



---

# FABRICAÇÃO DE CERVEJAS ARTESANAIS A PARTIR DA *SACCHAROMYCES CEREVISAE* PROPAGADA SOB AGITAÇÃO

A. C. CHESCA<sup>1</sup>, F. A. P. PAIVA<sup>2</sup>, J. R. D. FINZER<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Universidade de Uberaba, Departamento de Engenharia Química

**RESUMO** - Neste trabalho realizou-se o estudo da agitação na propagação de levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fabricação de cerveja artesanal, pois é de fundamental importância considerar a função do oxigênio no controle do metabolismo e crescimento da levedura. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de Uberaba. Para a propagação utilizou-se um mosto de Extrato de Malte Seco (DME, Dry Malt Extract), para o processo fermentativo utilizou-se a levedura liofilizada da espécie *S. cerevisiae*, da marca Fermentis<sup>®</sup>, cepa safale US-05<sup>®</sup>, com a concentração inicial de  $19 \times 10^9$  células por grama, o mosto, com densidade inicial de  $1,035 \text{ g.cm}^{-3}$ , foi preparado dissolvendo-se 45g de DME em 450 mL de água em ebulição e após 15 minutos de fervura foi resfriado a 25°C. este procedimento foi repetido por duas vezes obtendo-se os meios de propagação 1 e 2. A amostra 1 ficou sob agitação em um agitador de Kline, da marca Nova Ética<sup>®</sup>, com rotação fixada em 120 RPMs durante 10 horas. A amostra 2 ficou em repouso, sendo homogeneizada, para coleta, a cada 1 hora, durante 10 horas. A determinação da concentração celular (cel/mL) foi realizada em câmara de Neubauer ( $1/400 \text{ mm}^2 \times 1/10 \text{ mm}$ ) e para determinação das células viáveis e não viáveis, utilizou-se o Método Internacional de Coloração, utilizando azul de metileno segundo ASBC (1996). A viabilidade celular foi calculada a partir da equação abaixo. Dos resultados obtidos, pode-se concluir que a propagação das células de levedura tem papel fundamental na produção de cervejas, caseiras ou industriais, pois aumenta a quantidade de células viáveis, tornando a fermentação mais intensa.

## 1. INTRODUÇÃO

Os dados históricos sobre bebidas alcoólicas são imprecisos, sendo difícil saber quando foram obtidas as primeiras bebidas alcoólicas fermentadas, embora haja citações sobre seu uso antes da era cristã. As descrições mais precisas provêm de autores árabes, do século X, supondo-se que eles tenham criado os termos álcool e alambique (MALTA, 2006). A primeira cerveja de que se tem notícia foi fabricada pelos sumérios, um povo que vivia na Mesopotâmia, Oriente Médio. Além dessa civilização, também foram exímios cervejeiros os assírios e babilônios (CARVALHO, 2009).

As cervejas industriais se estabeleceram mundialmente e hoje, em paralelo com a indústria, o movimento de cervejarias artesanais ganha espaço no setor cervejeiro brasileiro. Os



adeptos desse estilo buscam à volta da história, da cultura e da qualidade da bebida e também é visto como uma grande oportunidade de negócio que atrai muitos interessados em investir na produção. O que difere a cerveja artesanal da industrial, além do tamanho da produção, é a melhor qualidade da matéria prima e a adição de produtos regionais, que gera sabores mais robustos e únicos (FERREIRA et al., 2011).

A crescente demanda por cervejas especiais vem impulsionando o setor a buscar inovações para o seu processo. No âmbito da fermentação, as leveduras constituem um ponto chave, tanto no que tange à tolerância aos estresses do processo garantindo sua eficiência quanto no que se refere à produção dos compostos aromáticos da bebida (BOKULICK; BAMFORTH, 2013).

No processo de fabricação da cerveja, a fermentação é importante e a *S. cerevisiae* é uma levedura que tem apresentado um destaque nos diversos processos fermentativos em função de sua capacidade de converter açúcares em etanol, ácidos orgânicos e gás carbônico. O desempenho das leveduras cervejeiras na fermentação é influenciado e controlado por vários fatores: cepa de levedura empregada, a tolerância ao estresse pelas células de levedura, a viabilidade e a vitalidade das células, a concentração celular do inóculo, a concentração e a natureza do nitrogênio assimilável, a variedade e a concentração de açúcares no mosto, a disponibilidade de íons metálicos, temperatura, pH, oxigênio dissolvido e a densidade do mosto.

A aeração em processos fermentativos é de fundamental e essencial para favorecer as condições de crescimento do microrganismo, sendo que o objetivo das condições de agitação e aeração são a dispersão das bolhas de ar, conseqüentemente o suprimento de oxigênio aos microrganismos. Com a agitação as células microbianas permanecem em suspensão com o aumento da transferência de calor e massa no meio.

Diante do crescimento da produção de cervejas artesanais e a influência da aeração no crescimento microbiano, este trabalho teve como objetivo mostrar a importância de abordar a transferência de oxigênio em processos fermentativos aeróbios.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de Uberaba. Para a propagação utilizou-se um mosto de Extrato de Malte Seco (DME, *Dry Malt Extract*), que é obtido basicamente pela hidrólise da cevada crua e malteada, sendo em seguida submetido à concentração, desidratação a vácuo e moagem. Para o processo fermentativo utilizou-se a levedura liofilizada da espécie *S. cerevisiae*, da marca Fermentis®, cepa *safale* US-05®, com a concentração inicial de  $19 \times 10^9$  células por grama, em *sachets* de 11,5g, conforme indicações do fornecedor. A cepa foi adquirida em comércio especializado e trata-se de uma levedura *ale* americana de caráter neutro sem ésteres e alta tolerância ao álcool.

---



O mosto, com densidade inicial de  $1,035 \text{ g.cm}^{-3}$ , foi preparado dissolvendo-se 45g de DME em 450 mL de água em ebulição e após 15 minutos de fervura foi resfriado a  $25^\circ\text{C}$ . este procedimento foi repetido por duas vezes obtendo-se os meios de propagação 1 e 2.

O volume de 11,5 g de leveduras foi dividido em duas porções e cada porção foi hidratada em 50 mL de água destilada à temperatura ambiente e inoculadas nos meios de propagação 1 e 2.

A amostra 1 ficou sob agitação em um agitador de Kline, da marca Nova Ética<sup>®</sup>, com rotação fixada em 120 RPMs durante 10 horas. A amostra 2 ficou em repouso, sendo homogeneizada, para coleta, a cada 1 hora, durante 10 horas.

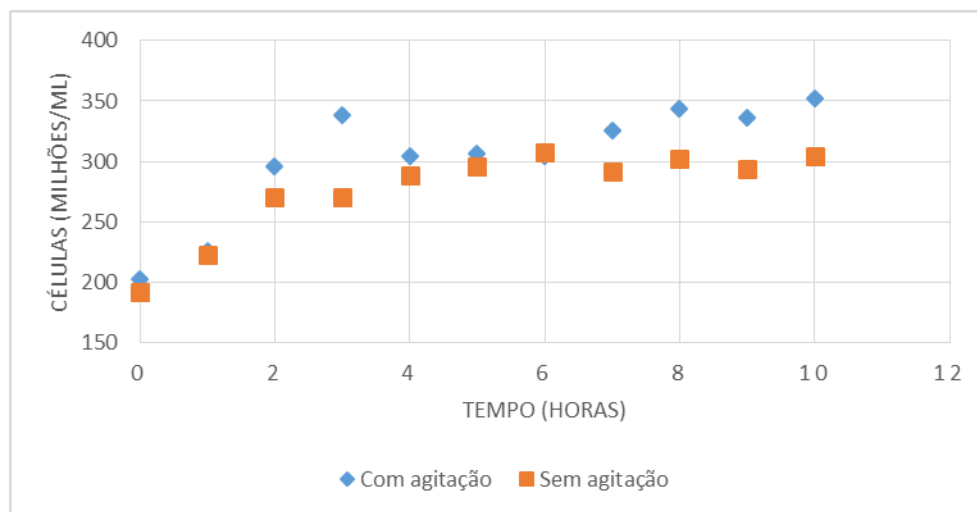
A determinação da concentração celular (cel/mL) foi realizada em câmara de Neubauer ( $1/400 \text{ mm}^2 \times 1/10 \text{ mm}$ ) e para determinação das células viáveis e não viáveis, utilizou-se o Método Internacional de Coloração, utilizando azul de metileno segundo ASBC (1996). A viabilidade celular foi calculada a partir da equação abaixo. A viabilidade é dada pela razão entre células viáveis e total de células (WHITE, 2010).

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left( \frac{\text{número de células viáveis}}{\text{número de células totais}} \right) \times 100$$

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Figura 1 apresenta o crescimento celular ao longo de 10 horas de propagação, dos sistemas celulares com e sem agitação.

As duas populações partem de aproximadamente 200 milhões de células por mililitros, e é possível perceber que o sistema que permaneceu com agitação constante tem um crescimento aproximadamente 15% maior que o sistema sem agitação. Essa diferença teria sido maior caso o sistema não agitado não fosse homogeneizado a cada 1h para coleta, dessa forma as células decantadas eram suspensas, o que aumenta o contato com os substratos e acelera o crescimento. A agitação e consequente aeração do meio favorece a dispersão das bolhas de ar e o suprimento de oxigênio as células microbianas e também a sua suspensão com o aumento da transferência de calor e massa no meio.



**Figura 1:** Crescimento celular dos sistemas com e sem agitação.

Para microrganismos facultativos, como *S. cerevisiae*, o oxigênio tem crucial importância em todo metabolismo porque ele participa da geração de energia através da cadeia de respiração dentro da mitocôndria, que é fundamental para obtenção de uma velocidade de crescimento específico significante (SILVA *et al.*, 2001).

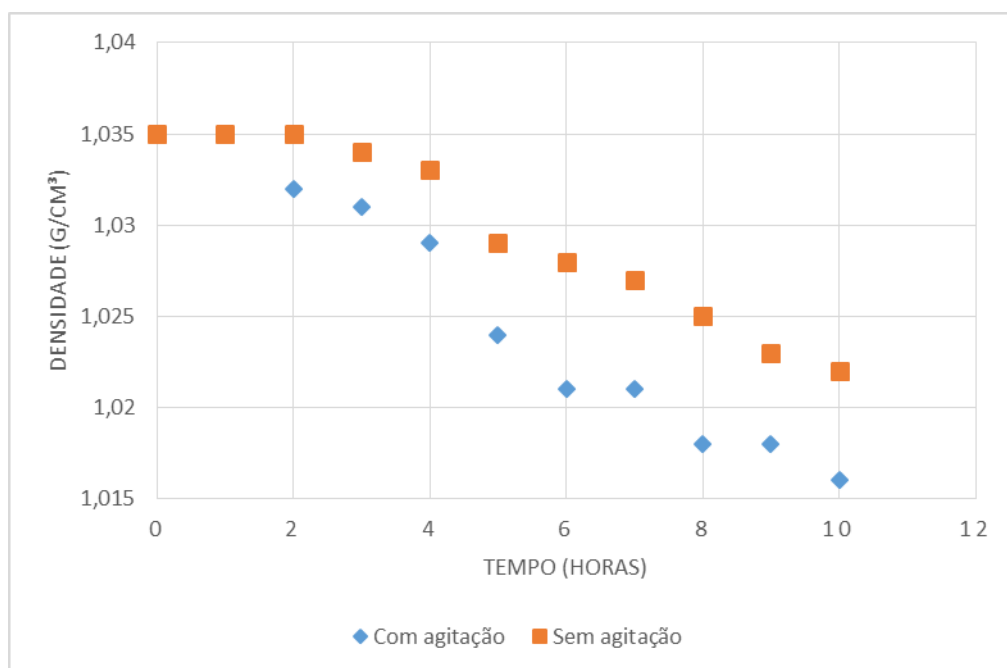
Segundo Briggs (2004), a aeração do mosto é um dos fatores que afetam a etapa da fermentação. A quantidade de oxigênio dissolvido bem como a diminuição da concentração de substrato direciona a sequência de assimilação dos componentes do meio fermentativo, bem como a formação de subprodutos do metabolismo de maneira coordenada. O flavor da cerveja resulta da mistura de compostos oriundos do metabolismo aeróbio e anaeróbio oriundos das diferentes fases da fermentação. O oxigênio dissolvido impacta na produção de subprodutos da fermentação como dicetonas, álcoois superiores, ésteres e acetaldeído (BRÁNYIK *et. al.*, 2008).

Em relação ao consumo de substratos, os resultados obtidos estão na Figura 2, onde pode ser observado a diminuição da densidade dos dois sistemas.

Os mostos que são obtidos apenas a partir do malte contêm como fonte de carbono os seguintes açúcares: sacarose, glicose, frutose, maltose, maltotriose e dextrinas (ALMEIDA e SILVA, 2005). De acordo com Briggs *et al.* (2004), a sacarose é hidrolisada por uma enzima invertase que é secretada no periplasma da levedura, aumentando assim a concentração de glicose e frutose, açúcares estes que são primeiramente assimilados. Segundo Almeida e Silva (2005), quando 50% da glicose foi consumida pela levedura, iniciam-se a assimilação da maltose e maltotriose respectivamente. Então, ainda segundo Briggs *et al.* (2004), a maltose que é o carboidrato de maior quantidade no mosto, começa a ser metabolizada e quando esta atinge um nível indetectável, a maltotriose começa a ser assimilada. Vidgren (2010) relata que a maltose e

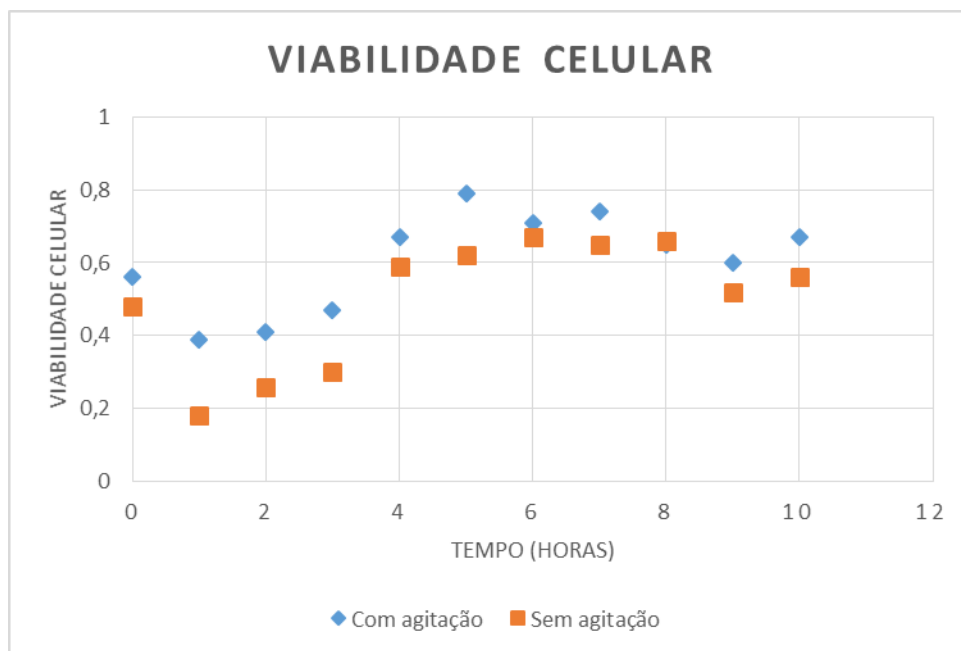
maltotriose são utilizadas por último devido ao fato da glicose ser a principal fonte de carbono e de energia para a levedura. De acordo com Walker (1998), a absorção da maltose envolve dois sistemas: transportadores de maltose dependente de energia (ATP convertido em ADP), os quais transportam a maltose intacta através da membrana celular e a maltase ( $\alpha$ -glucosidase), a qual hidrolisa maltose internamente a fim de obter duas moléculas de glicose. A maltotriose, por sua vez, tem um independente transportador o qual depende de energia para o transporte intacto, mas compartilha a  $\alpha$ -glucosidase, a qual hidrolisa o açúcar em três unidades de glicose.

Pelos resultados obtidos tem-se que o período de *lag time* termina primeiro na amostra com agitação e percebe-se que a partir da segunda hora há consumo de substrato. Na amostra 2, sem agitação, isso ocorre somente na terceira hora. Essa maior velocidade de consumo na amostra 1 permanece durante todo o processo, isso ocorre, pois, as células não decantam, permanecendo em contato com o substrato por mais tempo.



**Figura 2:** Consumo de substratos ao longo do tempo.

Através da representação gráfica da viabilidade celular em função do tempo de fermentação apresentada na Figura 3, observou-se que que na primeira hora, após inocular as células no mosto, há uma queda na viabilidade devido ao gradiente de pressão osmótica. Após 10 horas, tem-se uma viabilidade aproximadamente 10% maior que a inicial nas duas amostras.



**Figura 3:** Viabilidade celular ao longo do tempo.

A fase logarítmica ou exponencial, em que o crescimento celular é bastante expressivo, e consequentemente, ocorre maior consumo do substrato e formação do produto (etanol), foi atingido entre as 4h e 6h, para ambos os experimentos. Os valores de viabilidade foram elevados ao longo de toda a fermentação, porém ocorre um decréscimo entre a oitava e decima hora, que pode ser explicado pela toxicidade do etanol, que é um dos principais fatores que causam instabilidade no processo fermentativo e também a redução de substrato disponível (CARVALHO e ZAMBIAZI; 2011).

É importante ressaltar que a etapa de fermentação não depende apenas da aeração do mosto, porém de várias outras características do meio, como temperatura, composição química e concentração de extrato no mosto, quantidade e o modo de inoculação da levedura no mosto, geometria e dimensões dos tanques fermentadores. Depraetere (2008) ressaltou que a aeração do mosto não é um fator determinante para a estabilidade do flavor, porém mencionou que uma ineficiente aeração pode ter um impacto negativo no processo.

## 5. CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos, pode-se concluir que a propagação das células de levedura tem papel fundamental na produção de cervejas, caseiras ou industriais, pois aumenta a quantidade de



células viáveis, tornando a fermentação mais intensa. A agitação acelera o consumo de substrato e, conseqüentemente a multiplicação celular, além de aumentar a viabilidade celular, o que é fundamental para a fermentação. O fato da viabilidade ter aumentado menos que o descrito na literatura mostra que somente a agitação não é o suficiente para uma multiplicação mais abrangente, o que pode ser melhorado com oxigenação do mosto utilizado.

## 6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA E SILVA. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, G.W. **Tecnologia de Bebidas: Matéria-Prima, Processamento, BPF/APPCC, Legislação e Mercado**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005, 550p.

ASBC. American Society of Brewing Chemists. **Methods of Analysis of American Society of Brewing Chemists**. 8. ed. Minnesota: Technical Committee and the Editorial Committee of the ASBC, 1996.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The microbiology of malting and brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 77, n. 2, p. 157-172, 2013.

BRÁNYIK, T. et. al. The review of flavour formation in continuous beer fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 114, p. 3–13, 2008.

BRIGGS. D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing – Science and Practice**, Cambridge: CRC Press, 2004.

BRIGGS, D. E. **Brewing science and practice**. 1. ed. Woodhead Publishing, 2004.

CARVALHO, G. B. M. **Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante**. 2009. 163 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena 2009.

CARVALHO, D, S.; ZAMBIAZI, R. C. Avaliação do processo fermentativo de cerveja pilsen pelo uso de diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae*. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n.3, p. 351-357, 2011.

DEPRAETERE, S. A. et al. The influence of wort aeration and yeast preoxygenation on beer staling processes. **Food Chemistry**. v. 107, p. 242–249, 2008.

FERREIRA, R. H. et al. Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. **Perspectivas em Ciência da Informação**, Belo Horizonte, v. 16, n. 4, dez. 2011. p. 171-191.





MALTA, H. L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique.** 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SILVA, D. P.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M. Effect of agitation and aeration on production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Totowa, v.91, n.3, p.605-613, 2001.

VIDGREN, V. **Maltose and maltotriose transport into ale and lager brewer's yeast strains.** 2010. 158 f. Dissertação (Doutorado), Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade de Helsinki, 2010.

Walker G. M. **Yeast physiology and biotechnology.** Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1998.

White, C., Zainasheff, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation.** Brewers Publications, 2010. 297p.