



## **Análise da Fermentação em Bioreatores Cilindrocônicos de Bancada na Elaboração de Cerveja com Adjunto de Banana**

**Gislaine Fernandes de Matos<sup>1</sup>, José António Teixeira<sup>2</sup>, Daniel Pereira da Silva<sup>2</sup>, António Augusto Vicente<sup>2</sup>, Maria das Graças de Almeida Felipe<sup>1</sup>, João Batista de Almeida e Silva<sup>1</sup> e Giovani Brandão Mafra de Carvalho<sup>1,2</sup>.**

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo - Departamento de Biotecnologia - Escola de Engenharia de Lorena  
Caixa Posta 116 - 12602-810 Lorena - SP - Brasil - E-mail: [gislaine.matos@gmail.com](mailto:gislaine.matos@gmail.com)

<sup>2</sup>University of Minho - IBB - Institute for Biotechnology and Bioengineering - Centre of Biological Engineering  
Campus de Gualtar - 4710-057 Braga - Portugal.

### **RESUMO**

*O aumento do extrato inicial de fermentação e uso de adjuntos na substituição do malte vem sendo uma alternativa para diminuição de custos na produção de cervejas. Uma outra característica deste processo tem sido a utilização de nutrientes para aumentar a produtividade volumétrica em etanol. Pelo fato da banana ser uma fruta abundante no Brasil e ser pouco qualificada para a exportação, pode-se utilizá-la como alternativa de adjunto do malte. Neste estudo foi elaborada cerveja utilizando a banana como adjunto do malte e estudado os parâmetros fermentativos principais obtidos no ponto otimizado em bioreatores cilindrocônicos de bancada. Para isso os mostos foram fermentados à 17,5 °P e 15 °C suplementados no início da fermentação com 420 mg/L de MgSO<sub>4</sub>. A produtividade volumétrica (Q<sub>p</sub>) alcançada foi de 0,68 g/L.h no tempo de 64 h de fermentação. Essa suplementação gerou um benefício, devido ao aumento de 6 % do valor de Q<sub>p</sub>.*

**Palavras-chave:** Cerveja, Banana, Fermentação, Adjunto, Suplementação Nutricional, Bioreator Cilindrocônico de Bancada.

### **INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas, com o aumento do consumo de cerveja no Brasil e no resto do mundo, tem se observado uma significativa evolução dos conhecimentos científicos neste universo, tais como, o profundo entendimento da fisiologia celular, as técnicas de imobilização da levedura cervejeira, a fermentação e maturação em sistemas contínuos e a criação de novas estirpes com a chegada da genética molecular. Tudo isto vem beneficiando o avanço e controle do processo cervejeiro. No Brasil, duas tendências têm se destacado: a obtenção de cervejas a partir de mostos concentrados (*High Gravity Brewing*) e a elaboração de cervejas



utilizando adjuntos especiais, os quais podem aromatizar ou não as mesmas. A cerveja com banana acompanha estas duas tendências.

Assim, aliado a necessidade de maiores produtividades com menores custos de investimentos, algumas cervejarias vêm optando pelo aumento do extrato inicial de fermentação, processo que é conhecido como de alta concentração. Nesse processo, a partir da fermentação de um mosto com uma elevada concentração de açúcares, produz-se uma cerveja que posteriormente é diluída com água. As principais vantagens deste processo de mostos com altas densidades são: uma crescente capacidade de produção de cerveja através de um uso mais eficiente das instalações existentes da planta, redução de custos de energia, custos de mão de obra, limpeza e custos de efluentes, incremento da estabilidade física e das propriedades organolépticas, além de uma maior produção de álcool por unidade de extrato fermentável.

A elaboração de cervejas utilizando adjuntos especiais vem se tornando uma solução de barateamento na obtenção de cerveja devido à substituição de parte do malte, acrescentando ainda, atributos sensoriais característicos nos produtos obtidos.

Com a elaboração de mostos concentrados surge a necessidade de suplementar o mosto para diminuir a carência nutricional e aumentar a produtividade em etanol. Assim neste trabalho, foi avaliado o ponto otimizado da suplementação nutricional com  $Mg^{2+}$  do mosto cervejeiro com adjunto de banana em fermentadores cilíndricos de bancada.

## MATERIAL E MÉTODOS

O malte moído foi misturado com o suco de banana (no volume da água primária) a 35 °C de acordo com CARVALHO, 2009.

A inoculação do mosto foi realizada transferindo-se os 405 mL do inóculo do recipiente com aeração para um sistema de seis fermentadores descontínuos acoplados, conhecidos como mini-bioreatores cilíndricos, previamente a transferência do mosto elaborado.

De acordo com as condições experimentais foram transferidos 3155 mL do mosto do recipiente com aeração, de forma a se obter 3560 mL no começo da fermentação, 540 mL em cada fermentador.

A fermentação foi conduzida em fermentadores de 900 mL, com volume útil de 540 mL, provido de um banho termostático com controle e indicação digital de temperatura, e um sistema específico para tomada de amostras no fundo do fermentador. A concentração inicial do inóculo em todos os bioreatores foi de 1,19 g/L.

O tempo final de cada fermentação foi determinado quando se alcançou um valor de extrato aparente (°P) aproximadamente igual a 1 °P acima da concentração de açúcares não fermentáveis do ensaio do ponto final. Extrato aparente corresponde a concentração dos sólidos solúveis (sendo os açúcares em sua maioria), desconsiderando a variação da densidade pelo etanol formado no meio.

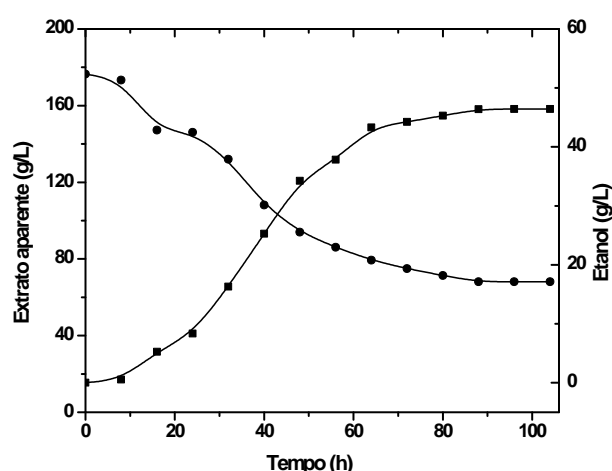
O etanol foi quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), o extrato aparente foi determinado por um refratômetro digital e os valores foram convertidos de °Brix para °Plato. A concentração celular foi determinada por uma correlação entre o peso seco e a

contagem celular em câmara de Neubauer. Estas análises obedeceram as metodologias propostas por CARVALHO, 2009.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Análise da Produção de Etanol e do Consumo de Açúcares no Ponto Ótimo

A Figura 1 demonstra as principais características da fermentação do Ponto Ótimo no mini-bioreator cilíndrico tais como o consumo de extrato aparente e a produção de etanol pela levedura.



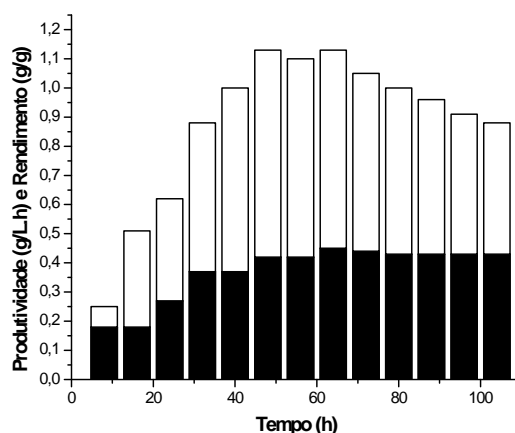
**Figura 1.** Consumo de Extrato Aparente (●) e Produção de Etanol (■), pela Levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, Durante a Fermentação do Mosto com Banana à 17,50 °P e 15 °C, no Ponto Otimizado da Adição de Nutriente.

Nessa figura, pode-se observar duas etapas distintas: uma primeira etapa até o tempo de 8h, onde a levedura consumiu uma quantidade muito pequena de extrato aparente (3,07 g/L) produzindo apenas 1,21 % do etanol total, e uma segunda etapa após 8 h, onde a produção de etanol esteve profundamente relacionada com o consumo de substrato. Na primeira etapa observa-se uma fase lag muito curta com uma concentração inicial de açúcares muito elevada 176,40 g/L. A duração dessa fase varia principalmente com a concentração do inoculo, ou seja, com a concentração celular inicial, com a idade do microrganismo e com o seu estado fisiológico (HISS, 2001). Estando o mosto com banana aerado nesta fase, pode-se explicar o surgimento do etanol pelo *efeito Crabtree*. Já foi observado que *Saccharomyces cerevisiae*, em presença de glicose mesmo em condições estritamente aeróbias, possui metabolismo do tipo respiro-fermentativo. Esse comportamento metabólico é provocado por este efeito conhecido como *efeito Crabtree* ou *repressão catabólica*. Esse efeito se pronuncia em condições onde a concentração de glicose ultrapassa um valor limite. O mecanismo

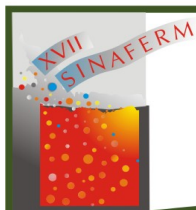
responsável pela repressão catabólica pode ser bastante complexo, mas estudos mostram que ocorre principalmente através do forte efeito repressivo da glicose sobre a atividade de enzimas respiratórias e também, possivelmente, pela inibição da expressão genética de enzimas constituintes da via respiratória, fazendo com que parte do piruvato que não pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs, seja reduzido a etanol pelo processo fermentativo (Bakker *et al.*, 2001).

Analisando a Figura 2, verifica-se um aumento da produtividade volumétrica e do rendimento em etanol em função do tempo de fermentação do mosto com banana. Um comportamento similar foi encontrado por MARC *et al.* (1999). Segundo estes autores, o aumento do rendimento em etanol durante a fermentação, resulta da diminuição do rendimento em biomassa ( $Y_{x/s}$ ). O fator que também pode influenciar na diminuição deste ( $Y_{x/s}$ ) é a manutenção celular, ou seja, além do substrato estar sendo utilizado na formação dos produtos de fermentação, ele também é destinado ao desempenho de funções vitais que compreendem o trabalho osmótico para manter os gradientes de concentração de substâncias entre o interior da célula e o seu meio ambiente, as modificações de componentes celulares que requeiram energia e a mobilidade celular. De acordo com HISS (2001), dificilmente são observados valores constantes dos fatores de conversão, em fermentações industriais. Estas observações também puderam ser evidenciadas nestes ensaios laboratoriais utilizando mini-bioreatores cilíndricos.

A produtividade volumétrica em etanol na fermentação do mosto de alta densidade com adjunto de banana atingiu um valor máximo de 0,68 g/L.h, a partir do tempo de 64 h. O rendimento aparente em etanol foi máximo neste mesmo tempo, alcançando o valor de 0,45 g/g. Este resultado foi superior ao rendimento em etanol, próximo de 0,40 g/g, obtido por DRAGONE *et al.* (2002), na fermentação conduzida em fermentadores cilindro-cônicos de 180 L com volume útil de 140 L, utilizando mostos de 17,50 °P, fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* lager à 12,5 °C.



**Figura 2.** Produtividade Volumétrica (□) e Rendimento em Etanol (■), pela Levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, Durante a Fermentação do Mosto com Banana à 17,50 °P e 15 °C, no Ponto Otimizado da Adição de Nutriente.

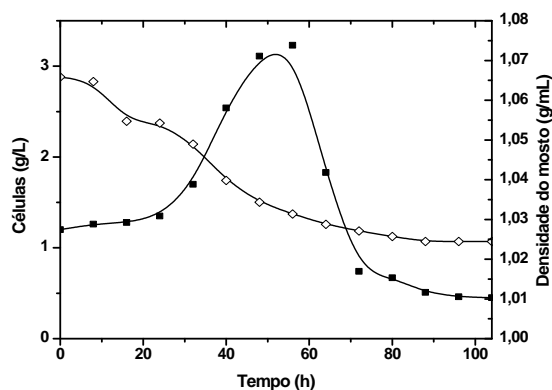


Outra característica ligada ao consumo do substrato e a formação de produtos é a queda gradual da densidade do mosto com banana no decorrer da fermentação (Figura 3). Este fenômeno está inteiramente associado tanto ao consumo do substrato para a construção e manutenção celular como na formação de produtos menos densos e/ou voláteis. Um bom exemplo é a formação de  $\text{CO}_2$  que provém da fermentação dos açúcares. Uma parte deste gás fica solúvel e outra deixa o mosto. Sabe-se que em concentrações apreciáveis no bioreator, o  $\text{CO}_2$  inibe a fermentação. Este composto é recolhido da parte superior do reator e podendo ser reutilizado mais tarde com a finalidade de carbonatação da cerveja nas etapas finais.

A Figura 3 também demonstra as diferentes fases do crescimento das leveduras, durante a fermentação do mosto com banana de 17,50 °P à 15 °C. Nas primeiras 8h de fermentação, observa-se uma fase de latência ou fase lag, que se segue imediatamente após a inoculação do meio com a levedura. Trata-se de um período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. Esta fase é acrescida de um período de transição das 8 às 32 h em que se observa o início da reprodução microbiana propriamente dita. Assim, há um aumento gradual tanto da velocidade de reprodução como da velocidade específica de crescimento. No fim desse período, a população inteira de leveduras começa a se dividir em um intervalo regular médio de tempo (HISS, 2001).

O período entre as 32 e 50 h de fermentação apresenta um rápido crescimento celular, correspondente a fase logarítmica ou exponencial. Durante este intervalo de tempo, a velocidade específica de crescimento é constante e máxima (HISS, 2001). Ao lado da velocidade específica de crescimento, a fase exponencial também é caracterizada pelo tempo de geração, que é o intervalo de tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular. Aplicando-se a equação ( $t_g = 0,693/\mu_{xMáx}$ ), pode-se obter o tempo de geração.

O progressivo aumento na concentração das células em suspensão foi interrompido após 50 horas de fermentação do mosto com banana. Pode-se observar então um período estacionário das 50 às 53 h, conhecido como fase estacionária. Nessa fase, a concentração de leveduras atinge o valor máximo e constante (3,13 g/L), onde há um balanço entre a velocidade de crescimento e a velocidade de morte da levedura, ocorrendo também modificações bioquímicas na célula.





**Figura 3.** Células Totais em Suspensão (■), da levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, e Densidade do mosto com banana (◇) durante a fermentação a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.

Após as 53 h de fermentação do mosto com banana, observou-se uma queda gradual da concentração das leveduras em suspensão com o decorrer do tempo. Esta fase é denominada fase morte, declínio ou lise celular. Nesta fase o valor da concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de formação de novas leveduras. Ocorre durante o declínio uma lise celular, autólise ou rompimento das leveduras, provocado pela ação de enzimas intracelulares. Nesta fase ocorre a floculação das leveduras no mosto cervejeiro e esta floculação tem início quando a glicose é removida do meio (ENGASSER, 1981).

### CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a suplementação nutricional favoreceu a produtividade volumétrica em etanol (Q<sub>p</sub>) alcançando 0,68 g/L.h no tempo de 64 h de fermentação. Essa suplementação no ponto otimizado gerou um benefício devido ao aumento de 6% do valor de Q<sub>p</sub>.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, D. A.; KIRSOP, B. H. (1973) Rapid beer production and conditioning using a plug fermentor. Journal of the Institute of Brewing, London, v. 79, p. 487-494.
- CARVALHO, G. B. M. (2009) Obtenção de Cerveja Usando Banana como Adjunto e Aromatizante. 2009. Tese de doutorado, 163f, (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Universidade de São Paulo, Lorena. 2009.
- DRAGONE, G. (2002) Estudo Cinético do Processo Fermentativo de Produção de Cervejas em Mostos Concentrados. Lorena: FAENQUIL/DEBIQ. 2002. p.111, (Dissertação de mestrado).
- ENGASSER, J.M., MARC, I., MOLL, M., DUTEURTRE, B. (1981) Kinetic Modelling of Beer Fermentation. In: EUROPEAN BREWERY CONVENTION, Copenhagen. Proceedings of the 18th Congress, London, IRL PRESS. p.579-586.
- HISS, H. (2001) Cinética de Processos Fermentativos. In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard Blücher. v. 2. P. 93-122.
- MARC, I., ENGASSER, J.M., MOLL, M., DUTEURTRE, B (1999) Kinetics of Yeast Growth and Metabolism in Beer Fermentation. In: Foundations of Biochemical Engineering. BLANCH, H.W., PAPOUTSAKIS, E.T., STEPHANOPOULOS, G., Washington, American Chemical Society, P.139-154.