

ANÁLISE CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS COMERCIAIS S-04 E S-33

Sharline Florentino de Melo Santos^{1*}, Fernando da Silva Moraes², Lucas Miranda Fernandes³,
Luzidelson Baracho Ribeiro³ e Kristerson Reinaldo de Luna Freire⁴

1. Professora Adjunto. *Correspondência: Departamento de Engenharia Química (DEQ), Centro de Tecnologia (CT), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Cidade Universitária, CEP: 58059-900, João Pessoa-PB. Email: sharlinefm@hotmail.com.
2. Discente do curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).
3. Mestre em Engenharia Química – Universidade Federal da Paraíba (UFPB).
4. Docente do curso de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

RESUMO

A levedura é uma matéria-prima de fundamental importância para a indústria cervejeira. Responsável pela mais complexa etapa da produção da cerveja, a fermentação, a levedura deve ser cuidadosamente selecionada pelo cervejeiro, já que, além da relevância no processo produtivo, agrega aromas e sabores ao produto final. Este artigo traz uma comparação cinética de fermentações utilizando duas leveduras comerciais pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* fabricadas pela Fermentis®, a S-04 e a S-33. Para isso foram estudados parâmetros como crescimento celular, consumo de substrato e medições de pH durante o processo fermentativo. A levedura S-04, obteve um crescimento celular mais rápido, apesar de menor, e um pH mais ácido ao final da fermentação. A levedura S-33 obteve maior crescimento celular e maior velocidade de consumo de substrato, atenuando a fermentação em 32h, 20h a menos que a S-04. O Brix final foi o mesmo para as duas leveduras, 4,6°Bx, tornando a levedura S-33 mais atrativa em termos de processo fermentativo.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, cinética, fermentação.

KINETIC ANALYSIS OF COMMERCIALS YEASTS FERMENTATION S-04 AND S-33

ABSTRACT

Yeast is a raw material of fundamental importance for the brewing industry. Responsible for the most complex stage of beer production, the fermentation, yeast must be carefully selected by the brewer, since, in addition to the relevance in the production process, it adds aromas and flavors to the final product. This article provides a kinetic comparison of fermentations using two commercial yeasts belonging to the species *Saccharomyces cerevisiae* produced by Fermentis®, the S-04 and the S-33. For this, parameters such as cell growth, substrate consumption and pH measurements during the fermentation process were studied. Yeast S-04, obtained a faster cell growth, although smaller, and a more acidic pH at the end of the fermentation. S-33 yeast obtained higher cell growth and higher rate of substrate consumption, attenuating the fermentation in 32h, 20h less than S-04. The final



Brix was the same for the two yeasts, 4.6°Bx, making yeast S-33 more attractive in terms of fermentation process.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, kinetics, fermentation.

INTRODUÇÃO

A levedura é uma variedade de microrganismo que tem estado com o homem há séculos, cerca de 30 mil anos. Atualmente, devido a sua diversidade de atividades biológicas, as leveduras se tornam fortes candidatas a uma ampla gama de aplicações (1), dentre elas a fermentação para produção de cerveja.

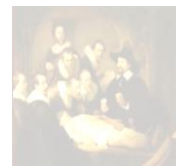
Acreditava-se que existiam mais de 1500 espécies de levedura, no entanto apenas uma delas é a mais usada na produção de cerveja, a *Saccharomyces cerevisiae*. Quando adicionadas ao mosto, as células de leveduras se alimentam dos açúcares e carboidratos nele presente e produzem dióxido de carbono e álcool. A levedura também produz diversos subprodutos que influenciam no sabor e no aroma da cerveja. Os mais comuns são ésteres, alcoóis fúseis e diacetil (2).

Um bom cervejeiro deve ter conhecimento das propriedades essenciais e suplementares de um fermento, afim de fazer a melhor escolha do tipo de levedura que irá utilizar no processo fermentativo. Dentro desse contexto, três características têm fundamental importância em qualquer processo de seleção de leveduras cervejeiras: a levedura deve produzir aroma e sabor agradáveis; há a necessidade de que a levedura cresça adequadamente e, por fim, se há habilidade ou não de flocular e se os flocos formados sobem ao topo ou decantam na base do fermentador (3).

A fermentação é o processo no qual a levedura trabalha. Portanto, procura-se, então, administrar a fermentação de modo a favorecer seu crescimento e a manutenção e produção dos aromas e sabores desejáveis no produto final, a cerveja. Neste sentido, torna-se essencial o controle sobre algumas variáveis importantes desse processo como, por exemplo, a temperatura de fermentação, a duração, a contrapressão, o pH, a escolha adequada da levedura e a quantidade dela a ser empregada (4).

Neste artigo é feita a análise cinética, a partir do crescimento celular, consumo de substrato e variação de pH das fermentações de mosto cervejeiro, produzido artesanalmente, utilizando duas leveduras comerciais, a S-04 e a S-33, produzidas pela Fermentis®.

MATERIAL E MÉTODOS



Elaboração da cerveja

As matérias-primas utilizadas para a produção do mosto para as fermentações estão listadas na tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Receita da cerveja base.

Receita da cerveja base (12 L)	
Ingrediente	Quantidade
Malte base	2,24 kg
Maltes especiais	0,39 kg
Lúpulo de amargor	3,8 g
Lúpulo de aroma	13,5 g
Leveduras (S-04 e S-33)	2 g
Água mineral	22 L

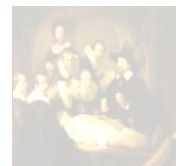
Todas essas matérias-primas foram obtidas através de lojas on-line especializadas e a cerveja produzida se enquadra no estilo *Blonde Ale*, que segundo o *Beer Judge Certification Program* (BJCP) é uma cerveja clara, leve, de médio corpo e aromas e sabores oriundos de malte, lúpulo e leveduras suaves (5).

Primeiramente foi realizada a limpeza do local de produção da cerveja e sanitização dos equipamentos utilizados seguida da moagem dos grãos através de moedor de dois rolos automatizado, de modo que o grão fosse quebrado preservando a casca dos maltes, que serve como elemento filtrante na etapa de filtração.

Depois de moídos, iniciou-se a etapa de mosturação, ou sacarificação, onde os maltes moídos passaram por infusão em água a temperaturas controladas para que as enzimas α -amilase, β -amilase e limite-dextrinase atuem na estrutura do amido contido nos maltes, convertendo-os em açúcares fermentáveis.

Terminada a mosturação, foi formada uma cama de grãos na tina. Esta cama é o elemento filtrante do mosto, o qual foi recirculado e posteriormente lavado com água à mais ou menos 78°C para extrair o máximo possível de açúcares. A densidade específica total do mosto lavado (mosto doce), levado para a fervura, foi de 1,041 g/mL e teve duração de uma hora e dez minutos. A densidade do mosto após o fim da fervura foi de 1,053 g/mL. Este aumento de densidade deve-se à evaporação durante o processo.

Após a fervura, o mosto já adicionado de lúpulos de aroma e de amargor passou



por resfriamento utilizando *chiller* de imersão, trocando calor até atingir uma faixa de temperatura considerada ideal para iniciar a etapa de fermentação.

Preparação dos fermentadores

Foram utilizados dois fermentadores com capacidade de 1,5L. *Airlocks* foram utilizados para que o CO₂ pudesse ser eliminado durante a fermentação sem que o fermentado entrasse em contato com o ar, evitando contaminação e oxidação.

As leveduras comerciais utilizadas foram hidratadas e inoculadas. Para cada fermentador, foi utilizado 1g de levedura liofilizada. Em um fermentador foi inoculado a levedura S-04 e no outro a S-33 para que se iniciasse o processo de fermentação, que foi conduzido com temperatura controlada e constante de 20°C.

Crescimento celular

Para determinação do crescimento celular, foram coletadas amostras dos mostos em fermentação a cada 4 h, até serem completadas 88 h de fermentação, todas em duplicata. As amostras foram coletadas através de pipeta com volume fixo para tubos de 2 mL, previamente secos, enumerados, pesados e centrifugadas por 6 minutos a 8000 rpm em centrífuga MiniSpinplus. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de açúcar. As células decantadas permaneceram por 24 h a 105°C em estufa com circulação e renovação de ar SL-102 Solab. Posteriormente pesou-se os tubos com as células seca em balança analítica Marte AW220, obtendo-se a concentração de células secas através da equação 1.

$$X = m_{eb} - m_e \quad \{1\}$$

Onde:

X = concentração de células de levedura seca [g]

m_{eb} = massa do tubo com células da levedura seca[g]

m_e = massa do tubo [g]

Com os dados coletados foram construídas curvas de crescimento celular para cada levedura analisada.

A equação 2 traduz a velocidade instantânea de crescimento ou reprodução do microrganismo para um tempo *t*.

$$r_x = dX/dt \quad \{2\}$$



Esta velocidade é traduzida pelos valores da inclinação das tangentes à curva de crescimento celular plotada no gráfico citado anteriormente.

A produtividade em células, útil para avaliação do desempenho de um processo fermentativo, foi calculada a partir da equação 3.

$$P_x = (X_m - X_0) / t_f \quad \{3\}$$

Onde:

P_x = Produtividade em células [g/L.h]

X_m = Concentração máxima da levedura seca [g/L]

X_0 = Valor inicial da concentração de levedura seca [g/L]

t_f = tempo de fermentação[h]

Outro parâmetro calculado para cada fermentação foi a velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_x), calculada a partir da equação 4, que, desenvolvendo por integração, na fase de crescimento exponencial, chega-se à equação 5.

$$\mu_x = (1/X)(dX/dt) \quad \{4\}$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_x(t - t_i) \quad \{5\}$$

Construindo-se um gráfico de $\ln X$ versus $(t-t_i)$, na fase exponencial de crescimento obtém-se μ_x através do coeficiente angular.

A partir do valor de μ_x , obtém-se o tempo de geração (t_g), tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular, que é outro parâmetro característico da fase de crescimento celular. Então, partindo-se da Equação 5, considerando $X = X_i$ e $t = t_g$, obtém-se a equação 6.

$$t_g = 0,693 / \mu_x \quad \{6\}$$

Consumo de substrato

Para a determinação desse parâmetro, foram coletadas amostras a cada 4h durante as primeiras 64 h de fermentação, após esse tempo as medições posteriores foram mais espaçadas, sendo coletadas até 120 h de fermentação. Com estas amostras realizaram-se medições de Brix, para o qual utilizou-se o refratômetro analógico RSG-100/ATC.

As medidas do refratômetro, porém, são distorcidas na presença de etanol. Sendo assim, necessita-se de correção na leitura durante a fermentação. Esta correção foi feita utilizando-se uma planilha fornecida pelo equipamento.

A partir dos dados obtidos, foram construídas as curvas de consumo de substrato para cada levedura analisada.



A equação 7 foi utilizada para obter a velocidade instantânea de consumo de substrato para um tempo t .

$$r_s = - dS/dt \quad \{7\}$$

Esta velocidade é traduzida pelos valores da inclinação das tangentes à curva de consumo de substrato plotada no gráfico citado anteriormente para cada fermentação estudada.

Assim como no parâmetro crescimento microbiano, também define-se a velocidade específica de consumo de substrato. A partir da equação 7 e aplicando-se o valor de X médio para o intervalo escolhido para a aplicação da tangente, obtém-se o valor de μ_s .

$$\mu_s = (1/X)(-dS/dt) \quad \{8\}$$

Análise de pH

Foram coletadas amostras a cada 12h até que se completassem 84h de fermentação. As amostras posteriores foram coletadas em intervalos de tempo mais espaçados. Foi utilizado o medidor de pH de bancada MS Tecnopon mPA-210, com correção de temperatura.

RESULTADOS E DISCUSÃO

Análise de crescimento celular

As curvas de crescimento celular para as leveduras comerciais S-04 e S-33 estão apresentadas na Figura 1.

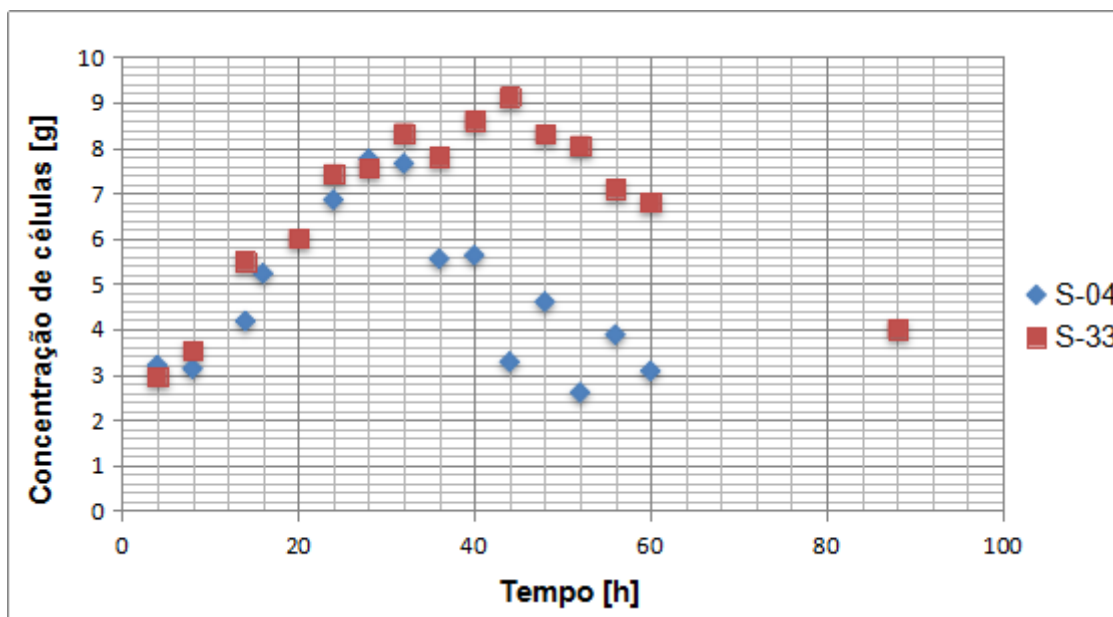
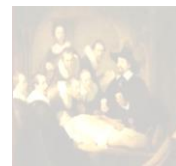


Figura 1 - Curvas de crescimento celular para as leveduras S-04 e S-33.

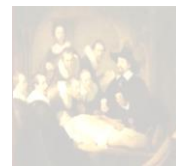
Observa-se pela Figura 1 que as leveduras cresceram inicialmente de forma semelhante até às 28 horas de fermentação. Porém, a levedura S-33 obteve uma fase linear de crescimento mais extensa, atingindo valores maiores de concentração de células do que a S-04.

Foram traçadas curvas de tendência linear ao gráfico da Figura 1, separadamente para cada levedura, no intervalo de crescimento celular compreendido entre 4h – 24h de fermentação, que é um intervalo de tempo comum ao crescimento de ambas, e obtivemos valores de tangente iguais a 0,1954 e 0,2191, para a S-04 e para a S-33, respectivamente. Esses valores de tangente foram utilizados, como segue abaixo, para determinar a velocidade instantânea de crescimento.

$$r_{x,S-04} = \frac{dX_{S-04}}{dt} = 0,1954 \frac{g}{L.h} \quad r_{x,S-33} = \frac{dX_{S-33}}{dt} = 0,2191 \frac{g}{L.h}$$

Ainda a partir dos dados apresentados na Figura 1, para o intervalo de tempo de 4 a 24 horas de fermentação, a produtividade em células, segundo a equação 3, para cada levedura estudada:

$$P_{x,S-04} = 0,18 \frac{g}{L.h} \quad P_{x,S-33} = 0,22 \frac{g}{L.h}$$



Os resultados de produtividade em células obtidos indicam um crescimento mais acentuado da levedura S-33, apesar dos dados estarem muito próximos. Isto leva a acreditar que a levedura S-33 tem um desempenho de crescimento maior nas condições empregadas neste trabalho.

Para obter os valores das velocidades específicas de crescimento celular (equação 5), foram plotados gráficos $\ln X$ versus $(t-t_i)$, um para cada levedura, nas primeiras 24h de fermentação, e traçadas curvas de tendência linear para elucidar os valores da tangente de cada curva, que corresponde ao parâmetro μ_x que é a velocidade específica máxima de crescimento celular.

Os resultados obtidos a partir da equação 5 foram:

$$\mu_{x,S-04} = 0,0457 h^{-1} \quad \mu_{x,S-33} = 0,04191 h^{-1}$$

Esses resultados podem parecer baixos se comparados com o obtido por Lopes et al. (7), que foi igual a $0,1801 h^{-1}$, em seu estudo de cinética de crescimento de levedura em mosto de cagaita para produção de bebida fermentada, no entanto os mesmos autores ainda ressaltam que a velocidade específica de crescimento pode ser influenciada por fatores nutricionais inerentes ao mosto e também por condições de pH, temperatura e aeração.

Além disso, os resultados estão em conformidade com os obtidos por Toniato (8) que em seu estudo de determinação de parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica em diferentes substratos, analisou velocidades específicas máximas para crescimento celular de três leveduras comerciais utilizadas em usinas no Brasil [CATANDUVA (CAT-1), BARRA GRANDE (BG-1) e USINA DA PEDRA (PE-2)] e obteve os seguintes resultados expostos na tabela 2 a seguir:

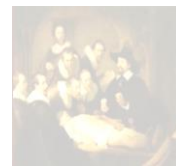
Tabela 2 – Resultados obtidos por Toniato (8).

Tipos de mosto para fermentação	BG - 1	PE - 2	CAT - 1
μ_x - mosto feito de melão	0,06	0,02	0,03
μ_x - mosto feito de caldo de cana	0,01	0,01	0,02
μ_x - mosto misto	0,02	0,01	0,05

Fonte: Adaptado de Toniato (8).

Utilizando os valores de μ_x antes determinados, foi possível determinar o tempo de geração para cada levedura de acordo com a equação 6. Os resultados foram:

$$t_{g,S-04} = 16,5 h \quad t_{g,S-33} = 15,1 h$$



Isto significa que o crescimento da levedura S-33 é um pouco mais rápido do que o da levedura S-04.

Análise de consumo de substrato

O gráfico de consumo de substrato, avaliado através do Brix de cada fermentação, está demonstrado na Figura 2.

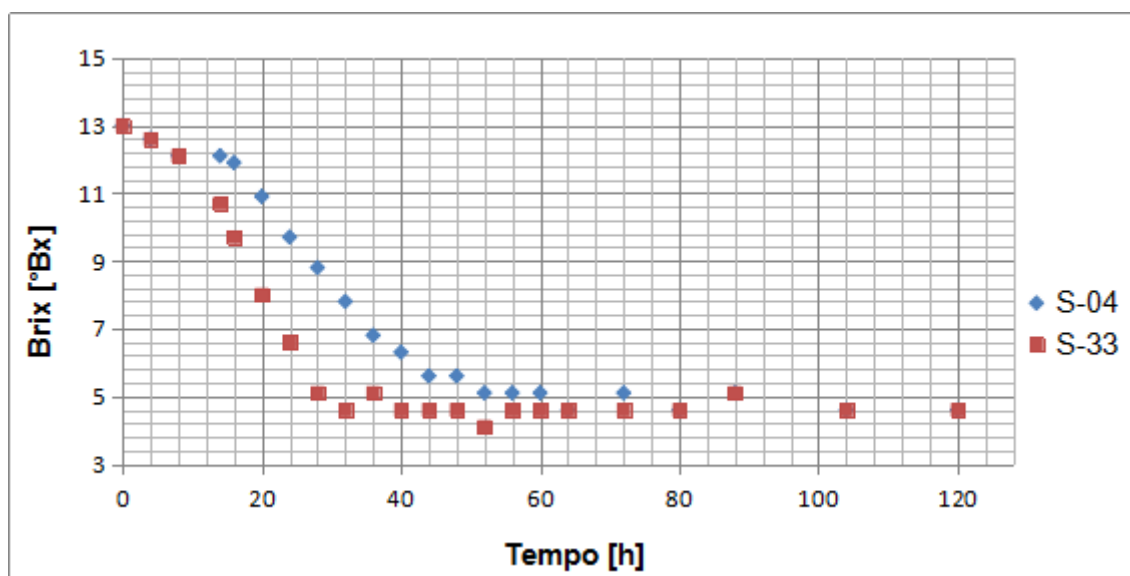
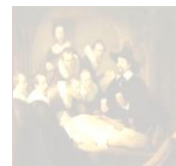


Figura 2 - Curva de consumo de substrato para as fermentações com as leveduras, S-04 e S-33.

A partir do gráfico acima, observa-se que a levedura S-33 obteve uma atenuação mais rápida do que a S-04. Por volta de 32h de fermentação, as medições de Brix da S-33 estabilizaram, mantendo uma oscilação de $\pm 0,25^\circ\text{Bx}$, sendo a última medição feita com 120h de fermentação marcando $4,6^\circ\text{Bx}$. A fermentação com levedura S-04, porém, só atenuou com aproximadamente 52h de fermentação, 20h a mais do que com a outra levedura, mas mantendo a mesma oscilação e a mesma leitura de Brix final. Em termos de tempo, a levedura S-33 foi mais eficiente do que a S-04, apresentando um tempo de atenuação consideravelmente reduzido.

Os resultados para o consumo de substrato no tempo de fermentação assemelharam-se aos de Carvalho et al. (9), que iniciaram em seu estudo a fermentação para produção de cachaça artesanal, com inoculação de fermento de panificação prensado (Fleischmann), com $15,0^\circ\text{Brix}$ e registraram no fim $4,0^\circ\text{Brix}$.



Tomando o intervalo de tempo, no gráfico da Figura 2, de 8h – 28h, foi possível traçar uma curva de tendência linear para os dados referentes a cada levedura, nesse intervalo, com a finalidade de se obter os valores dos coeficientes angulares dessas duas retas, que correspondem as velocidades instantâneas de consumo de substrato, com uso da equação 7. Os resultados obtidos foram os que seguem abaixo.

$$r_{s,S-04} = -dS/dt = 0,1814 \frac{g}{Lh} \quad r_{s,S-33} = -dS/dt = 0,3625 \frac{g}{Lh}$$

Os valores das velocidades específicas de consumo de substrato (μ_s) para cada levedura foram calculados por meio da equação 8 e os valores de r_s que foram obtidos anteriormente. As velocidades específicas de consumo de substrato obtidas para a S-04 e para a S-33 foram:

$$\mu_{s,S-04} = 0,0248 h^{-1} \quad \mu_{s,S-33} = 0,0477 h^{-1}$$

Análise de pH

Os resultados das medições de pH no decorrer do tempo referente ao período de fermentação para as leveduras estudadas estão expostos na Figura 3 abaixo.

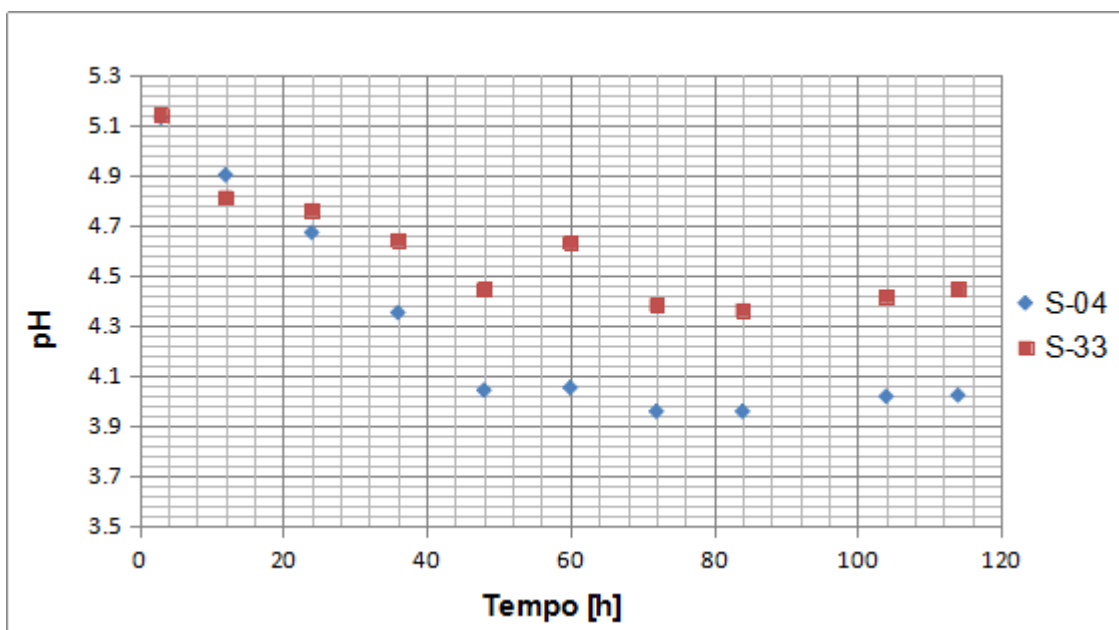


Figura 3 - Variação do pH nas fermentações utilizando as leveduras S-04 e S-33.



O pH inicial das fermentações foi 5,15, que é aproximadamente o pH da água mineral utilizada para a produção da cerveja. Em ambas as fermentações, houve uma queda do pH. Porém, esta diminuição de pH foi menor para a levedura S-33, finalizando a fermentação com 4,45 de pH. Com a levedura S-04, a cerveja obteve 4,02 de pH.

Segundo Schmidell et al. (6), com o aumento da concentração de CO₂, bem como com a produção de ácidos orgânicos, na fase anaeróbica do metabolismo das leveduras, há a diminuição do pH no processo de obtenção de cerveja. Há ainda a importância da queda do pH para menos que 4,40, já que algumas bactérias contaminantes que podem estar contidas no mosto, em fermentação, pertencentes aos gêneros *Enterobacter* e *Citrobacter* morrem nestas condições.

Os valores finais de pH estão coerentes segundo D'Ávila et al. (10) e Reeck et al. (11), onde, em ambos os casos, o pH inicial da fermentação foi por volta de 5,20 e o final aproximadamente 4,00. Além disso, Lopes et al. (7) durante processo fermentativo para obtenção de bebida fermentada a partir de mosto de cagaita teve pH inicial de fermentação igual a 3,17 e final de 2,89, ou seja, fora do considerado ideal para o crescimento da levedura.

CONCLUSÕES

As duas leveduras produzidas pela Fermentis®, a S-04 e a S-33, se mostraram eficientes para fins fermentativos a medida em que mostraram bom crescimento celular e rápido consumo de substrato. Porém, em termos de processo, a levedura S-33 se mostrou mais eficiente do que a S-04, pois apresentou um maior crescimento celular e um consumo de substrato mais rápido.

Este é apenas o estudo da cinética de crescimento e consumo de substrato, é importante salientar que para a escolha da levedura além do estudo cinético é também importante analisar as características sensoriais de aroma e sabor desenvolvidas pelas leveduras no produto final.

REFERÊNCIAS

1. Hatoum R, Labries, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. In: Bortoli DAS, Santos F, Stocco NM, Nascimento DD, et al. Leveduras e produção de cervejas – Revisão. Bioenergia em revista: diálogos. 2012. 3 (1): 45-58.



2. Hughes G. Cerveja feita em casa: tudo sobre os ingredientes, os equipamentos e as técnicas para produzir a bebida em vários estilos. 1ª Edição. Tradução Rosane Albert. São Paulo: Publifolha, 2014.
3. Morado R. Larousse da cerveja. 1ª Edição. São Paulo: Lafonte, 2009.
4. Aquarone E, Borzani W, Schmidell W, Lima UA. Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos. Volume 4, 1ª Edição. São Paulo: Blucher, 2001.
5. Strong G, England K. Beer Judge Certification Program: 2015 style guidelines.2015. Available from: http://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf.
6. Chmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica. Volume 2, 1ª Edição. São Paulo: Blucher, 2001.
7. Lopes ACA, Pinto IO, Souza CM, Cangussu ASR, Mara Oliveira MES. Cinética de crescimento de levedura em mosto de cagaita para produção de bebida fermentada. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. 2015; 10 (3): 6-10.
8. Toniato J. Determinação de parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica em diferentes substratos. [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2013.
9. Carvalho W, Canilha L, Silva JBA. Cinética da fermentação e balanço de massa da produção de cachaça artesanal. Braz. J. Food Technol. 2008; Edição Especial - VII BMCFB - VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages.
10. D'avila RF, Cruz JM, Leitão AM, Rodrigues RS. pH e acidez total durante a produção de chope tipo pilsen. 2009. In: XVIII CIC/XI ENPOS, 2009. Available from: <http://pt.scribd.com/doc/96428813/CA-01228>.
11. Reeck CB, Bruginski ERD, Nascimento RD, Carvalho F. Desenvolvimento e avaliação dos parâmetros cinéticos na fermentação de cerveja aromatizada. 2010. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Estevan_Bruginski2/publication/277889944_Desenvolvimento_e_avaliacao_dos_parametros_cineticos_na_fermentacao_de_cerveja_aromatizada/links/5575c99b08ae75363751a168.pdf.