando que esse fenótipo está amplamente representado na flora nativa de leveduras usadas naqueles processos. Ceccato-Antonini et al. (1999), encontraram 24 (21,2%) linhagens de leveduras com atividade “killer” dentre 113 leveduras da coleção de culturas de fermentações alcoólicas do Departamento de Tecnologia de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, no campus de Araras, São Paulo. Zagorc et al. (2001), isolaram leveduras endógenas de fermentações para produção de vinho tinto e, dentre 497 isolados, detectaram 19 (3,8%) cepas que expressaram atividade “killer” contra células sensíveis de *S. cerevisiae* S6. As diferentes porcentagens encontradas neste trabalho e pelos diversos pesquisadores demonstram a enorme variabilidade na distribuição de leveduras em relação ao fenótipo “killer”. Diferentes aspectos podem influenciar nessa variação, dentre as quais destacam-se: flutuação da frequência de leveduras “killer” durante os diversos estágios da fermentação (HIDALGO; FLORES, 1994; ZAGORC et al, 2001), características da zona geográfica, das técnicas empregadas no processo de fermentação (GUTIÉRREZ et al., 2001) e valor de pH do mosto (ZAGORC et al., 2001).

Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade “killer”

O efeito do pH e da temperatura sobre a atividade “killer” dos isolados é mostrado na Tabela 1. Quando o pH do meio foi 3,5, não foi detectada atividade “killer” para nenhum dos isolados, em nenhuma das temperaturas estudadas. No entanto, Silva (1996), estudando a atividade

“killer” de 85 isolados de leveduras de mosto de uva de *Vitis vinifera* L. Riesling Itália verificou que 12,9% apresentaram a habilidade de produzir toxina “killer” em pH 3,0, a 18 °C, embora tal atividade tenha sido melhor expressa quando as células foram cultivadas em pH 4,2. Quando a temperatura de incubação foi 25 °C, todos os isolados produziram toxina nos valores de pH 4,2; 4,5 e 5,0 (Tabela 1). No entanto, a 30 °C apenas os isolados cultivados em pH 4,2 e 4,5 produziram toxina. Também foi observado que o aumento da temperatura de incubação para 35 °C e, posteriormente, 40 °C, apenas um isolado, o 167, foi capaz de manifestar o fenótipo “killer”, em pH 4,2 e 4,5. Segundo Silva (1996), a capacidade “killer” de algumas leveduras parece ser dependente da temperatura, a qual afeta a produção da toxina. Soares e Sato (2000), verificaram que toxina “killer” de *S. cerevisiae* Y500-4L apresentou a atividade máxima numa faixa de pH entre 4,1 e 4,5 e de temperatura entre 22 e 25 °C. Os resultados obtidos neste trabalho também estão em concordância com outros encontrados na literatura, que relata que a faixa ótima de pH para atividade de toxina “killer” K1 está situada entre 4,6 e 4,8 e para a toxina K2, entre 4,0 e 4,2 (HIDALGO; FLORES, 1994).

Vale salientar que os parâmetros que favorecem a produção de toxina “killer” dos isolados estudados, coincidem com os encontrados no início da fermentação da cachaça: temperatura do processo em torno de 25 °C e pH do caldo na faixa entre 4,5 e 5,0. Isso sinaliza para a possibilidade do uso desses isolados não só como fermento para a produção de cachaça, mas também para o controle do crescimento de microrganismos contaminantes presentes nessa fase. Além do mais, é importante ressaltar que o aumento de temperatura que ocorre no decorrer do processo fermentativo não inviabiliza o emprego desses isolados como fermento, uma vez que nessa etapa o nível de etanol produzido já limita o crescimento de microrganismos indesejáveis.

Potencial fermentativo dos isolados

Leveduras que serão utilizadas em processos fermentativos visando a produção de bebidas alcoólicas devem possuir, entre outras características, capacidade de produzir etanol, a partir de um substrato fermentescível, que no caso da cachaça, é o caldo de cana. O resultado do

Tabela 1- Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade “killer” de leveduras isoladas de caldo de cana para produção de cachaça, no período de agosto a novembro de 2003. (IS - representa o número do isolado avaliado)

IS	pH 3,5				pH 4,2				pH 4,5				pH 5,0			
	Temperatura de incubação (°C)				Temperatura de incubação (°C)				Temperatura de incubação (°C)				Temperatura de incubação (°C)			
	25	30	35	40	25	30	35	40	25	30	35	40	25	30	35	40
98	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
113	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
118	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
149	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
152	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
155	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
160	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
161	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
167	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
187	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
188	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
189	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
201	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
208	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
216	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
218	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-

rendimento, em etanol, da fermentação e da eficiência fermentativa de cada um dos isolados são apresentados na Tabela 2. O rendimento foi inferior a 30% para 50% dos isolados e entre 30 e 40% para 37,5% deles. Apenas dois isolados (12,5%) apresentaram rendimento superior a 40%, destacando-se o isolado 188, que apresentou rendimento de 45,8%, valor próximo ao rendimento máximo de fermentações alcoólicas, que é 53,8% (BORZANI et al., 2001). A eficiência da fermentação foi superior a 50% para a maioria dos isolados estudados, com destaque também para o isolado 188, cuja eficiência foi 85,1%. Esses resultados diferem dos relatados por Ceccato-Antonini et al. (2004). Eles avaliaram a fermentação alcoólica de três linhagens de leveduras “killer” isoladas do processo, usando caldo de cana como substrato, e observaram que a maior eficiência fermentativa foi de 21,0-40,0%, tanto quando a fermentação foi conduzida em frascos como em fermentador. Zargoc et al. (2001), estudaram a fermentação para fabricação de vinho conduzida com isolados de leveduras “killer” e observaram que as linhagens diferiram principalmente na habilidade em utilizar o açúcar presente no mosto. Esses mesmos pesquisadores constataram que duas linhagens reduziram a quantidade de açúcar residual em 98%, enquanto que na fermentação espontânea a redução de açúcar foi de 90%.

Tabela 2- Rendimento (%) e eficiência (%) da fermentação de caldo de cana por isolados de leveduras “killer”

Isolado	Rendimento (%)	Eficiência (%)
98	14,5	26,9
113	28,4	52,7
118	11,84	22,0
149	33,3	61,8
152	31,2	57,9
155	28,4	52,7
160	34,8	52,7
161	29,2	54,2
167	26,0	48,3
187	28,5	52,9
188	45,8	85,1
189	32,1	59,6
201	25,8	47,9
208	41,9	77,8
216	33,9	63,0
218	37,7	70,0

Conclusão

A possibilidade de empregar leveduras “killer” como fermento para fermentação alcoólica com a intenção de controlar o desenvolvimento dos microrganismos contaminantes, está relacionada com a concomitante capacidade de fermentar o substrato. Nesse sentido, este trabalho mostra que o isolado 188, além da presença de caráter “killer”, apresentou boas características de fermentação do caldo de cana para produção de etanol, o que o torna um microrganismo promissor para ser usado como fermento na fabricação de cachaça. No entanto, outros aspectos, entre os quais, a capacidade de expressar a atividade “killer” durante a fermentação em escala industrial e a estabilidade desse caráter durante bateladas consecutivas de fermentação, ainda devem ser avaliados.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro, e à Embrapa Agroindústria Tropical, onde parte deste trabalho foi realizado.

Referências

- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3, 293p.
- CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 169-175, 1998.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; CREMONINI, L. C. M.; REGENFUSS, C. ‘Killer’ character if yeasts isolated from ethanolic fermentations. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 3, p. 631-635, 1999.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; TOSTA, C. D.; SILVA, A. C. Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 13-23, 2004.
- CIANI, M.; FATICHENTI, F. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent do control apiculate wine yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3058-3063, 2001.
- GUTIÉRREZ, A. R.; EPIFANIO, S.; GARIJO, P.; LÓPEZ, R.; SANTAMARÍA, P. Killer yeasts: incidence in the ecology of spontaneous fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, n. 4, p. 352-356, 2001.

- HAMMOND, J. R. M. Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century – progress to date. **Yeast**, v. 11, n. 16, p. 1613-1627, 1995.
- HIDALGO, P.; FLORES, M. Occurrence of the killer character in yeasts associated with Spanish wine production. **Food Microbiology**, v. 11, n. 2 p. 161-167, 1994.
- PATARO, C.; GUERRA, J. B.; GOMES, F. C. O.; NEVES, M. J.; PIMENTEL, P. F.; ROSA, C. A. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24h fermentative cycles during the production of artisanal brazilian cachaça. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 202-208, 2002.
- PROGRAMA BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO DA CACHAÇA. Disponível em: <<http://www.cachacadobrasil.com.br>>. Acesso em: 17 mar. 2005.
- SCHMITT, M. J.; E BREINIG, F. The viral killer system in yeast: From molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 257-276, 2002.
- SILVA, G. A. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p. 112-121, 1996.
- SOARES, G. A. M.; SATO, H. H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y5004-L killer toxin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 291-297, 2000.
- ZAGORC, T.; MARÁZ, A.; CADEZ, N.; JEMEC, K. P.; PÉTER, G.; RESNIK, M.; NEMANIC, J.; RASPOR, P. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. **Food Microbiology**, v. 18, n. 4 p. 441-451, 2001.