

**Avaliação da capacidade fermentativa da *Saccharomyces Cerevisae* e *Saccharomyces Pastoris* imobilizada para produção de cerveja: Perfil fermentativo, ciclos e produtividade**

**Evaluation of the fermentative capacity of *saccharomyces cerevisae* and *saccharomyces pastoris* immobilized for beer production: Fermentative profile, cycles and productivity**

DOI:10.34117/bjdv6n6-356

Recebimento dos originais: 08/05/2020

Aceitação para publicação: 15/06/2020

**Úrsula Tereza Cordeiro Coutinho**

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFRPE

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Departamento de Ciências do Consumo, Rua Dom Manoel de Medeiros, SN, 52.052-360, Recife, Pernambuco, Brasil

**Rafael Charles Vasco**

Graduação em Engenharia de Alimentos/UFPE

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: Departamento de Engenharia Química, Laboratório de Bioprocessos. Av.Arthur de Sá, SN, 50.740-521, Cidade Universitária – Recife – PE

**Stefano Sabino Vivas da Silva**

Graduação em Gastronomia/UFRPE

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Departamento de Ciências do Consumo, Rua Dom Manoel de Medeiros, SN, 52.052-360, Recife, Pernambuco, Brasil

**Enayde de Almeida Melo**

Doutora em Nutrição/UFPE

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Departamento de Ciências do Consumo, Rua Dom Manoel de Medeiros, SN, 52.052-360, Recife, Pernambuco, Brasil

**Andreolina Maria Pinheiro Santos**

Doutor em Engenharia de Alimentos/UNICAMP

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: Departamento de Engenharia Química, Laboratório de Bioprocessos. Av.Arthur de Sá, SN, 50.740-521, Cidade Universitária – Recife – PE

E-mail: lia\_pinheiro@yahoo.com.br

**RESUMO**

Este trabalho visa à aplicação industrial do processo fermentativo utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Ale fermentação) e *Saccharomyces pastoris* (Lager fermentação) imobilizada em alginato de cálcio. Os resultados demonstraram que a imobilização não afetou o desempenho fermentativo quando comparado com ao desempenho das leveduras na forma livre. Em relação aos ciclos de fermentação também foi verificado que os quatro ciclos para levedura na forma livre e dois ciclos para levedura imobilizada realizados no período de 06 meses os valores de pH, °brix e concentração de álcool não apresentaram alterações que possam ser consideradas significativas. Os resultados obtidos neste estudo indicam a viabilidade do uso da levedura imobilizada, indicando desta forma a importância da continuidade da pesquisa para otimizar parâmetros e processos.

**Palavras-chave:** alta fermentação, baixa fermentação, imobilização, cerveja, produtividade.

**ABSTRACT**

This work aims at the industrial application of the fermentative process using the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* (Ale fermentation) and *Saccharomyces pastoris* (Lager fermentation) immobilized in calcium alginate. The results showed that immobilization did not affect the fermentative performance when compared to the performance of yeasts in free form. Regarding the fermentation cycles, it was also verified that the four cycles for yeast in free form and two cycles for immobilized yeast performed in the period of 06 months the values of pH, °brix and alcohol concentration did not present alterations that can be considered significant. The results obtained in this study indicate the feasibility of using immobilized yeast, thus indicating the importance of continuing the research to optimize parameters and processes.

**Keywords:** high fermentation, low fermentation, immobilization, beer, productivity.

**1 INTRODUÇÃO**

As recentes mudanças nos hábitos de consumo no Brasil têm impulsionado o crescimento do mercado de cervejas artesanais, devido à busca por variedades e novos sabores (KOCH; SAUERBRONN, 2019). Essa demanda foi atendida por microcervejarias locais e cervejarias domésticas porque elas têm uma capacidade superior de atender a nichos e mercados especializados em que economias de escala e escopo não são tão importantes, operando com estratégias agressivas de marketing e inovação (CABRAS; BAMFORTH, 2016).

Mesmo existindo uma grande variedade de processos para produção de cervejas, todos se baseiam na tecnologia tradicional que utilizam cevada, lúpulo, água e a levedura na forma livre. Apesar da simplicidade das matérias primas envolvidas é importante lembrar que a produção de cerveja é muito mais complexa. Envolvem reações químicas e metabólicas que influenciam no sabor, aroma e cor (RODMAN; GEROGIORGIS, 2016).

A tecnologia tradicional de fermentação de cerveja usa células de levedura livremente suspensas para fermentar o mosto usando uma variedade de linhagens de levedura para produzir diferentes produtos de cerveja (LODOLO et al., 2008; VERBELEN et al., 2009).

Métodos de imobilização incluem aprisionamento físico dentro de uma matriz porosa, fixação ou adsorção a um transportador pré-formado, auto agregação por agentes de floculação ou reticulação e células contidas atrás de uma barreira. Todos esses métodos têm a intenção de reter altas concentrações de células dentro do biorreator, levando ao aumento da produtividade volumétrica do sistema e à redução dos custos de fermentação. Apesar das vantagens econômicas desse processo, ainda não foi totalmente entendido quais fatores afetam negativamente a qualidade sensorial do produto desenvolvido pela fermentação contínua (ALMONACID et al., 2012; PILKINGTON et al., 1998).

Nas duas últimas décadas verifica-se um grande crescimento em pesquisas envolvendo o processo de imobilização de leveduras para produção de cervejas, além de envolver novas características à cerveja, como adição de goji berries (DUCRUET et al., 2017), otimização por simulação dinâmica (RODMAN; GEROGIORGIS, 2016), avaliação de suportes para imobilização de leveduras e sua eficácia (KOURKOUTAS et al., 2004), influência da levedura imobilizada na redução de aldeído (VAN IERSEL et al., 2000). Estas pesquisas podem ser justificadas pelo crescimento de cervejarias, devido ao aumento do consumo desta bebida, e pela estimativa, em 2015, de 500 bilhões de dólares do mercado global de cerveja (RODMAN; GEROGIORGIS, 2016). Considerando que a levedura representa um dos principais custos no processo de produção de cervejas, a levedura imobilizada poderá se tornar uma opção viável industrialmente.

Portanto, diante do exposto, este trabalho que faz parte da linha de pesquisa do Laboratório de Bioprocessos (DEQ/UFPE) teve como objetivo avaliar a capacidade e viabilidade fermentativa da *Saccharomyces cerevisiae* (alta fermentação – Ale) e *Saccharomyces pastoris* (baixa fermentação – larger) imobilizada em alginato de cálcio.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi realizado no Laboratório de Bioprocessos (DEQ/UFPE) empregando processo fermentativo de baixa e alta. Para o processo de alta (Ale) fermentação foi utilizada água mineral, malte tipo Pilsen, lúpulo Halertau e *Saccharomyces cerevisiae* US-05 (Fermentis/França). Para o de baixa (Lager) fermentação *Saccharomyces pastorianus* W34/70 liofilizada (Fermentis/França) para produção de uma cerveja estilo lager, malte e

lúpulo todos adquiridos em loja de insumos para cerveja. Alginato de sódio (Dinâmica), Cloreto de Cálcio (Merck), glicose (Dinâmica).

## 2.1 PREPARO DO INÓCULO

O procedimento foi executado inoculando 1.5g de levedura liofilizada *Saccharomyces pastoris* (Fermentis/França) e *Saccharomyces cerevisiae*. Para o cálculo da quantidade de levedura ideal (1,5 milhões de célula/ml/°P), foi utilizado o aplicativo *Brewersfriend* (Android). Assim o inóculo, para as duas fermentações, foi preparado em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 200mL de mosto e 1,5 g (com  $1,86 \times 10^5$  células/mL) da levedura liofilizada. O sistema foi inicialmente mantido sob agitação por 20 minutos para aeração e crescimento celular. O mesmo procedimento foi utilizado para ativação da levedura para imobilização.

## 2.2 IMOBILIZAÇÃO DA LEVEDURA

A técnica de imobilização em alginato de sódio foi baseada na metodologia de Santos e Maugeri (2007) para o preparo do gel. A adição de 150 mL inóculo (item 2.1) foi realizada mantendo o sistema em agitação baixa (100 rpm) e a 30°C. Após 10-15 minutos de agitação (100 rpm) baixa, a mistura foi gotejada em solução de cloreto de cálcio para reticulação e formação das esferas contendo a levedura imobilizada (Figura 1B). O mesmo procedimento foi realizado tanto para levedura para alta quanto baixa fermentação (SANTOS; MAUGERI, 2007).

Figura 1 – Microcápsulas de alginato de cálcio sem levedura (A) Microcápsula de alginato de cálcio com leveduras (B)



## 2.3 BRASSAGEM/MOSTURAÇÃO

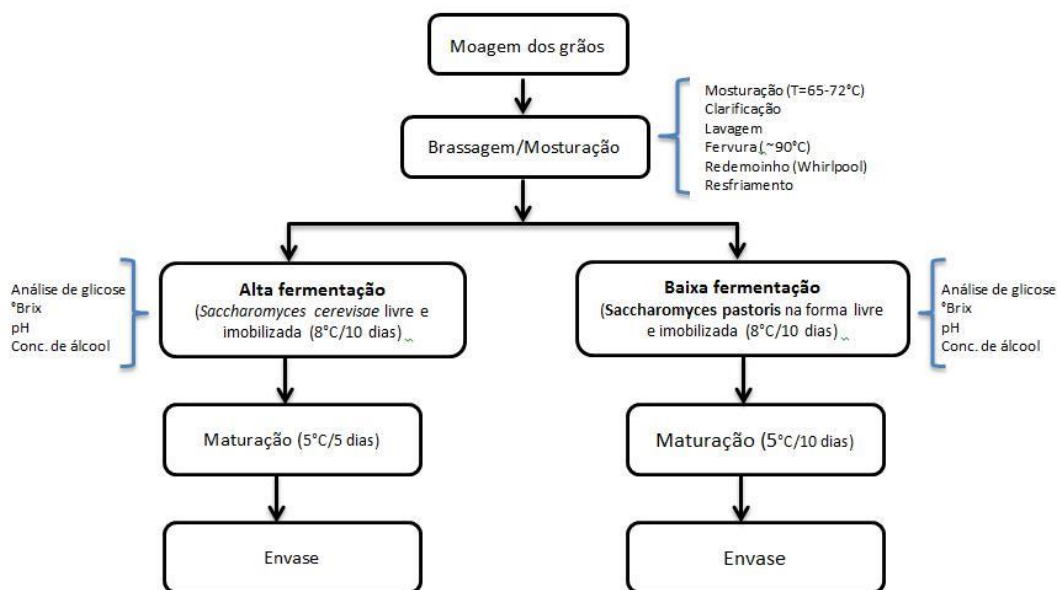
A mosturação, etapa necessário para ativar as enzimas presentes no malte para produção de açúcares fermentescíveis foi realizada em tanques de fermentação de 1L aonde

foram adicionados o malte e água. O sistema com agitação constante foi mantido na faixa de temperatura de 65 – 72°C por 60 minutos. Amostras foram retiradas em intervalo de 10min para determinação do pH e °Brix.

## 2.4 FERMENTAÇÃO

O processo fermentativo foi realizado segundo o fluxograma (Figura 02). A fermentação foi iniciada com a inoculação do mosto, com o inóculo do item 2.1. O mosto com o inóculo foi mantido sob agitação (260 rpm), em uma mesa agitadora orbital (Quimis), durante 20 a 30 minutos, para aeração e crescimento celular. Finalizando o tempo de agitação, adaptação e aeração, o inóculo foi adicionado no reator na proporção 1:10 (inóculo: mosto de fermentação). A fermentação foi conduzida na faixa de temperatura de 8-12°C e amostras foram retiradas para determinação de açúcar, álcool, pH.

Figura 2 - Fluxograma do processo de produção de cerveja de alta e baixa fermentação com a levedura nas formas livre e imobilizada.



## 2.4 ANÁLISES QUANTITATIVAS

As determinações analíticas foram realizadas da seguinte forma: A concentração da glicose foi determinada por °Brix (mais utilizada nas cervejarias) e pelo método colorimétrico do açúcar redutor (DNS). A concentração do teor alcoólico (ABV) foi realizada utilizando o Software BEERSMITH™ (Home Brewing Software) e refratômetro.

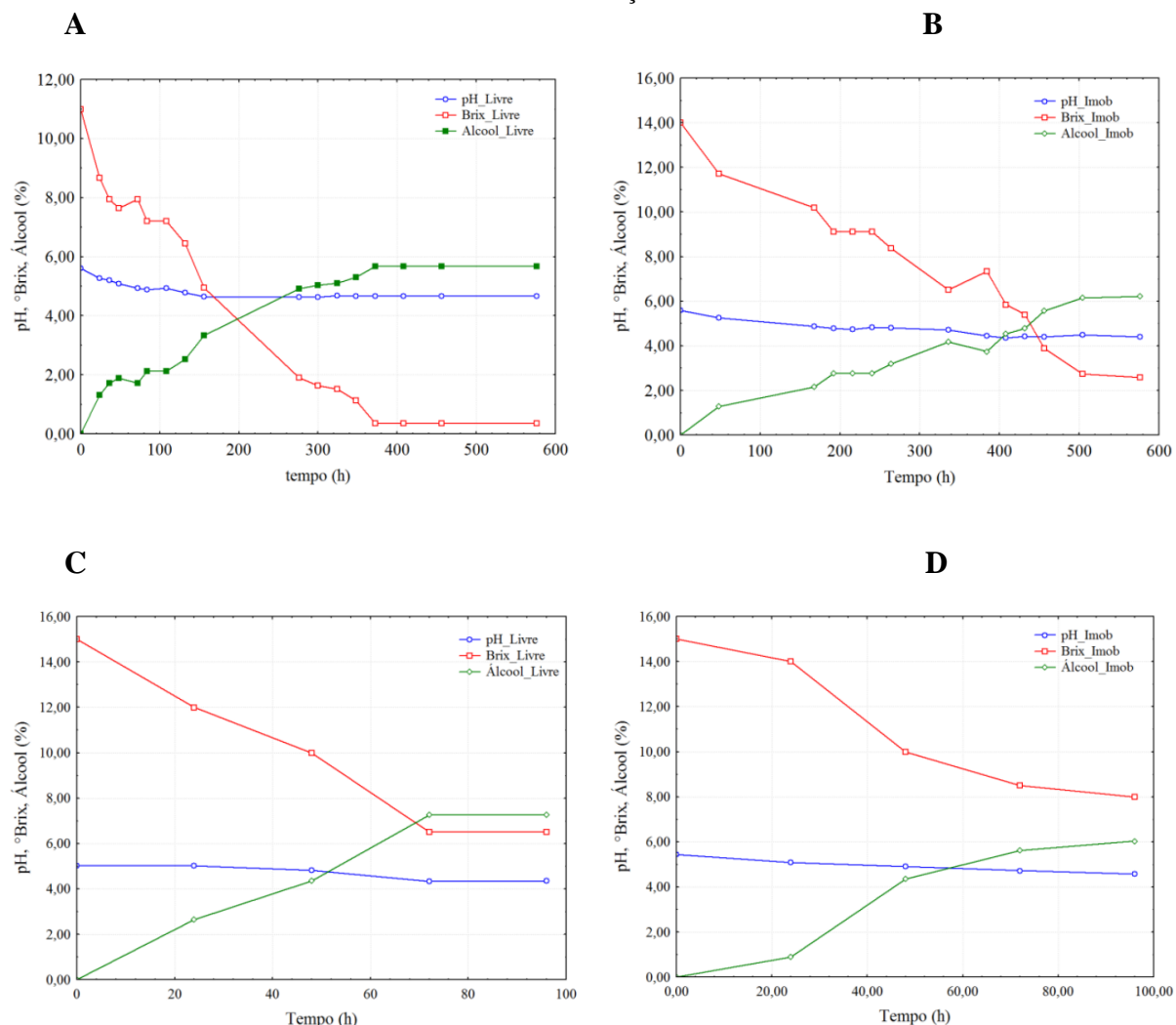
A determinação da produtividade utilizou a relação da conversão de glicose em etanol. Para cada 100g de glicose produz 48,5 g de etanol (AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHIMIDELL, W., LIMA, 2001).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 FERMENTAÇÃO COM LEVEDURA LIVRE E IMOBILIZADA

Os resultados do perfil fermentativo em função do pH, açúcar, álcool para alta fermentação com a *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre (Figura 3A) e imobilizada (Figura 3B), e os resultados do perfil da baixa fermentação com *Saccharomyces pastoris* nas formas livre (Figura 3C) e imobilizada (Figura 3D) demonstram não apresentar diferenças na velocidade de fermentação entre os dois processos com a levedura imobilizada e livre, nos dois tipos de fermentação alta (Figura 3A e B) e baixa (Figura 3C e D). Estudos realizados por Naydenova et al. (2014) observou o mesmo comportamento quando realizaram a fermentação da produção de cerveja de alta fermentação nas formas livre e imobilizada.. Outros estudos publicados com a levedura imobilizada, como Van Iersel et al. (2000), Yamauchi et al. (1995), Tata et al. (1999), Norton e Amore (1994), Mensouri et al. (1996), Pilkington et al. (1998), Almonacid et al. (2012), verificaram que a imobilização não afetava o desempenho da levedura no processo fermentativo, como verificado no presente estudo. Entretanto é importante ressaltar, a necessidade de estudos mais sistemáticos de modo a averiguar efeitos de difusividade, formação de compostos nos dois processos, o efeito do aumento do tamanho da esfera com a levedura imobilizada durante a fermentação, as condições de fermentação em reator de batelada, contínuo, coluna, o uso das leveduras imobilizadas na fermentação primária e secundária ou apenas na secundária.

Figura 3 - Perfil fermentativo do pH, açúcar, álcool para alta fermentação com a *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre (A) e imobilizada (B), baixa fermentação com *Saccharomyces pastoris* nas formas livre (C) e imobilizada (D), em função do tempo de 100 hora para alta fermentação e 600 horas para baixa fermentação.



### 3.1.1 Ciclos Fermentativos e Produtividade – *Saccharomyces cerevisiae*

Para avaliar a vitalidade da levedura foram realizados quatro ciclos fermentativos durante um período de 06 meses. Com a levedura na forma livre 04 ciclos foram realizados: ciclo 01 (17/10/2017), ciclo 02 (23/10/2017), ciclo 03 (20/02/2018) e ciclo 04 (03/04/2018) e para a levedura imobilizada dois ciclos: ciclo 01 (20/02/2018) e ciclo 02 (03/04/2018). Os resultados da concentração de álcool e °Brix encontram-se nas Figuras 4A e 4B, respectivamente. Evidencia-se que todas as fermentações apresentaram resultados similares, ressaltando que, com a leveduras imobilizada, as células do inóculo do ciclo 2 foram as mesmas do ciclo 1, demonstrando a viabilidade do reuso da levedura o que pode refletir na redução do custo de produção. Com a levedura na forma livres, a cada ciclo



fermentativo novo mosto foi preparado, podendo justificar o menor valor do °Brix obtido no ciclo 2. Na Figura 5, evidencia-se que houve similaridade de produtividade em cada ciclo fermentativo dos processos empregando tanto levedura imobilizada como na forma livre.

Figura 4 –Concentração de álcool (A) e °Brix (B) dos ciclos fermentativos com *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre e imobilizada.

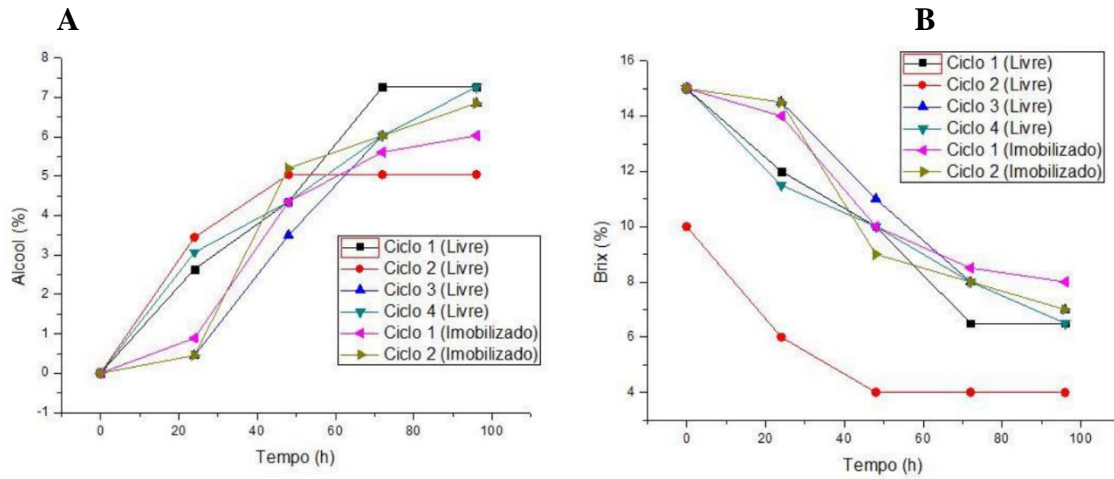
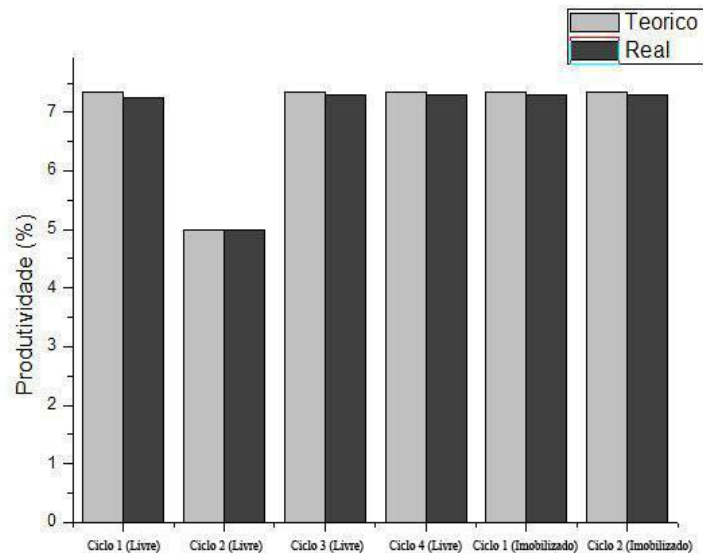


Figura 5–Produtividade dos ciclos fermentativos com *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre e imobilizada.





**4 CONCLUSÃO**

A produção de cerveja utilizando células nas formas livre e imobilizada não afetou o desempenho da levedura. Os ciclos fermentativos realizados durante 06 meses com a levedura imobilizada e livre demonstraram perfil similares de fermentação em relação ao pH, consumo de açúcar e produção de álcool, com boa produtividade e vitalidade. Estudos mais sistemáticos tornam-se necessário para melhorar o desempenho em relação à eficiência, produtividade, efeitos de difusão e o aumento do tamanho da esfera imobilizada, parâmetros importantes para a aplicação industrial. Ressalta-se, portanto, que os resultados obtidos demonstraram viabilidade na continuidade dos estudos com levedura imobilizada tanto para baixa quanto alta fermentação.

**REFERÊNCIAS**

- ALMONACID, S. F. et al. A Comparative Study of Stout Beer Batch Fermentation Using Free and Microencapsulated Yeasts. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 750–758, 2012.
- AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHIMIDELL, W., LIMA, U. . **Biotecnologia Industrial na produção de alimentos**. [s.l: s.n.].
- CABRAS, I.; BAMFORTH, C. From reviving tradition to fostering innovation and changing marketing: the evolution of micro-brewing in the UK and US, 1980–2012. **Business History**, v. 58, n. 5, p. 625–646, 2016.
- DUCRUET, J. et al. Amber ale beer enriched with goji berries – The effect on bioactive compound content and sensorial properties. **Food Chemistry**, v. 226, p. 109–118, 2017.
- KOCH, E. S.; SAUERBRONN, J. F. R. “To love beer above all things”: An analysis of Brazilian craft beer subculture of consumption. **Journal of Food Products Marketing**, v. 25, n. 1, p. 1–25, 2019.
- KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377–397, 2004.
- LODOLO, E. J. et al. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1018–1036, 2008.
- MENSOURI, N. A. et al. Application of immobilized yeast cells in the brewing industry. p. 661–671, 1996.
- NAYDENOVA, V. et al. Encapsulation of brewing yeast in alginate/chitosan matrix: Lab scale optimization of lager beer fermentation. **Biotechnology and Biotechnological**

**Equipment**, v. 28, n. 2, p. 277–284, 2014.

NORTON, S.; AMORE, T. D. Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing. v. 16, n. September 1993, p. 365–375, 1994.

PILKINGTON, P. H. et al. Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, n. 1, p. 19–31, 1998.

RODMAN, A. D.; GEROGIORGIS, D. I. Dynamic Simulation and Visualisation of Fermentation: Effect of Process Conditions on Beer Quality. **IFAC-PapersOnLine**, v. 49, n. 7, p. 615–620, 2016.

SANTOS, A. M. P.; MAUGERI, F. Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 2, 2007.

TATA, M. et al. Immobilized Yeast Bioreactor Systems for Continuous Beer Fermentation. p. 105–113, 1999.

VAN IERSEL, M. F. M. et al. Influence of yeast immobilization on fermentation and aldehyde reduction during the production of alcohol-free beer. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 8, p. 602–607, 2000.

VERBELEN, P. J. et al. Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 155–167, 2009.

YAMAUCHI, Y. et al. Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor. 2. Balance of total diacetyl reduction and regeneration. **Journal of Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 109–116, 1995.