



# INOVAÇÕES NA PRODUÇÃO DE CERVEJAS

Fermentação contínua utilizando leveduras imobilizadas em suporte natural obtido a partir do bagaço de malte

Fotografias e ilustrações cedidas pelos autores

O processo convencional de produção de cerveja possui uma história extremamente longa e pode ser reconhecido como um exemplo típico de biotecnologia tradicional. Porém, como as cervejarias modernas precisam ser cada vez mais eficientes para sobreviver em um mundo competitivo e globalizado, existe atualmente um grande interesse em desenvolver processos inovadores que possam ser realizados com um menor custo, sem afetar a qualidade do produto final.

Nesse contexto, a Microcervejaria do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena (**Figura 1**), vem desde 1997 estabelecendo linhas de pesquisa baseadas no estudo de novas tecnologias para a produção de cervejas e aproveitamento dos subprodutos das cervejarias e malterias.

Os projetos de pesquisa contam com os apoios das agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq; e com colaborações das empresas Malteria do Vale, Corn Products Brasil, Walerstein Industrial e Comercial e JohnsonDiversey. A partir do ano 2003 foi incorporada às atividades da Microcervejaria uma linha de pesquisa que trata sobre a possibilidade de aproveitar o principal subproduto das cervejarias (o bagaço de malte) como suporte natural de leveduras durante a elaboração de cervejas pelo processo contínuo.

A produção de cerveja pelo processo contínuo utilizando leveduras imobilizadas representa uma das inovações tecnológicas mais promissoras para a indústria cervejeira, pois além de reduzir o tempo e o custo de produção, requer baixos investimentos quando comparada com a fermentação descontínua tradicional (Brányik et al., 2001). No entanto, para que essa tecnologia possa ser implementada em escala industrial, algumas limitações tais como: problemas relacionados com o sabor da cerveja, limitações difusionais à transferência de massa, alterações na fisiologia e metabolismo das células imobilizadas, e custo do suporte de imobilização, necessitam ainda ser superadas (Pilkington et al., 1998).

O custo do suporte de imobilização das leveduras é o fator de maior limitação econômica para a implantação do processo contínuo em escala industrial (Linko et al., 1998). Al-

guns exemplos de suportes que têm sido utilizados para a imobilização de diferentes espécies de *Saccharomyces* incluem: terra de diatomácea, rochas vulcânicas, aço inoxidável, vidro poroso, DEAE-celulose, cubos de poliu-retano, sílica porosa, cavacos de madeira e matrizes de células de plantas (Masschelein, Ryder & Simon, 1994). No entanto, a utilização de suportes de baixos custos baseados em subprodutos industriais constitui uma alternativa interessante para imobilização, devendo ser também avaliada.

O bagaço de malte (**Figura 2**) representa cerca de 85% do total de subprodutos gerados em uma cervejaria, sendo que para cada 100 L de cerveja produzida, são obtidos aproximadamente 20 kg de bagaço (Reinold, 1997). Somente no ano de 2002, as cervejarias brasileiras geraram cerca de 1,7 milhões de toneladas de bagaço de malte, e seu principal uso, ainda atualmente, é como ração animal (Mussat-



**Figura 1.** Microcervejaria da Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL)

## Giuliano Dragone

Engenheiro Químico, Mestre em Biotecnologia Industrial  
Doutorando do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena – FAENQUIL – cep: 12.600-970  
Lorena – SP  
gdragone@debiq.fauenquil.br

## Solange Inês Mussatto

Engenheira Industrial Química, Mestre em Biotecnologia Industrial  
Doutoranda do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena – FAENQUIL – cep: 12.600-970  
Lorena – SP  
solange@debiq.fauenquil.br

## João Batista de Almeida e Silva

Doutor em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela USP  
Professor e Pesquisador do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena – FAENQUIL – cep: 12.600-970  
Lorena – SP  
joabatista@debiq.fauenquil.br



**Figura 2.** Bagaço de malte gerado nas cervejarias

to, Dragone & Roberto, 2006) devido ao elevado teor de proteínas e fibras presentes em sua composição (cerca de 20% e 70%, respectivamente) (Hernández et al., 1999). Recentemente, o bagaço de malte tem sido considerado um material de grande potencial para uso como suporte de imobilização de leveduras quando comparado com outros materiais já utilizados como suporte na fermentação contínua de cerveja. Isto porque além de ser barato, o bagaço de malte apresenta grau alimentício, é estável e permite ser regenerado, esterilizado e preparado de maneira simples (Brányik et al., 2002).

Além da escolha do tipo de suporte, a seleção de um determinado tipo ou configuração de reator é também outro parâmetro de grande importância na implantação do sistema contínuo de fermentação com células imobilizadas (Tata et al., 1999). Nesse sentido, os reatores airlift de tubos concêntricos constituem um dos modelos mais promissores, pois permitem uma mistura adequada do meio melhorando a transferência de massa e calor, apresentam uma construção simples e requerem um baixo consumo de energia (Pilkington et al., 1998).

O presente trabalho trata sobre o desempenho da fermentação de cerveja pelo processo contínuo, com leveduras imobilizadas em bagaço de malte, em um reator airlift com circulação interna.

## METODOLOGIA

### Preparo do mosto cervejeiro

O mosto cervejeiro original com uma concentração de extrato igual a 11,3°P utilizado durante a fermentação contínua,

foi preparado na Microcervejaria do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena (SP) segundo metodologia descrita por Dragone (2002). O mosto diluído, com concentração de extrato igual a 7,5°P, foi obtido diluindo o mosto original com água destilada. A unidade grau Plato (°P), comumente utilizada nas cervejarias, é definida como as gramas de extrato para cada 100 gramas de mosto, à 20°C.

### Microrganismo e cultivo do inóculo

A levedura cervejeira *Saccharomyces cerevisiae* tipo *lager* foi o microrganismo empregado nos experi-

mentos. A levedura foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio sintético, em condições aeróbicas, em um agitador de movimento rotacional a 200 rpm, 30°C durante 30 h. O meio sintético apresentava a seguinte composição (em g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,4; extrato de levedura, 1,0; adjunto com alta concentração de maltose (MOR-REX 1557), 80,0. De acordo com o fabricante, o adjunto MOR-REX 1557 possui os açúcares: dextroses, máx 12%, maltose, mín 42%, maltotriose, mín 10% e dextrinas, máx 28%. Meio sintético com a mesma composição foi também utilizado no início do processo fermentativo.

### Preparo do suporte

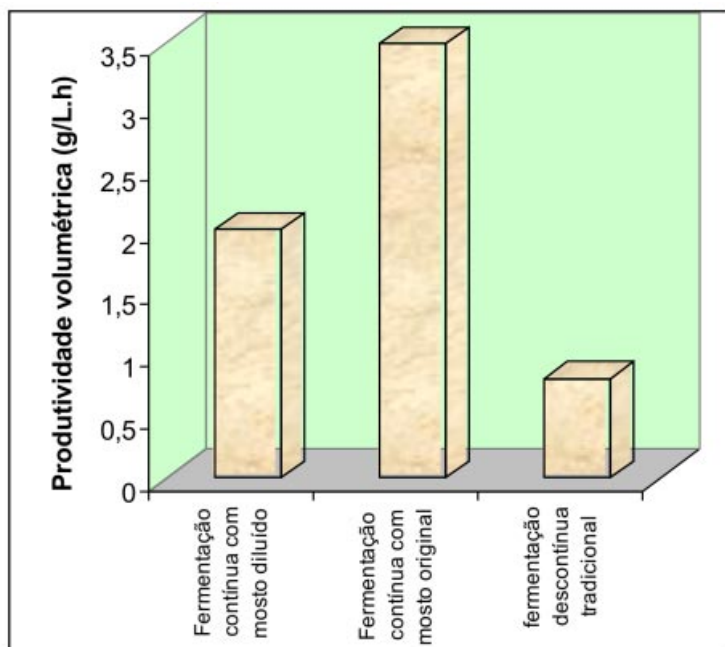
O bagaço de malte seco (90 g, 10% de umidade) foi tratado com 1,5 L de solução de NaOH 2% (p/v), a 120 rpm, 30°C durante 24 h. Posteriormente, o material foi lavado com água até pH neutro, secado em estufa a 50°C, moído e peneirado. As partículas que passaram em peneira de 16 mesh (abertura de 1,0 mm) e que foram retidas em peneira de 28 mesh (abertura de 0,6 mm), foram selecionadas para uso como suporte de imobilização durante a fermentação contínua.

### Condições da fermentação contínua

Os ensaios foram realizados em um reator airlift cilíndrico de tubos con-

**Tabela 1.** Parâmetros fermentativos resultantes da alimentação do reator com mosto diluído e original, considerando 290 h e 362 h de fermentação, respectivamente.

	<b>Mosto diluído (7,5°P)</b>	<b>Mosto original (11,3°P)</b>
Taxa de diluição ( $\text{h}^{-1}$ )	0,04	0,04
Tempo de residência (h)	25	25
Extrato aparente (°P)	2,4	2,6
Extrato real (°P)	3,3	4,2
Grau aparente de fermentação (%)	69	77
Grau real de fermentação (%)	57	64
Células imobilizadas (g cel/g sup)	0,31	0,37
Células livres (g/L)	3,65	4,74
Etanol (g/L)	21,1	36,5
pH	4,08	4,15



**Figura 3.** Produtividade volumétrica da fermentação contínua com mosto diluído e original, comparada com a fermentação descontínua

cêntricos (capacidade total: 7 L), empregando um volume de trabalho de 3,7 L. A aeração foi efetuada com ar filtrado (0,8 – 1,0 L/min) através de um tubo de 1 mm de diâmetro. A temperatura da fermentação foi mantida constante a 15°C, colocando o reator dentro de uma incubadora refrigerada.

#### Procedimentos analíticos

A concentração de células imobilizadas no suporte foi determinada de acordo com Brányik et al. (2002). As células livres em suspensão (não imobilizadas) foram determinadas por peso seco a 105°C. As concentrações de extrato aparente e real no mosto (°P) e de etanol (% v/v) foram medidas em um equipamento específico para análise de cervejas (Beer Analyser 2, ANTON-PAAR, Austria).

#### Parâmetros fermentativos

Para avaliar o desempenho da fermentação com os mostos diluído e original, foram considerados os seguintes parâmetros:

a) Taxa de diluição ( $D$ ) =  $F/V$ , onde  $F$  é a vazão volumétrica de alimentação do meio (L/h) e  $V$  o volume de meio no reator (L).

b) Tempo de residência ( $t$ ) =  $1/D$ .

c) Extrato aparente ( $E_a$ ) é a concentração de extrato no meio sem correção pelo etanol.

d) Extrato real ( $E_r$ ) é a concentração de extrato no meio com correção pelo etanol.

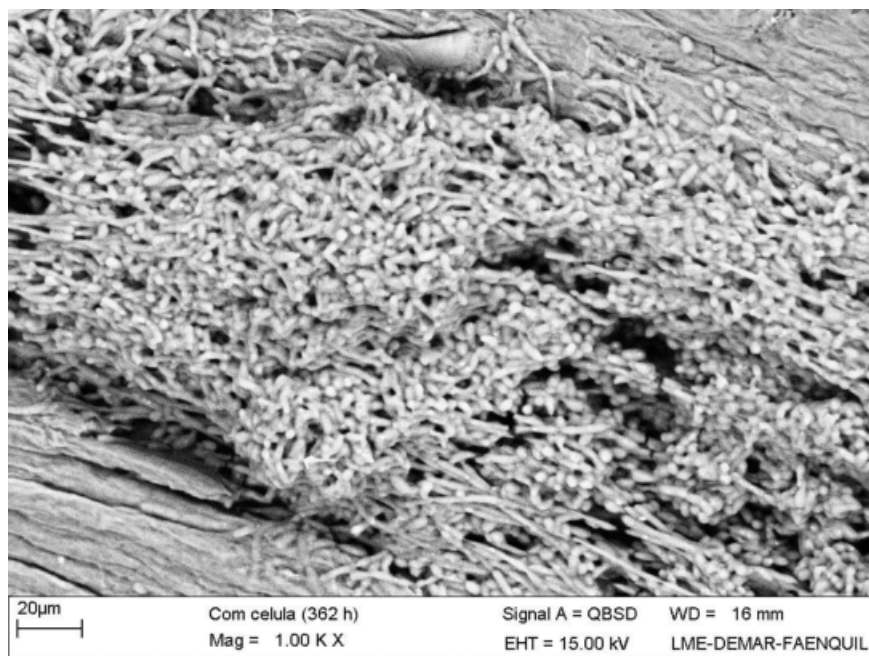
e) Grau aparente de fermentação =  $(E_o - E_a)/E_o$ , onde  $E_o$  é o extrato do mosto de alimentação e  $E_a$  é o extrato aparente na saída do reator.

f) Grau real de fermentação =  $(E_o - E_r)/E_o$ , onde  $E_o$  é o extrato do mosto de alimentação e  $E_r$  é o extrato real na saída do reator.

## RESULTADOS E CONCLUSÕES

No início do processo utilizou-se meio sintético como meio de fermentação, pois a velocidade de ligação das leveduras no bagaço de malte é maior durante a alimentação contínua com meio sintético do que durante a alimentação contínua de mosto (Brányik et al., 2002). Esse fenômeno pode ser explicado pela alta competição entre as células e as proteínas do mosto, pelos sítios de adesão na superfície do suporte. As proteínas adsorvidas formam uma camada hidrofílica nos sítios de interação das células, atenuando a adesão das leveduras. O começo do processo fermentativo foi então conduzido em forma descontínua, empregando meio sintético, visando atingir o crescimento exponencial das células. Após 26 h, o reator foi alimentado com meio sintético utilizando uma taxa de diluição igual a  $0,2 \text{ h}^{-1}$ .

Após 74 h de fermentação, o reator foi alimentado continuamente com mosto cervejeiro diluído (7,5°P). A concentração máxima de células imobilizadas (0,31 g cel/g sup) foi obtida com



**Figura 4.** Fotomicrografia (MEV) de partícula de bagaço de malte com  $X_{\text{imob}} = 0,37 \text{ g cel imob/g sup}$ . Aumento 1000x

290 h de fermentação utilizando uma taxa de diluição de  $0,04 \text{ h}^{-1}$ . Após esse tempo, o mosto diluído foi substituído pelo mosto com uma concentração de extrato de  $11,3^{\circ}\text{P}$ , mantendo-se a taxa de diluição em  $0,04 \text{ h}^{-1}$ . Nessas novas condições, a concentração de leveduras imobilizadas atingiu um máximo de  $0,37 \text{ g cel/ g sup}$ , após 362 h de fermentação.

Na **Tabela 1** encontram-se os resultados obtidos para as duas condições de alimentação do reator, com o mosto diluído e o mosto original, considerando os tempos de fermentação de 290 h e 362 h, respectivamente. Observa-se que o maior grau aparente e real de fermentação ocorreu com o mosto original provavelmente devido à maior concentração de células totais (células livres + células imobilizadas) presente no meio. De acordo com Brányik et al. (2004), o grau de atenuação do mosto durante a fermentação contínua de cerveja com leveduras imobilizadas, é controlado pela concentração total de células no reator e pela sua atividade metabólica. Entretanto, o maior consumo de extrato quando o mosto de  $11,3^{\circ}\text{P}$  foi utilizado, resultou em uma cerveja com maior concentração de etanol.

Um indicador útil do desempenho da fermentação, que pode ser utilizado para comparar diferentes sistemas e configurações de reatores, é a produtividade volumétrica, a qual é expressa como a taxa de consumo de carboidratos por unidade de volume do reator (Tata et al., 1999).

Como pode ser observado na **Figura 3**, a produtividade volumétrica para o mosto diluído foi de  $2,0 \text{ g/L.h}$ , enquanto que utilizando o mosto original este valor foi aumentado em 1,75 vezes, atingindo  $3,5 \text{ g/L.h}$ . No entanto, ambos valores obtidos para o sistema contínuo com leveduras imobilizadas no bagaço de malte, foram significativamente maiores do que a média de produtividade (aproximadamente  $0,8 \text{ g/L.h}$ ) calculada para uma fermentação descontínua tradicional, quando se considera uma atenuação de mosto de  $14^{\circ}\text{P}$  para  $4^{\circ}\text{P}$  em 5 dias.

Análises realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), mostraram que as leveduras cervejeiras foram retidas dentro de zonas de proteção, como fissuras, poros e fibras entrelaçadas, na superfície das partículas do bagaço de malte (**Figura 4**). A aspereza do suporte protegeu as células contra as forças de fricção exercidas pelas correntes

de líquido.

Leveduras cervejeiras imobilizadas também foram encontradas em zonas abertas e planas das partículas de bagaço, onde não recebem resguardo contra o fluxo de líquido como nas zonas de proteção. Segundo Mozes et al. (1987), a adesão de microorganismos em superfícies sólidas ocorre através de interações eletrostáticas e não-eletrostáticas. Em diferentes regiões do bagaço foram observadas camadas múltiplas de leveduras, formadas pela interação entre células já aderidas ou adsorvidas ao suporte, com outras células que se encontravam livres. De acordo com Brányik et al. (2004), esse tipo de atração entre células pode ser considerado como uma forma de flocculação.

Este trabalho demonstrou que a fermentação contínua de cerveja com leveduras imobilizadas em bagaço de malte pode ser realizada com sucesso em um reator airlift de circulação interna. O consumo de extrato foi proporcional à concentração de células totais (células imobilizadas + células livres) no reator. As produtividades volumétricas (expressadas como a taxa de consumo de carboidratos por unidade de volume do reator) para o sistema contínuo com leveduras imobilizadas no bagaço de malte, foram significativamente maiores do que a produtividade calculada para uma fermentação descontínua tradicional.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem os apoios da Capes, FAPESP, CNPq, Corn Products Brasil, Malteria do Vale, Wallerstein Industrial & Comercial, JohnsonDiversey e ao Departamento de Engenharia de Materiais (DEMAR / FAENQUIL).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRÁNYIK, T., VICENTE, A.A., MACHADO CRUZ, J.M., TEIXEIRA, J.A. Spent grains – a new support for brewing yeast immobilisation. **Biotechnology Letters**, v.23, p.1073-1078, 2001.

BRÁNYIK, T., VICENTE, A.A., MACHADO CRUZ, J.M., TEIXEIRA, J.A. Continuous primary beer fermentation with brewing yeast immobilized on spent grains. **Journal of the Institute**

**of Brewing**, v.108, p.410-415, 2002.

BRÁNYIK, T., VICENTE, A.A., CRUZ, J.M., TEIXEIRA, J.A. Continuous primary fermentation of beer with yeast immobilized on spent grains – The effect of operational conditions. **Journal of the Institute of Brewing**, v.62, p.29-34, 2004.

DRAGONE, G. Estudo cinético do processo fermentativo de produção de cervejas em mostos concentrados. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), Dissertação de Mestrado, pp.111, 2002.

HERNÁNDEZ, A.M., RODRÍGUEZ, J.L., LÓPEZ, B., ZERQUERA, O.L. Caracterización química y funcional del afrecho de malta. **Alimentaria**, may, p.105-107, 1999.

LINKO, M., HAIKARA, A., RITALA, A., PENTTILÄ, M. Recent advances in the malting and brewing industry. **Journal of Biotechnology**, v.65, p.85-98, 1998.

MASSCHELEIN, C.A., RYDER, D.S., SIMON, J.P. Immobilized cell technology in beer production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.14, p.155-177, 1994.

MOZES, N., MARCHAL, F., HERMESSE, M.P., VAN HAECHT, J.L., REULIAUX, L., LEONARD, A.J., ROUXHET, P.G. Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.439-450, 1987.

MUSSATTO, S.I., DRAGONE, G., ROBERTO, I.C. Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p.1-14, 2006.

PILKINGTON, P.H., MARGARITIS, A., MENSOUR, N.A., RUSSELL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v.104, p.19-31, 1998.

REINOLD, M.R. A Cervejaria e o meio ambiente. In: Manual prático de cervejaria, 1ª. Edição. São Paulo: ADEN – Editora e Comunicações Ltda. p.163-197, 1997.

TATA, M., BOWER, P., BROMBERG, S., DUNCOMBE, D., FEHRING, J., LAU, V., RYDER, D., STASSI, P. Immobilized yeast bioreactor systems for continuous beer fermentation. **Biotechnology Progress**, v.15, p.105-113, 1999.