UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ÚRSULA TEREZA CORDEIRO COUTINHO

Capacidade fermentativa da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio para produção de cerveja

Recife/PE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ÚRSULA TEREZA CORDEIRO COUTINHO

Capacidade fermentativa da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio para produção de cerveja

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em

ORIENTADORA: Profª Drª Andrelina Maria Pinheiro Santos

CO-ORIENTADORAS: Profª Drª Enayde de Almeida Melo

Profª Drª Eliana Setsuko Kamimura

Recife

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Capacidade fermentativa da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio para produção de cerveja

Por Úrsula Tereza Cordeiro Coutinho

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em __/__/__ pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

_____

Prof/a Dr/a. Nome completo

Universidade ou Empresa ou a Formação

_____

Prof/a Dr/a. Nome completo

Universidade ou Empresa ou a Formação

_____

Prof/a Dr/a. Nome completo

Universidade ou Empresa ou a Formação

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Luciano Cordeiro e Avani Coutinho,
ao meu irmão, João Victor Cordeiro
e a todas mulheres negras,
que lutam dia a dia pelo reconhecimento
em um mundo racista e machista.

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Luciano Cordeiro da Silva e Avani Salvador Coutinho Cordeiro, e a minha avó Maria do Socorro Maia da Silva, por estarem sempre ao meu lado, por serem responsáveis por minha formação moral e ética, com princípios que levarei para a vida toda.

Ao meu irmão, João Victor Cordeiro Coutinho, por sua irmandade e companheirismo, sempre me dando força e acreditando em mim.

Aos meus amigos, em especial, Fernanda Pereira de Almeida Dell'Avanzi e Rafael Mendonça, que sempre estiveram comigo apesar da distância, com palavras de incentivo me dando forças e me confortando nos momentos difíceis.

Aos meus amigos do Departamento de Ciência do Consumo por dividir esforços nas dificuldades e multiplicar a felicidade por conquistas em tantos momentos de amizade e parceria.

Aos meus companheiros de laboratório, Stefano Vivas, Vitor Xavier, Ewerton Diniz, pois me ajudaram e me fizeram rir entre um café e outro. Eles alegraram dias intensos.

A técnica de laboratório, Marcia dos Santos, por sempre ser prestativa, companheira e tão doce.

A minha orientadora, Andrelina Maria Pinheiro Santos, por ter me orientado na conclusão deste projeto, mas sobre tudo por me incentivar e acreditar em mim.

As minhas coorientadoras Enayde de Almeida Melo e Eliana Setsuko Kamimura pelo suporte e todo auxílio para execução deste trabalho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de fazer o mestrado.

A Universidade Federal de Pernambuco, pela estrutura e disponibilidade do espaço.

A minha terapeuta por estar comigo, me orientando e me desafiando a sempre buscar o equilíbrio mental para continuar essa caminhada e assim concluí-la.

EPÍGRAFE

“Numa sociedade racista, não basta não ser racista.
É necessário ser antirracista.”

Angela Davis

RESUMO

A fermentação é uma das etapas de maior importância para produção de cerveja, formando os principais produtos da bebida, o álcool e gás carbônico, além disso, são gerados compostos, desejados ou não, responsáveis por caracteriza-la sensorialmente. A técnica de imobilização vem sendo bastante empregada em diversos segmentos industriais. No processo de fermentação, a técnica de imobilização permite uma melhor manipulação dos biocatalizadores, melhora o controle e estabilidade a longo prazo das células, protege as células contra forças de cisalhamento e aumenta a densidade celular no interior das cápsulas. Considerando a fermentação uma etapa crítica e de grande importância, este trabalho avaliou a viabilidade do processo combinada com ciclos da fermentação de uma cerveja puro malte em um sistema descontínuo utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio. O projeto constituiu do estudo da fermentação com leveduras imobilizadas em volume de 20ml e de 20L, e volume de 10L para a avaliação da reutilização das leveduras. Analisou-se a produção de álcool, o consumo de substrato e a viabilidade do microrganismo ao longo do processo, como também as características sensoriais do produto. O estudo indicou uma similaridade entre os perfis cinéticos da fermentação em volume de 20ml e de 20L, no qual apresentaram um rendimento de 85,7% e 83,9%, respectivamente. Os biocatalizadores foram reutilizados em 4 fermentações descontínuas, apresentando ao final da última fermentação, rendimento de 87,79%. A avaliação sensorial indicou a existência de uma diferença significativa entre as amostras com leveduras livres e imobilizadas.

Palavras-chaves: Fermentação, Cerveja, Imobilização, *Saccharomyces cerevisiae*, Alginato

ABSTRACT

Fermentation is one of the most important stages for beer production, forming the main products of the drink, alcohol and carbon dioxide, in addition, compounds are generated, desired or not, responsible for characterizing it sensorially. The immobilization technique has been widely used in several industrial segments. In the fermentation process, the immobilization technique allows better handling of the biocatalysts, improves the control and long-term stability of the cells, protects the cells against shear forces and increases the cell density inside the capsules. Considering fermentation to be a critical and very important stage, this work evaluated the viability of the process combined with fermentation cycles of a pure malt beer in a batch system using Saccharomyces cerevisiae yeasts immobilized in calcium alginate. The project consisted of the study of fermentation with yeasts immobilized in a volume of 20ml and 20L, and a volume of 10L for the evaluation of the reuse of yeasts. Alcohol production, substrate consumption and viability of the microorganism were analyzed throughout the process, as well as the sensory characteristics of the product. The study indicated a similarity between the kinetic profiles of the fermentation in volume of 20ml and 20L, in which they presented a yield of 85.7% and 83.9%, respectively. The biocatalysts were reused in 4 batch fermentations, with 87.79% yield at the end of the last fermentation. The sensorial evaluation indicated the existence of a significant difference between the samples with free and immobilized yeasts.

Key-words: Fermentation, Beer, Immobilization, *Saccharomyces cerevisiae*, Alginate

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – Total de cervejarias por ano no Brasil.....21
FIGURA 2 – Conversão de glicose em etanol.....23
FIGURA 3 – Curva de crescimento celular.....25
FIGURA 4 – Estrutura celular da levedura.....27
FIGURA 5 – Técnicas de imobilização de leveduras de acordo com o mecanismo de localização celular.....31
FIGURA 6 – Algas marrons.....35
FIGURA 7 – Estrutura do alginato.....35
FIGURA 8 – Interação entre os monômeros G do alginato e o cátion bivalente no "modelo caixa de ovo" 36
FIGURA 9 – Formação de gel de alginato de cálcio.....37

ARTIGO 1

FIGURA 1 – Fluxograma de produção do mosto.....54
FIGURA 2 – Malte moído.....55
FIGURA 3 – Tanque de Brassagem com fundo falso (A) Recirculação sobre torta de malte filtrado (B).....55
FIGURA 4 – Esquema para produção de esferas alginato de cálcio.....57
FIGURA 5 – Reator para fermentação de 20ml.....58
FIGURA 6 – Esferas de imobilização celular.....63
FIGURA 7 – Concentração de glicose ao longo do tempo em meio com esferas de alginato.....64
FIGURA 8 – Linearização do modelo de pseudo 2º ordem para absorção de glicose em esferas de alginato de cálcio.....65
FIGURA 9 – Perfil fermentativo em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio em função do tempo (volume de 20ml) 67
FIGURA 10 - Perfil fermentativo da Fermentação 1 em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio (volume de 10L) 69
FIGURA 11 - Perfil fermentativo da Fermentação 2 em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da

Saccharomyces cerevisiae nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio (volume de 10L) 70
FIGURA 12 - Perfil fermentativo da Fermentação 3 em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio (volume de 10L) 71
FIGURA 13 - Perfil fermentativo da Fermentação 4 em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio (volume de 10L) 71
FIGURA 14 – Alterações presentes nas estruturas das esferas de imobilização celular ao final da Fermentação 4.....73
FIGURA 15 – Perfil fermentativo em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio em função do tempo (volume de 20L) 75

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1 – Dados gerados para o gráfico t/q *versus* tempo.....65
TABELA 2 – Taxa de produção de etanol (PP), conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e Rendimento de processo (R%) nas Fermentações 1, 2, 3 e 4...72

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°brix – grau brix

°C – graus Celsius

Acetil-CoA – acetilcoenzima A

ATP – adenosina trifosfato

Ba^{2+} - íon de bário

Ca^{2+} – íon de cálcio

Cd^{2+} - íon de cádmio

CervBrasil – Associação Brasileira da Indústria da Cerveja

CNT – nanotubos de carbono

CO_2 – gás carbônico

Co^{2+} – cobalto

Cu^{2+} – íon de chumbo

DNS – ácido 3,5 - dinitrosalicílico

g/L – grama por litro

H^+ – íon de hidrogênio

HPLC - *High performance liquid chromatograph*

L – litro

L/L – litro por litro

LDN – Laboratório de Dispositivos e Nanoestruturas

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

ml – mililitros

mm – milímetro

Mn^{2+} – manganês

NAD – coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAD+ - coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH – coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

Ni^{2+} – íon de níquel

nm – nanômetro

p/p – peso por peso

Pb^{2+} – íon de chumbo

PDMS – polidimetilsiloxano

pH – potencial Hidrogeniônico

PIB – Produto Interno Bruto

Sr^{2+} – íon de estanho

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Zn^{2+} – íon de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO ... 16
2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE ... 18
3. REVISÃO DE LITERATURA ... 19
3.1. CERVEJA ... 19
3.1.0. Mercado cervejeiro ... 21
3.2. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA ... 22
3.2.0. Processo Descontínuo ... 25
3.3. LEVEDURA - *Saccharomyces cerevisiae* ... 26
3.4. IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS ... 28
3.4.1. Alginato ... 33
3.4.2. Alterações Sensoriais ... 37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ... 40
ARTIGO ... 49
RESUMO ... 50
ABSTRACT ... 51
1. INTRODUÇÃO ... 52
2. MATERIAIS E MÉTODOS ... 53
2.1. PRODUÇÃO DO MOSTO ... 54
2.1.1. Moagem do malte ... 54
2.1.2. Mosturação ... 55
2.1.3. Fervura ... 56
2.2. PRÉ INÓCULO E IMOBILIZAÇÃO CELULAR ... 56
2.3. FERMENTAÇÃO ... 57
2.4. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS ... 58
2.4.1. Viabilidade Celular ... 58
2.4.2. Sólidos solúveis, pH e etanol ... 59
2.4.3. Concentração de substrato ... 59
2.4.4. Análise da absorção de glicose por esferas de alginato de cálcio ... 59
2.4.5. Análise Sensorial ... 60
2.5. ESTUDO CINÉTICO ... 61
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES ... 62
3.1. IMOBILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM ALGINATO DE CÁLCIO 62
3.2. ABSORÇÃO DE GLICOSE POR ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO ... 64

3.3. FERMENTAÇÃO 66
3.3.1. Estudo preliminar da fermentação com leveduras imobilizadas 67
3.3.2. Estudo da reutilização (ciclos) das leveduras em fermentação 69
3.4. FERMENTAÇÃO EXPERIMENTAL 74
3.5. ANÁLISE SENSORIAL 76
4. CONCLUSÃO 76
REFERÊNCIAS 77
APÊNDICE 1 85
APÊNDICE 2 86
ANEXO 1 87

1. INTRODUÇÃO

Cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais populares em todo o mundo, uma bebida fermentada, carbonatada e com diversidade de sabores, apresentando-se em diferentes estilos.

De acordo com a Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, “Cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro”.

Com o crescimento do setor cervejeiro no Brasil, as indústrias tentam se firmar em um cenário cada vez mais competitivo e com uma alta exigência de qualidade em seus produtos com preço acessível (REBELLO, 2009). Alguns meios que possam diminuir o custo de produção são aplicados ao longo do processo, como a utilização de adjuntos maltados ou não, como aveia, milho, arroz, trigo, centeio (VENTURINI, 2005). Além de variações na matéria-prima utilizada, parâmetros como temperatura e tempo de fermentação proporcionam diversidade e caraterísticas sensoriais únicas à bebida (KWAKITA; QUEIROZ, 2017).

Existem dois principais grupos na qual a cerveja pode ser enquadrada: tipo *Ale* (alta fermentação) e tipo *Lager* (baixa fermentação). As cervejas tipo *Ale* são fermentadas em temperaturas entre 18°C a 22°C, entre 3 a 5 dias (VENTURINI, 2005), enquanto que as cervejas do tipo *Lager* são fermentadas a temperaturas de 3,3 a 13°C, podendo durar cerca de 4 a 12 semanas junto a maturação (ARAÚJO *et al*., 2003 *apud* REBELLO, 2009). Por causa da menor temperatura, geralmente, os estilos de cerveja do tipo *Lager* são mais leves (REBELLO, 2009), sendo as mais produzidas no Brasil, já que são mais adequadas ao nosso clima, enquanto que as cervejas *Ale* possuem teor alcoólico superior a 5%, com maior concentração de lúpulo, no entanto, apresentam-se como mais adocicadas (OETTERER, REGITANO-D’ARCE, APOTO, 2006).

A produção de cerveja pode ser dividida em oito etapas essenciais: moagem do malte, mosturação, filtração do mosto, fervura do mosto, tratamento do mosto (aeração, resfriamento e remoção do precipitado), fermentação,

maturação e clarificação (VENTURINI, 2005). Ao final, seguem para a etapa de envase.

A etapa da moagem é feita para que haja o rompimento da casca do malte e consequente exposição do endosperma (rico em amido), esmagando-o e promovendo uma melhor atuação enzimática (VENTURINI, 2005). É importante, que durante esse processo, a formação de farinha fina seja mínima, evitando a formação de material mucilaginoso durante a mosturação (AQUARONI, 2001).

Também denominada como brassagem, a mosturação consiste na mistura do malte com a água em temperatura controlada, tendo como objetivo a recuperação, no mosto, da maior quantidade possível de extrato a partir de malte ou da mistura de malte e adjuntos (AQUARONI, 2001). As enzimas ativadas durante a germinação do malte, solubilizam componentes ainda insolubilizados do malte, modificando a estrutura química de alguns componentes solúveis, gerando o “extrato”, chamado de “mosto” (OETTERER, REGITANO-D’ARCE, APOTO, 2006). A etapa posterior é caracterizada pela fervura do mosto e adição do lúpulo, para que ocorra a inativação enzimática, esterilização do mosto, coagulação de proteínas, extração de compostos amargos e aromáticos do lúpulo, produção de substâncias que constituem aroma e sabor, evaporação de água excedente e de componentes aromáticos não desejáveis ao produto (VENTURINI, 2005). A fermentação consiste no ponto chave da produção de uma bebida alcoólica, tendo como objetivo principal a conversão de açúcares em etanol e gás carbônico (VENTURINI, 2005).

Essa etapa, inicia-se com a adição do fermento ao mosto cervejeiro. A quantidade do fermento inoculado irá variar de acordo com o teor de extrato, composição, nível de aeração e temperatura do mosto. Esta quantidade de fermento deve ser tal que proporcione uma concentração de 5 a 15 milhões de células de levedura por mililitro de mosto. Geralmente, o nível ótimo é de 10^7 células/ml (AQUARONI, 2001).

Com a competitividade do mercado, tanto para a redução de custos como a introdução de novos produtos, os cervejeiros buscam por inovações tecnológicas para seus processos (REBELLO, 2009).

O sistema de imobilização tem sido estudado para produção de cerveja em fermentação contínua como um método mais rentável, atraindo a atenção de pesquisadores (ALMONACID *et al.,* 2010).

De acordo com Kosseva (2010), a principal vantagem do método de encapsulamento de leveduras é a alta concentração celular, gerando elevadas taxas de fermentação. A utilização de células imobilizadas permite uma melhor produtividade da fermentação, viabilidade de processamento contínuo, menor custo de recuperação de leveduras e a facilidade em sua reutilização (MARGARITIS e MERCHANT, 1984) e a proteção do microrganismo de forças de cisalhamento (KOURKOUTAS, 2003).

Apesar das grandes vantagens trazidas pela utilização da fermentação contínua com leveduras imobilizadas, essa tecnologia tem como principal problema a alteração negativa ao sabor da bebida. Este método de fermentação tem fortes chances de causar mudanças ao produto, limitando o espaço livre da levedura, a aprisionando em um sólido microambiente tridimensional. Uma ou outra, ou até mesmo ambas, podem alterar características da bebida (ALMONACID *et al.,* 2010).

Sendo assim, o presente projeto teve como objetivo o estudo da eficácia da fermentação descontínua de uma cerveja *ale* utilizando leveduras *Sccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio, avaliando importantes parâmetros para a compreensão do processo, a viabilidade da célula encapsulada para a reutilização do microrganismo em diferentes ciclos e o comportamento da fermentação em ampliação de escala.

2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

Sabe-se que o processo de produção de cerveja tem como etapa mais longa e crítica a fermentação, sendo também uma das mais importantes, pois é nesta fase que muitos compostos são formados para caracterizar sensorialmente a bebida, além de gerar álcool etílico potável e gás carbônico. Alinhado a isso, o crescimento do consumo de cerveja nos últimos anos, vem gerando a necessidade de otimizar o processo de fabricação, reduzindo o tempo da produção e mantendo, ou até mesmo melhorando a qualidade do seu produto em todos os aspectos.

Fermentação com a utilização de leveduras imobilizadas tem se mostrado, embora ainda sendo pouco utilizado nas indústrias, uma ótima opção para o aumento da produtividade no processo. O uso de leveduras imobilizadas para a produção de cerveja pode gerar a redução do tempo de fermentação, tendo em vista a alta concentração de biomassa, além de se apresentar como um insumo de fácil manejo, facilitando até mesmo a etapa de filtração, já que pode gerar pouco ou praticamente nenhum resíduo.

Apesar dos estudos com leveduras imobilizadas em fermentação contínua, ainda são escassas informação sobre o seu uso em processo fermentativo descontínuo. Desta forma, alguns questionamentos precisam ser respondidos: Como se dará o comportamento do processo fermentativo de forma descontínua? Quantos ciclos de fermentação podem ser realizados com a reutilização das leveduras imobilizadas sem que ocorra a alteração da qualidade do produto? É gerado algum tipo de alteração sensorial ao produto? Se sim, qual o motivo? De que forma a imobilização em alginato de cálcio pode interferir na fermentação?

Hipótese: A fermentação com leveduras imobilizadas em um sistema descontínuo facilitará o armazenamento e reuso das leveduras. Diminuirá o tempo de fermentação em decorrência da alta densidade de microrganismo nas esferas, sem alterar o perfil cinético de fermentação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CERVEJA

Dentre as bebidas fermentadas alcoólicas consumidas no mundo, a cerveja é uma das mais populares, estando presente na cultura de diversos povos, sendo consumida em várias ocasiões.

Alguns estudos acreditam que o surgimento da cerveja ocorreu ocasionalmente e por conter basicamente os mesmos ingredientes que o pão, existe uma grande relação entre esses dois alimentos, que em determinada época de muitas civilizações, faziam parte da cultura e da alimentação desses povos (SILVA *et al.,* 2016). Historicamente, estima-se que a produção de cerveja seja originária da região da Mesopotâmia, no qual a cevada crescia selvagemente, sendo chamada pelos sumérios de *sikaru,* de acordo com inscritos encontrados em ruinas na região que antes era a Mesopotâmia

(OETTERER; ALCARDE, 2006; DRAGONE; OLIVEIRA, SILVA; ALMEIDA, SILVA, 2016). Segundo algumas evidências, na Babilônia em 6.000 a.C. eram produzidas cervejas com cevada maltada. Não apenas os babilônios, mas outros povos produziam e consumiam cerveja como no Egito, onde era utilizada em rituais religiosos, sendo distribuída ao povo (DRAGONE; OLIVEIRA, SILVA; ALMEIDA E SILVA, 2016), por gregos e romanos durante o seu apogeu e povos bárbaros que ocuparam a Europa durante o império romano (AQUARONE *et al.,* 2001).

De acordo com a Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, “Cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro”. A legislação brasileira ainda permite a utilização de adjuntos, podendo ser a cevada não maltada e outros cereais maltados ou não, além de mel e ingredientes de origem vegetal, fontes de amido e de açúcares (OETTERER; ALCARDE, 2006; BRASIL, 2019). Esses cereais são capazes de substituir parcialmente o malte ou complementá-lo, porém o seu volume não pode ser superior a 45% do extrato primitivo, enquanto que o carboidrato vegetal e o mel utilizado não podem ser superior a 25% do extrato primitivo (BRASIL, 2019).

O uso de adjuntos é uma prática muito comum na indústria cervejeira, sendo uma alternativa para redução de custos, uma vez que proporciona um extrato mais barato em relação ao malte (HOUGH, 1991). Além disso, contribuem com características organolépticas da bebida, dependendo da fonte do adjunto (DRAGONE; OLIVEIRA, SILVA; ALMEIDA, SILVA, 2016).

Em questões nutricionais, a cerveja apresenta importantes compostos como vitaminas do complexo B, polifenóis, fosfatos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos, sendo também uma autêntica fonte de fibras solúveis e nutrientes, tornando-se um alimento compatível com uma alimentação equilibrada. A levedura, utilizada na etapa de fermentação, propicia aumento da defesa do organismo, regula a função intestinal e melhora a textura da pele, cabelo e unhas (ALMEIDA, SILVA, 2005).

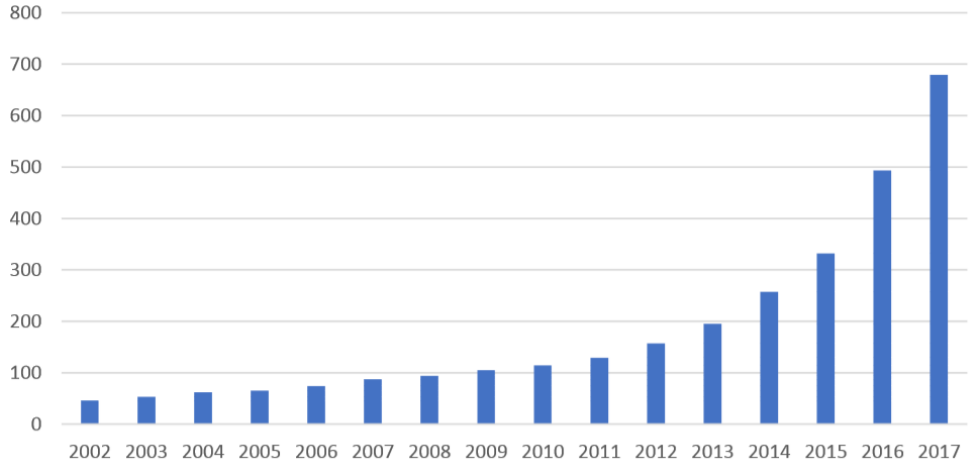
3.1.0. Mercado cervejeiro

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja, o setor cervejeiro é um dos mais tradicionais no Brasil. Este setor, criado em 1853, faz parte de uma ampla cadeia no país que vai do agronegócio ao pequeno varejo, atravessando mercados de embalagens, logística, maquinário e construção civil, empregando ao longo dessa cadeia mais de 2,2 milhões de pessoas, o que representa 2,3% da população economicamente ativa no país. A distribuição da produção de cerveja no Brasil mostra que o sudeste detém mais da metade da parcela de produção (53,8%), seguida pelo nordeste (23,2%), sul (12,3%), centro-oeste (8,3%) e norte (2,4%) (CervBrasil, 2016).

Dados referentes a 2016, mostram que essa cadeia produtiva ao qual o setor cervejeiro está inserido foi responsável por 1,6% do PIB e 14% da indústria de transformação nacional, com uma produção de 14 bilhões de litro por ano (CervBrasil, 2016).

Ao final do ano de 2017, o Brasil registrou um total de 679 cervejarias legalmente instaladas no país. Esse número reafirma a tendência de crescimento do número de estabelecimentos e consequentemente de seus produtos, já prevista em anos anteriores (Figura 1) (MULLER; MARCUSSO, 2017).

Figura 1 – Total de cervejarias por ano no Brasil



Fonte: MULLER; MARCUSSO, 2017

Segundo dados da CervBrasil (2016), o Brasil se posiciona como um dos três maiores produtores de cerveja do mundo com produção de 14 bilhões de

litros por mês, ficando atrás da China, produzindo 48,6 bilhões de litros ao ano, dos Estados Unidos (22,5 bilhões de litros/ano). Os brasileiros estão presentes no grupo dos trinta maiores consumidores de cerveja do mundo, resultando em um consumo médio de 62 litros por pessoa/ano com um forte potencial de crescimento.

3.2. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação, um dos processos mais conhecidos e antigos da humanidade, foi durante muitos anos atribuída a preservação de alimentos e bebidas. Porém, a pouco mais de um século, Pasteur demonstrou que a fermentação ocorria através da ação de microrganismos com a ausência de oxigênio. Só em 1850, Pasteur concluiu que essa reação tinha como princípio a transformação de açúcar em etanol, causado por células vivas, as leveduras. Com o avanço da ciência, a fermentação passou a ser considerada como uma tecnologia fundamental e vital, como um dos importantes pilares da biotecnologia moderna, buscando-se novas tecnologias capazes de obter produtos com valor econômico agregado (PANTOJA, 2006).

O processo de fermentação ocorre em biorreatores, reatores bioquímicos ou reatores biológicos, que são reatores químicos em que ocorre diversificadas reações químicas catalisadas por “biocatalisadores”, podendo ser enzimas ou células vivas. Dessa forma, os biorreatores que operam sem a presença de células vivas são denominados de “reatores enzimáticos”, enquanto biorreatores são aqueles em que as reações são realizadas com a presença de células vivas. Os reatores que operam com células vivas mais difundidos e amplamente conhecidos, são aqueles que utilizam microrganismos, e que vem sendo empregados desde a década de 1940 em processos industrias na elaboração de diversos produtos, como enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos, solventes, ou ainda no tratamento de resíduos orgânicos (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001).

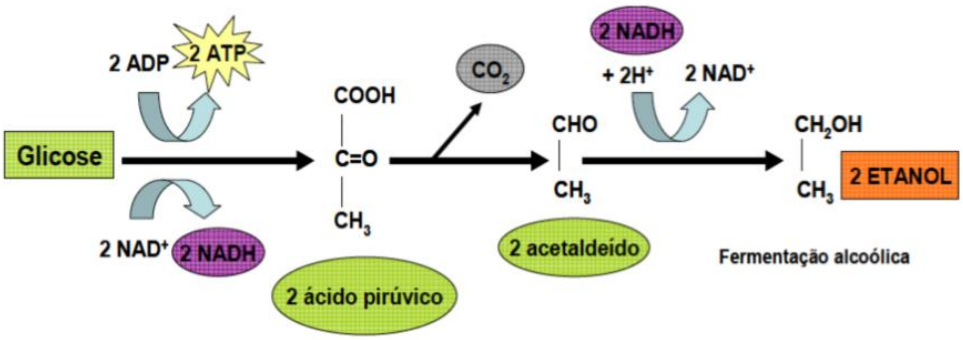
O biorreator deve proporcionar um ambiente controlado, permitindo o crescimento eficiente das células para a obtenção do produto de interesse. Para o desempenho satisfatório do processo, alguns pontos devem ser bem definidos, como matéria-prima e biocatalisador, configuração do biocatalisador (livre ou imobilizado), conhecimento do metabolismo e atividades microbianas,

quantidade e características do produto e subprodutos, como também o balanço de massa e energia do sistema (FOGLER, 2012).

Existem diversas formas de se conduzir um reator biológico, dependendo das características particulares de cada microrganismo, o meio de cultivo e dos objetivos específicos do processo que será executado. De uma maneira geral, as formas de atuação de um biorreator podem ser: descontínuo, semicontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Tratando da fermentação de forma bioquímica, ela é caracterizada pela transformação de açúcar em etanol e dióxido de carbono em condições anaeróbias. Com a metabolização do açúcar, é gerada uma fonte de energia, o trifosfato de adenosina (ATP), sendo empregado em processos metabólicos da célula, necessários para manutenção da vida, crescimento e multiplicação (BRUICE, 2006). Durante o processo de transformação do açúcar em etanol e CO_2 ocorrem 12 reações em sequencias ordenadas, catalisadas por enzimas especificas, presentes no citoplasma celular, no qual é processado a fermentação alcoólica, pela via glicolítica (Figura 2).

Figura 2 – Conversão de glicose em etanol



Fonte: Galassi, 2007

Ao metabolizar duas moléculas de glicose, são geradas duas moléculas de piruvato. A coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) existente na parede e no interior da célula, atua no processo de oxidação, sendo o NAD+, sua forma oxidada e transformada em NADH (forma reduzida), gerando energia ao produzir duas moléculas de ATP. Com a ausência de oxigênio e pela ação da enzima piruvato descarboxilase, o piruvato é descarboxilado, fornecendo

acetaldeído, este por sua vez é reduzido pelo NADH a etanol, pela enzima álcool desidrogenase, desprendendo CO_2 (NELSON e COX, 2000; STECKELBERG, 2001).

A equação de Gay-Lussac (Equação 1) representa bem a reação de fermentação alcoólica:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \qquad \text{(Equação 1)}$$

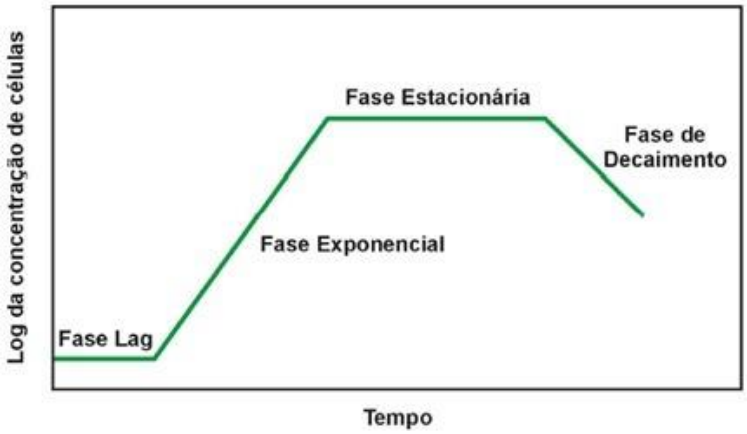
A equação demonstra que a utilização de um mol de glicose gera dois mols etanol e dois mols de CO_2. Além disso, também é gerado 57kcal de energia.

Teoricamente, o rendimento de produção seria de 0,511 g de etanol gerado a cada 1 g de glicose consumida, porém, esse rendimento não é real, visto que parte da glicose é transformada em outros subprodutos, como álcoois superiores, gliceróis, aldeídos, ésteres. De acordo com Boulton *et al.* (1999), em um modelo de fermentação iniciado com cerca de 22 a 24°brix, 95% do açúcar é convertido em etanol e CO_2, 1% em material celular e o restante (4%) é transformado em outros subprodutos. O rendimento estequiométrico em escala industrial pode atingir até 96%, porém, se ocorrer contaminação esse valor diminui (LIMA *et al*., 2001).

A formação de álcoois superiores advém do metabolismo de aminoácidos ou açúcares durante o processo da fermentação. O subproduto glicerol, considerado um dos produtos secundários mais importantes, é formado por meio da redução do fosfato dehidroxicetona. O acetaldeído, é um composto intermediário do processo de fermentação, porém, sua maior parte é reduzido a etanol. Ésteres são gerados por reações entre álcoois, acetilcoenzima A (acetil-CoA) e etanol. Esse subproduto também pode ser formado por simples reações químicas catalisadas por íons de hidrogênio, capazes de favorecer o equilíbrio entre ácido e álcool (MAMEDE e PASTORE, 2004). Uma parte da energia produzida durante a fermentação é perdida em forma de calor. Em geral, há um aumento de 1,3°C na temperatura para cada °brix consumido por litro. Alguns fatores como pH, temperatura, pressão, concentração de substrato e produto interferem diretamente nos parâmetros cinéticos da fermentação relacionados ao crescimento celular, consumo de substrato e geração de produto. (BOULTON, 1999).

O desenvolvimento do processo de fermentação alcoólica em escala industrial pode ser dividido em quatro diferentes etapas (Figura 3).

Figura 3 – Curva de crescimento celular



Fonte: https://brainly.com.br

A fase *lag* ou fase de adaptação é a etapa no qual ocorre a multiplicação intensa das células, com um alto consumo de açúcar e baixo desprendimento de gás carbônico, garantindo uma alta concentração de células viáveis. A fase exponencial, também chamada de tumultuosa, é considerada a etapa principal no qual ocorre a intensa produção de etanol e desprendimento de CO_2, caracterizado pela intensa formação de espuma e aumento da acidez. A próxima etapa, a fase estacionária e de decaimento apresenta a diminuição da atividade fermentativa pelo esgotamento de substrato e maior concentração de subprodutos, caracterizada pela menor liberação de CO_2 e menor temperatura (CARVALHO e SATO, 2001).

3.2.0. Processo Descontínuo

O sistema de operação descontínuo vem sendo utilizado pelo homem desde a antiguidade, e até hoje é o mais empregada para a obtenção de vários produtos fermentados, sendo conhecidos também como fermentações em batelada ou processo descontínuo de fermentação (CARVALHO e SATO, 2001).

Essa operação é importante para a compreensão de dados de cinética do processo fermentativo (SCHIMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

O processamento desse sistema é caracterizado inicialmente pela esterilização da solução nutriente no próprio fermentador, sendo inoculada com

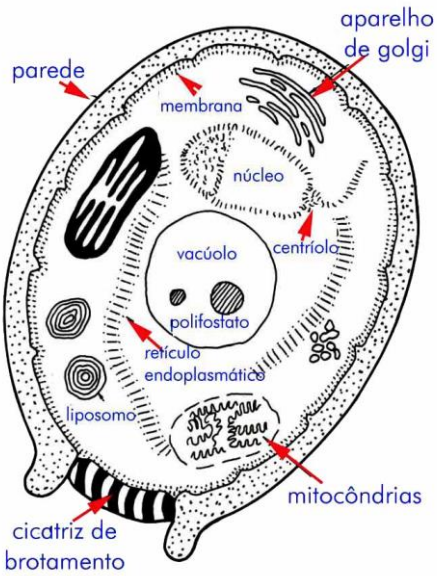
microrganismos e incubada, garantindo condições ótimas para a fermentação. No decorrer do bioprocesso nada é adicionado, com exceção do oxigênio, quando se tratar de um processo aeróbico, antiespumante, e ácido ou base para o controle do pH. Com o término da fermentação, o fermentador é descarregado e o meio fermentado recebe tratamentos finais. Em seguida, o fermentador é higienizado, esterilizado, para então ser recarregado com novo mosto e inóculo (CARVALHO e SATO, 2001).

O processo descontínuo apresenta algumas vantagens, como a assepsia do processo, diminuindo os riscos de contaminação, flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os fermentadores para a fabricação de diferentes produtos e melhor condição de controle com relação à estabilidade genética do microrganismo. Além disso, tem a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desempenhando um determinado lote de produto. Algum dos alimentos e bebidas conduzidos por esse processo são iogurte, cerveja, vinho, chucrute, picles, entre outros. Porém, a operação descontínua apresenta algumas desvantagens, como os baixos rendimentos e produtividades devido a maior possibilidade de inibição por substrato e produto e o tempo de duração de cada etapa do processo, descarga, lavagem, esterilização e nova carga do biorreator, para uma nova fermentação (CARVALHO e SATO, 2001).

3.3. LEVEDURA - *Saccharomyces cerevisiae*

Leveduras são microrganismos eucarióticos (Figura 4), constituídos por uma única célula de formato esférico ou oval, formando uma das classes mais importantes dos fungos com diâmetro entre dois e oito micrometros (SANTANA, CORDEIRO e RIBEIRO, 2008). Sua reprodução ocorre por fissão ou gemulação da célula-mãe, quando o broto atinge o tamanho da célula mãe (ORTIZ, 2015).

Figura 4 – Estrutura celular da levedura



Fonte: http://bigfieldcraftbrewery.blogspot.com

A parede celular é rígida em células adultas, porém flexíveis quando jovens, tendo em sua composição predominantemente hidratos de carbono e um menor teor de proteínas (STECKELBERG, 2001). Quimicamente, as leveduras contêm 40-50% de proteína, 4-10% de ácido nucleico e 1-6% de lipídeos, sendo estas porcentagens em massa seca (ORTIZ, 2015).

Grande parte das leveduras sobrevivem em meios com alto teor de açúcares, sendo seres independentes, que realizam a fermentação no intuito de gerar energia para o seu metabolismo e assim poder sobreviver (SANTANA, CORDEIRO e RIBEIRO, 2008). De acordo com Carvalho e Sato (2001), as leveduras são capazes de utilizar variadas alternativas de fonte de carbono para a sua manutenção e reprodução, como glicose, sacarose, frutose, glicerol e sorbitol.

Quando o metabolismo é completamente aeróbio, cerca de 50 a 55% da fonte de carbono é convertido em células. Em caso anaeróbio, apenas 10% do carbono do substrato é convertido em células (ORTIZ, 2015).

No processo de fermentação alcoólica, as leveduras amplamente utilizadas são espécies do gênero *Sccharomyces* sendo uma das principais a *Sccharomyces cerevisiae*, considerado um dos biocatalisadores mais versáteis e de baixo custo (DUARTE, 2013; SANTANA, CORDEIRO e RIBEIRO, 2008).

Essas leveduras são preferencialmente utilizadas na sua forma integra, ao invés de enzimas isoladas, evitando a necessidade de reciclar o cofator, etapa necessária ao se usar uma enzima pura (CARVALHO e SATO, 2001). Sua forma integra dispõe de uma grande variedade de atividades enzimáticas, possibilitando uma baixa seletividade no processo biocatalítico, causada pela ação simultânea de várias enzimas ao mesmo tempo, que apresentam diferentes perfis cinéticos e velocidades de conversão para um mesmo substrato (GALANAKIS, 2012).

3.4. IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS

A técnica de imobilização de leveduras consiste em confinar fisicamente células em um espaço restrito, impedindo a liberdade de seus movimentos de forma a conservar suas atividades biológicas em operações contínuas ou descontínuas (MORENO-GARCIA *et al.,* 2018; COVIZZI *et al.,* 2007).

A imobilização permite ações naturais da célula durante o seu processo de crescimento em superfícies ou dentro de estruturas naturais (KOURKOUTAS *et al.,* 2004). De forma natural, as células são imobilizadas por adesão em superfícies. Além disso, ocorrem floculação em bioprocessos industriais, formação de pellets e a fixação superficial, que também são consideradas formas de imobilização (ES, VIEIRA, AMARAL, 2015).

O processo de imobilização causa o aumento da densidade celular, aumentando e mantendo certos metabólitos, como os aromáticos, melhora o controle e estabilidade a longo prazo das células, permite a regeneração e reutilização do biocatalizador, além de proteger as células contra forças de cisalhamento, já que existe um material de suporte adicional para fornecer proteção. Essa técnica permite que as células sejam utilizadas de forma repetida e contínua, mantendo a alta densidade celular ao longo do processo, causando a redução de seu custo (MORENO-GARCIA *et al.,* 2018; ES, VIEIRA, AMARAL, 2015).

A redução do tempo e o volume final de produção são fatores importantes que caracterizam o aumento da produtividade na indústria, pois alteram o custo final do processo. Sendo assim, indústrias buscam cada vez mais investir em projetos inovadores para uma maior eficiência de produção, que resultem em produtos de alta qualidade, com custo e tempo de processo

reduzidos (ES, VIEIRA, AMARAL, 2015). Bioprocesso industrial sempre é catalisado por um biocatalizador específico, com isso, a recuperação desses biocatalizadores e sua estabilidade operacional durante o processo é crucial para a redução de custos e maior eficiência. A imobilização vem mostrando ser uma técnica inovadora, cada vez mais estudada, capaz de suprir necessidades industriais para uma maior produtividade. Esse sistema permite a recuperação de biocatalizadores para a sua reutilização, melhora a estabilidade, seletividade e atividade das moléculas, além disso, elimina etapas de separação e purificação. Tem atuado em diversos setores industriais como alimentício, tratamento de águas residuais, têxtil, alcooleiro, biomédico, entre outros (ES, VIEIRA, AMARAL, 2015).

As técnicas de adsorção, aprisionamento em gel e ligação covalente são os métodos mais utilizados para imobilização em bioprocessos, no qual, para o processamento de alimentos a técnica mais útil é a de aprisionamento utilizando-se polímeros naturais como alginato, carragenina, quitosana e pectina. Esses polissacarídeos apresentam algumas vantagens tornando os bastante utilizados, graças a sua alta biocompatibilidade, baixo custo, não tóxicos, além de oferecer técnicas versáteis para a preparação de biocatalisadores (KOSSEVA, 2011).

A imobilização celular tem se mostrado cada vez mais como uma técnica com vantagens significantes. Quando comparada à células livres agindo em bioprocessos, apresentam vantagens como a maior densidade celular por volume de reator, maior facilidade na etapa de separação do meio de reação, menor inibição por produto, menor tempo de reação (OLIVEIRA *et al.,* 2011) e redução da fase *lag* (Duarte *et al.,* 2013). Taskin *et al*. (2016) realizou um estudo no qual produziu lipase através de levedura livre e imobilizada utilizando óleo residual como substrato. Ao final do experimento, puderam concluir que as células imobilizadas foram mais favoráveis para a produção de lipase do que as células livres, além disso, foi observado que poderiam ser reutilizadas dez ciclos sucessivos sem perdas significativas na atividade da lipase.

A técnica de imobilização vem sendo comumente utilizada em processos de fermentação (AZHAR *et al*., 2017) como na produção de vinho (GIANLUCA *et al.,* 2016; NEVE, PANTOJA E SANTOS, 2014), cidra (NEDOVIC *et al.,* 2000; NIKOLAOU *et al.,* 2017), hidromel (PEREIRA *et al.,* 2014; SROKA *et al.*, 2016), vinhos de fruta (DJORDJEVIC *et al*., 2015; OLIVEIRA *et al*., 2011), bioetanol

(KIM *et al.,* 2014) e cerveja (NAYDENOVA *et al.,* 2014; NAYDENOVA *et al.,* 2013).

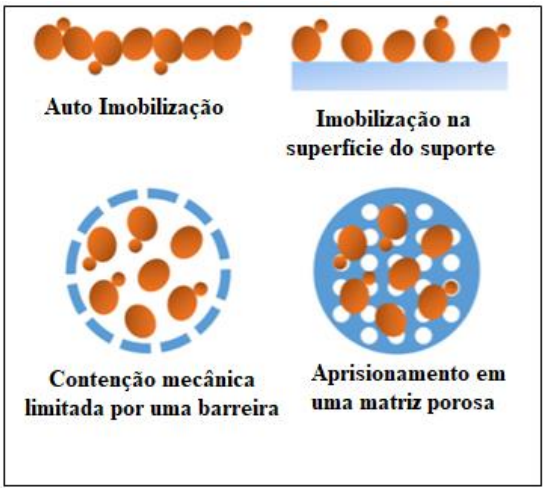
O setor cervejeiro é uma das áreas com maior tradição no processo fermentativo. Ano após ano, as indústrias de cerveja vêm buscando inovar em sua produção, resultando na implantação de sistemas de fermentação contínua e o uso de leveduras imobilizadas em seu processo, melhorando o rendimento industrial (ES, VIEIRA, AMARAL, 2015). De acordo com Kourkoutas *et al.* (2004), o sistema de imobilização na indústria cervejeira tem possibilitado a redução do tempo de processo sem que haja uma alteração da qualidade do produto, com o aumento da densidade celular no reator, causando uma alta produtividade e consequentemente reduzindo-se o custo.

A imobilização celular também tem sido utilizada em processos para reduzir o teor alcoólico de fermentações, como mostrou um estudo realizado por Cononico, Comitini e Ciani (2016), no qual, células imobilizadas de leveduras não *Saccharomyces,* como *Starmerella bombicola, Metschnikowia pulcherrima, Hanseniaspora osmophila* e *Hanseniaspora uvarum*, foram utilizadas para reduzir o teor final de álcool presente em vinhos. Observaram resultados positivos, no qual houve um consumo de 50% do açúcar nos três primeiros dias sem produção de etanol, seguindo-se a fermentação alcoólica com *Saccharomyces* livres.

Navrátil *et al*. (2002) realizou um trabalho no qual utilizou cepas mutantes imobilizadas de *Saccharomyces* que apresentavam defeitos na síntese de enzimas do ciclo triácido carboxílico, para a produção de cerveja não alcoólica. O estudo mostrou que houve uma baixa formação de álcool ao final do processo com valores variando entre 0,07 e 0,31%(p/p).

A imobilização pode ser realizada por diferentes técnicas e a escolha correta de qual método utilizar é fundamental, levando-se em conta o processo ao qual será submetido, o material utilizado e a preservação do biocatalizador, como também a sua estabilidade ao longo do processo. Segundo Moreno-Garcia *et al*. (2018), as técnicas de imobilização de leveduras de acordo com o mecanismo de localização celular, podem ser divididas de quatro formas (Figura 5): auto imobilização, imobilização na superfície do suporte, contenção mecânica limitada por uma barreira e aprisionamento em uma matriz porosa.

Figura 5 - Técnicas de imobilização de leveduras de acordo com o mecanismo de localização celular



Fonte: Moreno-Garcia *et al*. (2018) modificado

Algumas espécies de leveduras tem a capacidade de se auto imobilizarem naturalmente. Essa ação favorece os microrganismos permitindo uma cooperação celular para que haja um melhor aproveitamento dos recursos disponíveis e melhora as chances de sobrevivência resistindo melhor ao estresse. Microrganismos podem realizar várias formas multicelulares de imobilização, como adesão, formação de biofilmes, formação de filamentos e floculação (MORENO-GARCIA *et al*., 2018).

A floculação celular consiste na agregação de organismos para a formação de uma unidade maior, podendo ocorrer de forma natural, por floculantes ou agentes reticulantes. Depende de alguns parâmetros como pH, nutrientes, disponibilidade de oxigênio e composição da parede celular (MORENO-GARCIA *et al.,* 2018; GENISHEVA, TEIXEIRA e OLIVEIRA, 2014; KOURKOUTAS, 2004). Essa técnica se apresenta como uma interessante alternativa em bioprocessos industriais por sua simplicidade e baixo custo, sendo frequentemente aplicada na fermentação secundária de espumantes (TORRESI *et al.,* 2011) e na produção de cerveja (GENISHEVA, TEIXEIRA e OLIVEIRA, 2014).

Esta técnica não só é utilizada em processos para a obtenção de bebidas fermentadas, como também em produção de etanol. Em estudo realizado por Xue *et al.* (2016), membranas de polidimetilsiloxano (PDMS) foram misturadas com nanotubos de carbono (CNT) para recuperação de etanol produzido a partir

da fermentação de leveduras auto-floculantes. Essa levedura (SPSC01) foi desenvolvida através da técnica de fusão do protoplasto a partir da fissão da levedura floculante *Schizosaccharomyces pombe* e a levedura não-floculante *Saccharomyces cerevisiae*. O estudo mostrou que a mistura de PDMS com CNT acoplado a fermentação de leveduras floculantes não só reduz a inibição mediada por etanol das células, mas também reduz o risco de incrustação. Um outro estudo realizado por Tan *et al.* (2015), foi demonstrada a eficiência da fermentação contínua realizada por levedura floculante *Saccharomyces cerevisiae* (KF-7) para a produção de etanol a partir de suco de beterraba.

A técnica de imobilização em um suporte sólido caracteriza-se pela fixação de células a um transportador por meio da adsorção (ligações iônicas ou forças eletrostáticas) ou ligação covalente. Esse método é amplamente empregado, por causa do baixo custo do material utilizado e a sua simplicidade (MORENO-GARCIA *et al*., 2018). Porém, por não existir uma barreira entre o líquido e as células, pode ocorrer o desprendimento do suporte, dependendo da composição da parede celular, pH e composição iônica do meio (GENISHEVA, TEIXEIRA e OLIVEIRA, 2014). Existe uma diversidade de possibilidade de suportes, como o uso de material celulósico (GANATSIOS *et al.,* 2014; TANG e LE, 2013), resinas (SCHOINA *et al*., 2014), pedaços de frutas, que podem agregar características sensoriais ao meio (MORENO-GARCIA *et al*., 2018).

O sistema de imobilização por contenção em barreira pode ocorrer pelo aprisionamento das células em microcápsulas, pelo uso de filtros de membrana microporosa ou pela imobilização em uma superfície de interação de dois líquidos imiscíveis (KOURKOUTAS *et al*., 2004). Essa técnica é ideal para sistemas em que é desejado uma transferência mínima de substrato e produto (MORENO-GARCIA *et al.,* 2018). A concentração celular com a utilização dessa técnica é alta, por esta razão, é necessário que as membranas utilizadas como barreira permitam livremente a permeabilidade aos nutrientes e produtos durante a fermentação, como resistentes mecanicamente (STREHAIANO *et al*., 2006; GENISHEVA, TEIXEIRA e OLIVEIRA, 2014).

Imobilização por aprisionamento em uma matriz porosa é caracterizada pela incorporação das células a uma rede rígida, capaz de impedir a sua difusão no meio externo, porém, ainda permite a transferência de substrato e produto. Essa técnica pode ser realizada introduzindo a célula a um material poroso, onde

sua mobilidade é restrita com o crescimento de outras células, ou sintetizando a matriz sólida *in situ* ao redor das células (MORENO-GARCIA *et al*., 2018; GENISHEVA, TEIXEIRA e OLIVEIRA, 2014). A principal vantagem desta técnica é a possibilidade de transporte de compostos de baixo peso molecular em uma matriz permeável (GUISAN, 2006). Porém, existem algumas desvantagens, como a liberação de células, quando estas se encontram na superfície externa da matriz, para isso são utilizados métodos de duplas camada. Estudos realizados por Naydenova (2013) e Naydenova (2014), mostram a eficiência na utilização de leveduras encapsuladas em matriz de alginato e quitosana na produção de cerveja *lager.*

A imobilização pode ser responsável por algumas alterações que ocorrem na célula, como a multiplicação, fisiologia e atividades metabólicas. Estudos realizados, tem demonstrado alterações no metabolismo celular com a imobilização, alguns parâmetros têm sido apontados como causa dessas alterações como limitações de transferência de massa por difusão, distúrbio no crescimento padrão, tensão superficial e efeitos de pressão osmótica, redução da atividade de água, mudanças na morfologia celular e alteração da permeabilidade da membrana. (KOURKOUTAS *et al.,* 2004). Estudos comparativos sobre células imobilizadas e livres relatam os efeitos sobre o metabolismo energético da levedura, aumento de polissacarídeos de armazenamento, taxas de crescimento, aumento da absorção de substrato e rendimento, menor produção de subprodutos da fermentação, maiores valores de pH intracelular, aumento da tolerância contra compostos inibitórios e tóxicos e aumento da atividade da invertase (NORTONAND D'AMORE, 1994).

3.4.1. Alginato

A escolha do suporte para o processo de imobilização é de grande importância, devendo ser considerado a sua aceitação pelo consumidor e o processo e as condições ao qual será submetido (GENISHEVA, TEIXEIRA e OLIVEIRA, 2014). O material utilizado para o suporte, deve ter a capacidade de retenção de uma alta carga celular e apresentar uma estabilidade mecânica e química para evitar possíveis danos a matriz ao longo do processo. Além disso, o material deve permitir a facilidade de separação das células imobilizadas do meio (ES, VIEIRA, AMARAL, 2015). O suporte pode ser usado em sua forma

natural ou submetidos à tratamentos que possam modificar sua superfície em contato com a biomassa (GENISHEVA *et al.,* 2011).

Suportes naturais apresentam baixíssimo custo, sendo utilizados com o mínimo ou nenhum pré-tratamento, como o bagaço do malte, pedaços de frutas, madeira e/ou serragem. Diversos materiais inorgânicos podem ser utilizados como suporte de imobilização, como cerâmicas e vidro poroso, poliuretano, entre outros, no processo de fermentação. Porém, podem apresentar significativas mudanças no metabolismo e na viabilidade celular (MORENO-GARCIA *et al.*, 2018).

Polímeros naturais ou sintéticos tem sido bastante utilizado no processo de imobilização por sua alta capacidade de formação de gel em condições adversas, além de formar cápsulas esféricas, protegendo as células de contaminantes e substâncias inibidoras, ao mesmo tempo que favorece o consumo de substrato e melhora a estabilidade (NEDOVIC *et al.*, 2010). Os polímeros naturais são originários de fontes renováveis tais como alga, plantas, estirpes microbianas selecionadas, sendo considerados mais economicamente rentáveis do que os polímeros sintéticos (COVIELLO *et al.*, 2007). Os mais usados para imobilização são os compostos de alginatos, celulose, carragenina, ágar, ácido péctico e quitosana (MORENO-GARCIA *et al.*, 2018).

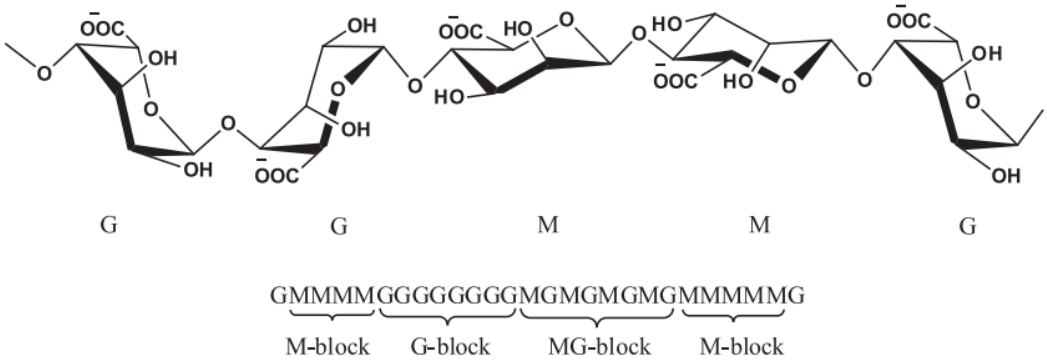
Um dos polímeros mais utilizados para a aplicação de imobilização celular é o alginato, pois a sua geleificação ocorre em condições brandas utilizando reagentes biocompatíveis à temperatura ambiente. Além disso, permite a difusão de moléculas metabólicas através dos poros do hidrogel (SIMÓ *et al.*, 2017). Esse polissacarídeo pode ser extraído de algas marinhas marrons (Figura 6) ou produzidas por bactérias, como *Azotobacter vinelandii* e várias espécies de *Pseudomonas* (GENISHEVA, TEIXEIRA e OLIVEIRA, 2014; DE VOS *et al.*, 2014).

Figura 6 – Algas marrons

Fonte: http://www.biologia.seed.pr.gov.br

Alginato é um heteropolissacarídeo linear formado pela ligação da cadeia ácido 1,4 β-D-manurônico (M) e o ácido α-L-gulurônico (G) em diferente composição e sequência (Figura 7). A concentração do grupo M e G irá depender da fonte da alga utilizada para a extração do alginato (DE VOS *et al.*, 2014).

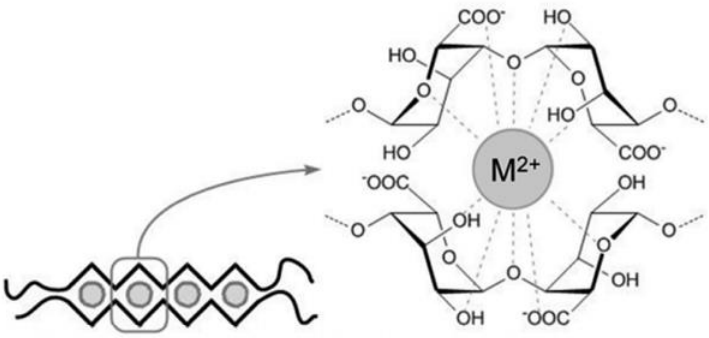
Figura 7 – Estrutura do alginato



Fonte: DE VOS *et al.*, 2014

Em presença de cátion bivalente em solução aquosa, o alginato de sódio forma géis. O gel ocorre pela ligação iônica cruzada do grupo carboxílico carregado negativamente do alginato com íons metálicos bivalentes, como Ca^{2+} e Ba^{2+} (GULREZ, AL-ASSAF, & PHILLIPS, 2011). A ligação de quatro grupos G originários de duas diferentes cadeias à um cátion é descrito como “modelo caixa de ovo” (SIMÓ *et al.*, 2017) (Figura 8).

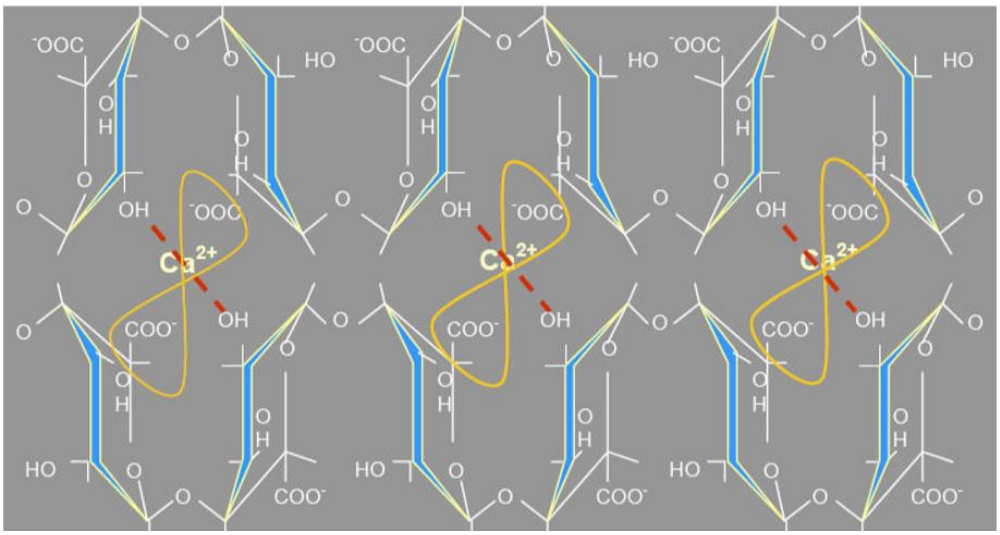
Figura 8 – Interação entre os monômeros G do alginato e o cátion bivalente no "modelo caixa de ovo"



Fonte: PISTONE *et al.* (2015)

A distribuição e as proporções dos monômeros M e G ao longo da cadeia de alginato determinam as propriedades mecânicas, de intumescimento e difusão do hidrogel. Alginato com alto teor de gulurônico forma géis mais rígidos, enquanto o polissacarídeo formado com maior concentração de manurônico tende a formar géis mais flexíveis (DE VOS *et al.*, 2014, SIMÓ *et al.*, 2017). Essa diferença das características do gel de acordo com a concentração dos monômeros pode ser explicado pela alta afinidade do ácido gulurônico com íons bivalentes (DE VOS *et al.*, 2014). A afinidade dos monômeros do alginato por diferentes íons bivalentes segue a ordem: Pb^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} (MORCH *et al.*, 2006). Géis mais estáveis podem ser formados com íons Ba^{2+}, Pb^{2+}, Sr^{2+} ou Cu^{2+}, pois apresentam maior afinidade com o grupo carboxílico do alginato, porém, apresentam um potencial efeito tóxico (SIMÓ *et al.*, 2017). Na formação do gel com íons de Ca^{2+} (Figura 9), ocorre a ligação iônica cruzada dos polímeros devido à troca dos íons de sódio por cátions bivalentes de cálcio.

Figura 9 – Formação de gel de alginato de cálcio



Fonte: SANTANA, CORDEIRO e RIBEIRO, 2008

Apesar da frequente utilização do alginato para processo de imobilização, esse polissacarídeo apresenta algumas desvantagens. A presença de agentes quelantes, como citrato, fosfato e lactato, ou cátions anti gelificantes, são capazes de causar a desestabilidade mecânica ou até mesmo a liquefação do gel (CHING, BANSAL, e BHANDARI, 2015). Além disso, o crescimento celular, que também gera o acúmulo de gás, afeta as propriedades mecânicas das cápsulas (YU, ZHANG, e TAN, 2007).

3.4.2. Alterações Sensoriais

Cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais apreciadas no mundo, no qual possui uma complexidade de aromas e sabores resultantes das etapas de sua produção. Porém, grande parte dos compostos que contribuem para a caracterização e equilíbrio sensorial da bebida, advém da fermentação, sendo gerados como substâncias intermediárias de reações metabólicas ou subprodutos da levedura (PIRES *et al.*, 2014), sendo tão ou mais importante do que a eficiência da fermentação e o seu rendimento (DJORDJEVIĆ, 2017).

De acordo com Pires *et al.* (2014), dentre os compostos gerados pelas leveduras no processo fermentativo da cerveja, os álcoois superiores, os ésteres e as dicetonas vicinais são os principais elementos que determinam a qualidade final da bebida. A concentração destes subprodutos está diretamente ligada a

escolha da levedura, fatores nutricionais e as condições ambientais da fermentação (BUGLASS, 2010).

Apesar dos benefícios gerados com a imobilização celular em fermentações alcoólicas, esta técnica pode alterar a morfologia da levedura, seu crescimento e fisiologia em relação a célula livre influenciando na formação de *bioflavors* durante a fermentação (NEDOVIC *et al.*, 2015), capaz de causar desequilíbrio ao sabor do produto dificultando na permanência do caráter tradicional. Além dessas possíveis alterações a célula, a matriz sólida de imobilização pode interferir no perfil do sabor (DJORDJEVIC *et al.*, 2016).

A técnica de imobilização pode reduzir a atividade de determinadas enzimas e o conteúdo de ATP em relação a células livres, no qual essas alterações fisiológicas modificam a atividade metabólica, fazendo com que a concentração dos principais compostos aromáticos seja alterada quando comparadas à fermentações com células livres (NEDOVIC *et al.*, 2015).

Fermentações com leveduras imobilizadas podem causar a diminuição ou aumento da concentração de álcoois superiores quando comparada com leveduras livres (DJORDJEVIC et. al., 2016), maior produção de ésteres (PEREIRA et. al., 2014; DJORDJEVIC *et al.*, 2015; NAYDENOVA *et al.*, 2013 ; ALMONACID *et al.*, 2012), alterações da concentração de aldeído (NAYDENOVA *et al.*, 2013, NEYDENOVA *et al.*, 2014; DJORDJEVIC *et al.*, 2015), maior produção de compostos voláteis (PEREIRA *et al.*, 2014; ALMONACID *et al.*, 2012), porém, de compostos indesejáveis também (PEREIRA *et al.*, 2014).

O aumento da concentração de éster pode ser atribuído ao processo de imobilização celular por induzir a limitação de transferência de massa do oxigênio, diminuindo o crescimento celular, assim ocorre uma inibição da biossíntese de ácidos graxos, resultando no acúmulo de acetil-CoA, que junto com altos níveis de etanol no sistema imobilizado, contribui na formação de ésteres (SHEN *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2014). Justo oposto ao observado por Nedovic *et al.* (2015), o aumento da aeração ou oxigenação resulta em baixas concentrações de ésteres.

A limitação do crescimento celular causado pela barreira de imobilização, também pode causar alterações na produção de álcoois superiores. A diminuição da concentração destes compostos está ligada a baixa

remoção de nitrogênio utilizados para reação anabólica de formação de aminoácidos, consequentemente causando baixos níveis de álcoois superiores (NEDOVIC *et al.*, 2003; WALKER & STEWART, 2016; PIRES *et al.*, 2014). De acordo com DJORDJEVIC *et al.* (2016), a limitação de transferência de massa de aminoácidos também pode causar a diminuição da síntese de álcoois superiores.

O processo de maturação ou fermentação secundária tem como principal objetivo a redução de sub compostos, principalmente o diacetil, mas também compostos sulfonados e outros voláteis a baixa temperatura (NEDOVIC *et al.*, 2015).

O composto diacetil é considerado um composto indesejado em termos de sabor, pois atribui características amanteigadas a bebida (PIRES *et al.*, 2014; SHIBAMOTO, 2014), sendo formado pelo processo de descarboxilação oxidativa extracelular de 2-acetolactato e posteriormente reduzido pelas leveduras a acetoina e 2,3-butanodiol, processo no qual é iniciado no final da fermentação primária e continua ao longo da maturação (KROGERUS & GIBSON, 2013; NEDOVIC *et al.*, 2015).

Durante a etapa da fermentação secundária, a redução do composto diacetil ocorre rapidamente com leveduras imobilizadas, porém, a oxidação de 2-acetolactato, composto excretado pela levedura na produção de valina e leucina durante metabolismo, para a formação de diacetil (reação não enzimática) é muito lenta (NEDOVIC *et al.*, 2015), podendo ser justificada pela limitação da transferência de oxigênio na barreira de imobilização.

Assim como o gosto, a técnica de imobilização pode causar mudanças ao odor da bebida, tendo em vista que importantes compostos voláteis que influenciam a cerveja sensorialmente são alterados. Ao realizar análise de determinação dos valores de atividade de odor (OAVs) em fermentação de duas diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* livre e imobilizada em alginato e alginato/quitosana na produção de hidromel, Pereira *et al.* (2014) observaram que as fermentações com leveduras imobilizadas eram mais aromáticas, além disso, compostos indesejados como acetato de etila, ácido octanóico e ácido hexanóico também apresentaram maiores concentrações. Caso semelhante também pode ser visto em estudo de Almonacid *et al.* (2012), que ao analisarem a concentração de compostos orgânicos voláteis, foram detectados por meio de

GC/MS seis compostos (acetato de hexila, ácido caprilíco, acetato de octila, nanoato de etila, hexanoato de etila e cariofileno) a mais nas amostras de fermentação com leveduras imobilizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMONACID, S.F., NÁJERA, YOUNG, S.F., SIMPSON, R.J., ACEVEDO, C. A. *A comparative study of stout beer batch fermentation using free and microencapsulated yeasts*. Food Bioprocess Technol, vol. 5, p.750-758, novembro/2010

AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHIMIDELL, W., LIMA, U.A. Biotecnologia Industrial na produção de alimentos – Volume 4. 1º Edição. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ldta, 2001

AZHAR, S.H.M.; ABDULLA, R.; JAMBO, J.A.; MARBAWI,, H.; GANSAU, J.A.; FAIK, A.A.M.; RODRIGUES, K.F. *Yeasts in sustainable bioethanol production: A review*. Biochemistry and Biophysics Reports, v.10, p.52–61, mar/2017

BERGEY, D. H.; HOLT, J. G.; BERGEY, D. H. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9º edição. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000

BITTNER, M.; JARQUE S.; HILSCHEROVÁ, K. *Polymer-immobilized ready-to-use recombinant yeast assays for the detection of endocrine disruptive compounds*. Chemosphere, v.132, p. 56-62, ago/2015

BLEVE, G.; TUFARIELLO, M.; VETRANO, C.; MITA, G.; GRIECO, F. *Simultaneous Alcoholic and Malolactic Fermentations by Saccharomyces cerevisiae and Oenococcus oeni Cells Co-immobilized in Alginate Beads*. Frontiers in Microbiology, v.7, n.943. Jun/2016

BOULTON, R.B.; SINGLETON, V.L.; BISSON, L.F.; KUNKEE, R.E. Principles and Practices of Winemaking. 1º edição. Nova Iorque: Editora Chapman & Hall, 1999

BRUICE, P. Y. Química orgânica – Volume 2. 4ª edição. São Paulo: Pearson/Prentice Hall, 2006

BUGLASS, A.J. Alcoholic fermentation. *In*: EBLINGER, H.M. Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects. Freiberg: Wiley, 2010, p. 72–95

CERVBRASIL. Anuário 2016. Acesso em: out/2018. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuario/>

CHING, S. H., BANSAL, N., & BHANDARI, B. *Alginate gel particles-a review of production techniques and physical properties.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.57, n.6, p.1133-1152, Abr/2017

CONONICO, L.; COMITINI, F.; ORO, L.; CIANI, M. *Sequential Fermentation with Selected Immobilized Non-Saccharomyces Yeast for Reduction of Ethanol Content in Wine*. Frontiers in Microbiology, v.7, n.278, Mar/2016

COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCi, C.; ALHAIQUE; C. *Polysaccharide hydrogels for modified release formulations*. Journal of Controlled Release, v.119, p. 5-24, maio/2007

COVIZZI, L.G.; GIESE, E.C.; GOMES, E.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, R. *Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas*. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 28, n.2, p. 143-160, dez/ 2007

DE VOS, P.; LAZARJANI, H.A.; PONCELET, D.; FAAS, M.M. *Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective*. Advanced Drug Delivery Reviews. v.67, p. 15–34, nov/2014

DJORDJEVIC, R.; GIBSON, I.I.; VUNDUK, K.J.; NIKICEVIC, N.; NEDOVICK, V. *Raspberry wine fermentation with suspended and immobilized yeast cells of two strains of Saccharomyces cerevisiae*. Wiley Online Library, v.32, p.271–279, jan/2015

DJORDJEVIĆ, V., WILLAERT, R., GIBSON, B., NEDOVIĆ, V. *Immobilized Yeast Cells and Secondary Metabolites*. Fungal Metabolites*,* p. 599–638, jul/2016

DJORDJEVIĆ, V.; WILLAERT, R.; GIBSON, B.; NEDOVIĆ, V. *Immobilized Yeast Cells and Secondary Metabolites.* Fungal Metabolites, p.599–638, 2017

DRAGONE, G., MUSSATTO, S.I., SILVA, J.B.A. *Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade*. Ciênc. Tecnol. Aliment., v.27, p.37-40, ago/2007

DUARTE, J.C.; RODRIGUES, J.A.R.; MORAN, P.J.S.; VALENÇA, G.P.; NUNHEZ, J.R. *Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation*. AMB Express, v.3, mai/2013

ES, I.; VIEIRA, J.D.G.; AMARAL, A.C. *Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application*. Appl Microbiol Biotechnol, v.99(5), p.2065-2082, Jan/2015

FOGLER, H. S. Elementos de engenharia das reações químicas. 4º edição. Rio de Janeiro: LTC, 2012

GALANAKIS, C. M.; KORDULIS, C.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A.; BEKATOROU, A.; LYCOURGHIOTIS, A. *Effect of pressure and temperature on alcoholic fermentation by Saccharomyces cerevisiae immobilized on c-alumina pellets*. Bioresource Technology, v. 114, p. 492-498, mar/2012

GALASSI, G. R. Estudo do processo fermentativo contínuo para produção de etanol utilizando células auto-imobilizadas em reatores tipo torre. 2007. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas

GANATSIOS, V.; KOUTINAS, A.A.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; NIGAM, P. *Promotion os maltose fermentation at extremely low temperatures using a cryotolerant Saccharomyces cerevisiae strain immobilized on porous cellulosic material*. Enzyme and Microbial Technology, v. 66, p.56-59, nov/2014

GENISHEVA, Z., MUSSATTO, S., OLIVEIRA, J. M., TEIXEIRA, J. A. *Evaluating the potential of winemaking residues and corncobs as support materials for cell immobilization for ethanol production*. Industrial Crops and Products, v. 34, p. 979-985, jul/2011

GENISHEVA, Z.; TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, J.M. *Immobilized cell systems for batch and continuous winemaking.* Trends in Food Science & Technology. v. 40, p.33-47, jul/2014

GUISAN, J.M. Immobilization of enzymes and cells. 2º edição. Totowa: Humana Press, 2006

GULREZ, S. K. H., AL-ASSAF, S., PHILLIPS, G. O. *Hydrogels: Methods of preparation, characterisation and applications*. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering, v.51, p.117–150, ago/2011

HOUGH, J. S. Sweet wort production. In: HOUGH, J. S. The biotechnology of malting and brewing. Cambridge: Cambridge University Press, 1991, p.54-72

KIM, K.H.; CHOI, I.S.; KIM, H.M.; WI, S.G.; BAE, H.J. *Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga* Chlorella vulgaris *by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation*. Bioresource Technology, v.153, p. 47-54, Fev/2014

KOSSEVA, M.R*. Immobilization of Microbial Cells in Food Fermentation Processes.* Food Bioprocess Technol, v.4, p.1089–1118, ago/2011

KOURKOUTAS, Y., BEKATOROU, A., BANAT, I.M, MARCHANT, R., KOUTINAS, A.A. *Immobilizations Technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review*. Food Microbiology, v.21, p.377-397, ago/2004

KROGERUS, K.; GIBSON, B. R. *125thAnniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation*. Journal of the Institute of Brewing, v.119, p.86-97, ago/2013

KWAKITA L.H., QUEIROZ, M. O. Produção de cerveja artesanal em uma cidade do interior de Mato Grosso do Sul: um estudo de caso para implementação em Paranaíba-MS. In: I Simpósio Sul-Mato-Grossense de Administração, 2017, Mato Grosso do Sul. *Anais*... Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2017

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. *In:* LIMA, U. A. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. Biotecnologia Industrial- Volume 3. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, p. 1-43

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G.M. *Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da "serra gaúcha" (RS)*. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 24, n.3, p. 453-458, set/2004

MARCUSSO, E.F.; MÜLLER, C. V. A cerveja no brasil: O ministério da agriculta informando e esclarecendo. Ministério da Agricultura, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pastapublicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf.>. Acessado em: agosto/2018

MARGARITIS, A., MERCHANT, F.J.A., ABBOT, B. J. *Advances in Ethanol Production using Immobilized Cell Systems*. Journal Critical Review in Biotechnology, v.1, p.339-393, set/2008

MORCH, Y.A.; DONATI, I.; STRAND, B.L., SKJAK BRAEK, G., *Effect of Ca2+, Ba2+, and Sr2+ on alginate microbeads*. Biomacromolecules, v.7, p.1471–1480, mai/2006

MORENO-GARCIA,J.; GARCIA-MARTINEZ, T.; MAURÍCIO, J.C.; MORENO, J. *Yeast Immobilization Systems for Alcoholic Wine Fermentations: Actual Trends and Future Perspectives*. Frontiers in Microbiology, v.9, n.241, Fev/2018

NAVRÁTIL, M.; DÖMERY, Z.; STURDIK, E.; SMIGROVICOVÁ, D.; GEMEINER, P. *Production of non-alcoholic beer using free and immobilized cells of Saccharomyces cerevisiae deficient in the tricarboxylic acid cycle*. Biotechnol. Appl. Biochem, v.35, p.133–140, abr/2002

NAYDENOVA, V.; BADOVA, M.; VASSILEV, S.; ILIEV, V.; KANEVA, M.; KOSTOV, G. *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, jul/2014

NAYDENOVA, V.; VASSILEV, S.; KANEVA, M.; KOSTOV, G. *Encapsulation of brewing yeast in alginate/chitosan matrix: comparative study of beer fermentation with immobilized and free cells*. Bulgarian Journal of Agricultural Science, v. 19, n.2, p. 123-127, out/2013

NEDOVIC, V. A., MANOJLOVIC, V., BUGARSKI, B., AND WILLAERT, R. State of the art in immobilized/encapsulated cell technology in fermentation processes. *In:* NEDOVIC, V. A.; ZUIDAM, N. J. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Londres: Springer), 2010, p.119–146

NEDOVIĆ, V., GIBSON, B., MANTZOURIDOU, T. F., BUGARSKI B., DJORDJEVIĆ, V., KALUŠEVIĆ A., PARASKEVOPOULOU, A., SANDELL, M., ŠMOGROVIČOVÁ, D., YILMAZTEKI, M.; *Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes*. Yeast, vol. 32, p. 173–216, set/2015

NEDOVIC, V.A.; DURIEUXB, A.; VAN NEDERVELDE, L.; ROSSEELS, P.; VAN DEGANS, J.; PAISANT, A.; SIMON, J. *Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and* Leuconostoc oenos *cells*. Enzyme Microb Technol., v.26(9-10), p.834-839, Jun/ 2000

NELSON, D. L; COX, M. M.. Lehninger: Principles of Biochemistry. 3º edição. Nova Iorque: Worth Publishers, 2002

NEVES, N.A.; PANTOJA, L.A.; SANTOS, A.S. *Thermovinification of grapes from the Cabernet Sauvignon and Pinot Noir varieties using immobilized yeasts*. Eur Food Res Technol., v.238, p.79–84, jan/2014

NIKOLAOU, A.; GALANIS, A.; KANELLAKI, M.; TASSOU, C.; DEMERTZI, K.A.; KOURKOUTAS, Y. *Assessment of free and immobilized kefir culture in simultaneous alcoholic and malolactic cider fermentations*. LWT - Food Science and Technology, v.76, p.67-78, mar/2017

NORTON, S.; D'AMORE, T. *Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing*. Enzyme Microb. Technol., v.16, p.365–375, mai/1994

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. Fundamentos de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. São Paulo: Manole, 2006

OLIVEIRA, M.E.S.; PANTOJA L.; DUARTE, W.F.; COLLELA, C.F.; VALARELLI, L.T.; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R. *Fruit wine produced from cagaita (Eugenia dysenterica DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation*. Food Research International, v.44, p. 2391–2400, ago/2011

ORTIZ, S.; BORK, J.A.; HENRIQUE, R.O.; FUROGO JR, A. Evaluation of Sodium Alginate Concentration in Cell Immobilization of Saccharomyces cerevisiae with Magnetic Nanoparticles. *In*: Congresso Brasileiro de Microbiologia, n.28, 2015, Florianópolis – SC. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015

PEREIRA, A.P.; MENDES-FERREIRA, A.; OLIVEIRA, J.M.; ESTEVINHO, L.M.; MENDES-FAIA, A. *Effect of Saccharomyces cerevisiae cells immobilisation on mead production*. LWT - Food Science and Technology. v.56, p.21-30, abr/2014

PIRES, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; BRANYIK, T.; VICENTE, A.A. *Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast*. Microbiol Biotechnol, vol. 98, p.1937–1949, jan/2014

PISTONE, S., QORAGLLU, D., SMISTAD, G., & HIORTH, M. *Formulation and preparation of stable cross-linked alginate-zinc nanoparticles in the presence of a monovalent salt*. Soft Matter, v.11, n.28, p.5765–5774, mai/2015

REBELLO, F.F.P., *Produção de cerveja: Revisão*. Revista Agrogeoambiental, n.3, dez/2009.

SANTANA, L.N.S.; CORDEIRO, P. T.; RIBEIRO, E. J. Estudo cinético da produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de sódio. *In:* Congresso Brasileiro de Agrobioenergia e Simpósio Internacional de Biocombustível, 2008, Uberlândia

SCHOINA, V.; TERPOU, A.; IOANNA, G.A.; KOUTINAS, A.; KANELLAKI, M.; BOSNEA, L. *Use of* Pistacia terebinthus *resin as immobilization support for* Lactobacillus case*i cells and application in selected dairy products*. J Food Sci Technol., v.52, n.9, p. 5700–5708, Set/2015

SHEN, H.Y.; MOONJAI, N.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R. *Impact of Attachment Immobilization on Yeast Physiology and Fermentation Performance.* Journal of the American Society of Brewing Chemists, v.61(2), p.79–87, fev/2018

SHIBAMOTO, T. *Diacetyl: Occurrence, Analysis, and Toxicity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.62(18), p.4048–4053, abr/2014

SIMÓ, G.; FERNÁNDEZ, E.F.; CRESPO, J.V.; RUIRÉPEZ, V.; NOGALES, J.M.R. *Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation*. Carbohydrate Polymers, v. 170, p.1–14, abr/2017

SROKA, P.; SATORA, P.; TARKO, T.; DUDA-CHODAK, A. *The influence of yeast immobilization on selected parameters of young meads*. J. Inst. Brew., v.123 (2), p.289-295, nov/2017

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas

STREHAIANO, P.; RAMON-PORTUGAL, F.; TAILLANDIER, P. Yeasts as biocatalysts. *In:* QUEROL, A.; FLEET, G.H. Yeast in food and beverages. Berlim: Springer, 2006, p. 243-283

TAN, L.; SUN, Z. Y.; OKAMOTO, S.; TAKAKI, M.; TANG, Y.Q.; MORIMURA, S.; KIDA, K. *Production of ethanol from raw juice and thick juice of sugar beet by continuous ethanol fermentation with flocculating yeast strain KF-7*. Biomass and Bioenergy, v.81, p. 265-272, out/2015

TANG, P.D.P.; LE, V.V.M. *Fermentation performance of free and immobilized yeast on cork (Sonneratia caseolaris) root – application of immobilized yeast to repeated batch ethanol fermentation*. International Food Research Journal, v. 20, n.4, p.1813-1817, jan/2013

TASKIN, M.; UCAR, M.H.; UNVER, Y.; KARA, A.A.; OZDEMIR, M.; ORTUCU, S. *Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast* Rhodotorula glutinis *HL25*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. v.8, p. 97-103, out/2016

TORRESI, S., FRANGIPANE, M. T., & ANELLI, G. *Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: a review*. Food Chemistry, v.129, p.1232-1241, dez/2011

VALENTE JUNIOR, A.S.; ALVES, F.C. Bebidas alcoólicas: Cerveja. Banco do Nordeste. Disponível em: <

https://www.bnb.gov.br/documents/80223/1138347/2_cerveja.pdf/6f5fc80c-fc23-2da8-5b7b-97e3302c6554>. Acesso em: agosto/2018

VENTURINI, W.G. Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia. 2º Edição. São Paulo: Blucher, 2016

WALKER, G.; STEWART, G. *Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages.* Beverages, v.2(4), nov/2016

XUE, C.; WANG, Z.X.; DU, G.Q.; FAN, L.H.; MU, Y.; REN, J.G.; BAI, F.W. *Integration of ethanol removal using carbon nanotube (CNT)-mixed membrane and ethanol fermentation by self-flocculating yeast for antifouling ethanol recovery.* Process Biochemistry. v. 51, p. 1140-1146, Set/2016

YU, J., ZHANG, X., & TAN, T. An novel immobilization method of Saccharomyces cerevisiae to sorghum bagasse for ethanol production. Journal of Biotechnology, v.129, n.3, p.415–420, fev/2007

ARTIGO

Capacidade fermentativa da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio para produção de cerveja

RESUMO

Dentre as etapas de produção cervejeira, a fermentação é uma fase de extrema importância, pois nela ocorre a formação do álcool e gás carbônico, principais produtos da cerveja, o álcool e gás carbônico, além de compostos, desejados ou não, responsáveis pelas características sensoriais da bebida. O uso de leveduras imobilizadas surge como alternativa para reduzir o tempo de processo, devido à alta concentração de biomassa nas cápsulas, como também facilitar o armazenamento e o reuso das leveduras. Nesse âmbito, o presente trabalho visou avaliar o processo de fermentação de uma cerveja puro malte em um sistema descontínuo utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em uma matriz porosa de alginato de cálcio. Para avaliar o comportamento da fermentação e sua eficácia foi analisado a produção de álcool, o consumo de substrato, o crescimento celular e a viabilidade do microrganismo ao longo do processo, como também as características sensoriais do produto. O estudo indicou uma similaridade entre os perfis cinéticos da fermentação em volume de 20ml e de 20L, no qual apresentaram um rendimento de 85,7% e 83,9%, respectivamente. Os biocatalizadores foram reutilizados em 4 fermentações descontínuas, apresentando ao final da última fermentação, rendimento de 87,79%. A avaliação sensorial, demonstrou a existência de uma diferença significativa entre as amostras com leveduras livres e imobilizadas.

Palavras-chaves: Fermentação, Cerveja, Imobilização, *Saccharomyces cerevisiae*, Alginato

Fermentative capacity of Saccharomyces cerevisiae immobilized in calcium alginate for beer production

ABSTRACT

Among the stages of beer production, fermentation is an extremely important phase, because it occurs the formation of the main products of beer, alcohol and carbon dioxide, besides generating compounds, desired or not, responsible for sensorial characterizing the beverage. The immobilization technique has been widely used in various industrial, pharmaceutical, cosmetic and food segments. This technique appears as an alternative to reduce the process time due to the high concentration of biomass in the capsules, as well as to facilitate the storage and reuse of yeast. In this context, the present work aimed to evaluate the fermentation process of a pure malt beer in a discontinuous system using Saccharomyces cerevisiae yeasts immobilized in a porous matrix of calcium alginate. To evaluate the fermentation behavior and its effectiveness, the alcohol production, the substrate consumption, the cell growth and the viability of the microorganism along the process were analyzed, as well as the sensory characteristics of the final product. The study indicated a similarity between the 20ml and 20L volume fermentation kinetic profiles, in which they presented a yield of 85.7% and 83.9%, respectively. The biocatalysts were reused in 4 discontinuous fermentations, with 87.79% yield at the end of the last fermentation. The sensory evaluation demonstrated the existence of a significant difference between the samples with free and immobilized yeast.

Key-words: Fermentation, Beer, Immobilization, *Saccharomyces cerevisiae*, Alginate

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, “Cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro”. Essa bebida alcoólica fermentada é considerada uma das mais populares em todo o mundo, com uma diversidade de sabores e diferentes estilos.

A cerveja pode ser classificada em dois grandes grupos: tipo *Ale* e *Lager.* As cervejas *Ale* são fermentadas em temperaturas que variam de 18°C a 22°C, durante 3 a 5 dias, sendo consideradas de alta fermentação (VENTURINI, 2005). Enquanto as cervejas *Lager* são formuladas em um processo de fermentação que pode durar de 4 a 12 semanas junto a etapa de maturação, ocorrendo em temperaturas mais baixas que as cervejas *ale*. Os estilos de cerveja *lager,* geralmente, apresentam um corpo mais leve e isso pode ser atribuído a menor temperatura de processamento (REBELLO, 2009). Por suas características mais suaves, cervejas *lager* são as mais produzidas no Brasil, sendo adequadas ao nosso clima, enquanto as cervejas *ale* possuem teor alcoólico superior a 5% com maior concentração de lúpulo, porém, apresentam-se mais adocicadas (OETTERER, REGITANO-D’ARCE, APOTO, 2006).

Dados referentes a 2016, mostram que a cadeia produtiva ao qual o setor cervejeiro está inserido foi responsável por 1,6% do PIB e 14% da indústria de transformação no Brasil, com uma produção de 14 bilhões de litro por ano (CervBrasil, 2016).

A competitividade neste setor vem impulsionando as indústrias na busca de tecnologias que reduzam custos e proporcionem diferenciais de qualidade à cerveja produzida (REBELLO, 2009). De acordo com Kwakita e Queiroz (2017), a produção de cerveja é relativamente simples, porém, alguns parâmetros como temperatura, tempo e a variação da quantidade da matéria-prima utilizada, é capaz de gerar uma diversidade da bebida com características sensoriais únicas.

Nesse processo, a fermentação, ponto importante para a produção da bebida, inicia-se com a adição do fermento ao mosto cervejeiro. A quantidade do fermento inoculado irá variar de acordo com o teor de extrato, composição, nível

de aeração e temperatura do mosto. Esta quantidade de fermento deve proporcionar uma concentração de 5 a 15 milhões de células de levedura por mililitro de mosto (AQUARONI, 2001).

O sistema de imobilização de leveduras tem sido utilizado, na produção de cerveja, em sistemas contínuos de fermentação. Esta tecnologia tem como principal vantagem para o setor o aumento da rentabilidade (ALMINACID et al., 2010).

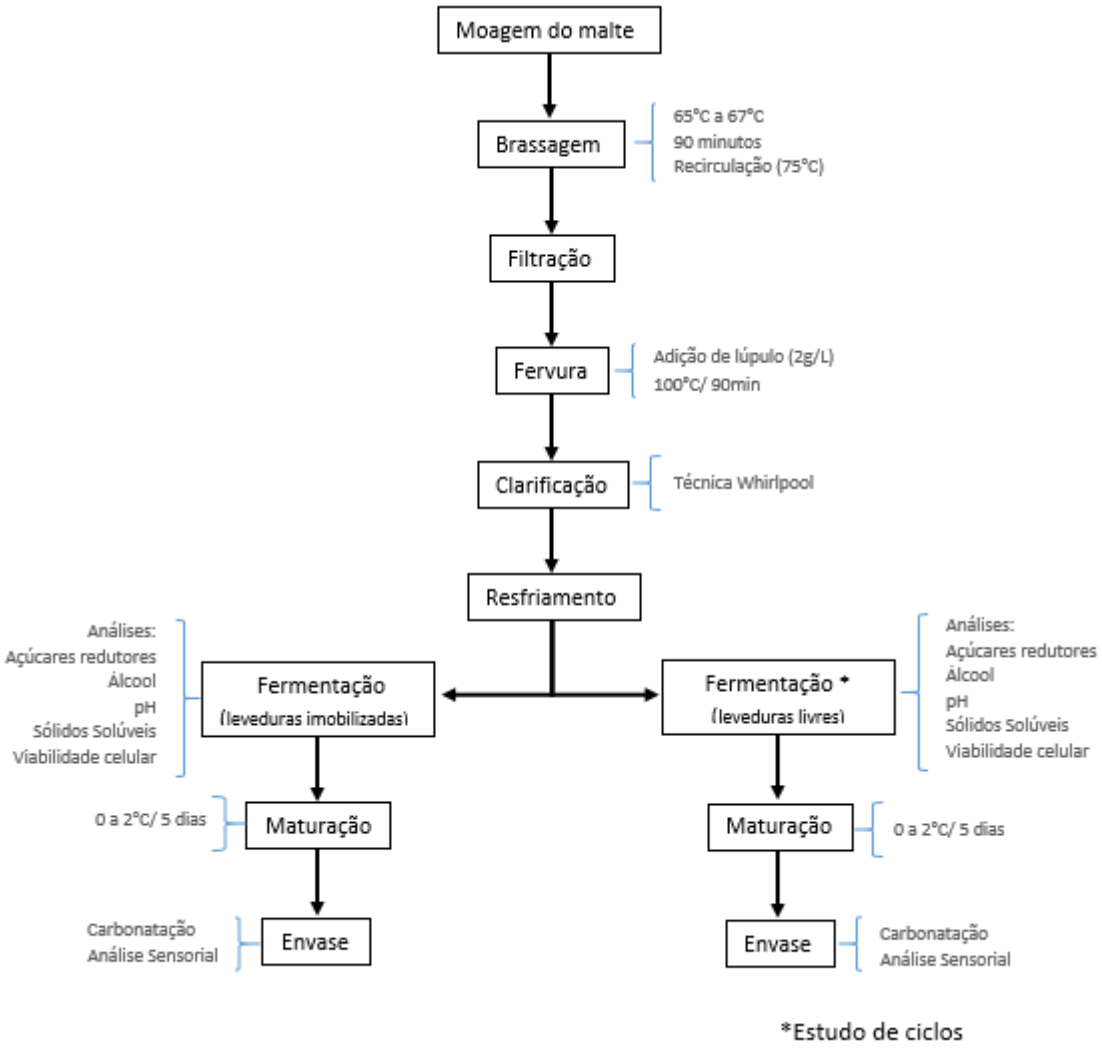
Além disso, o processo de imobilização promove aumento da densidade celular, elevando e mantendo certos metabólitos, como os aromáticos, melhora o controle e estabilidade a longo prazo das células, permite a regeneração e reutilização do biocatalizador, e protege as células contra forças de cisalhamento, uma vez que existe um material de suporte adicional para fornecer proteção. Essa técnica permite que as células sejam utilizadas de forma repetida e contínua, mantendo a alta densidade celular ao longo do processo, proporcionando a redução de seu custo (MORENO-GARCIA *et al.*, 2018; ES, VIEIRA, AMARAL, 2015). Sendo assim, o presente projeto teve como objetivo o estudo da eficácia da fermentação descontínua de uma cerveja *ale* utilizando leveduras imobilizadas em alginato de cálcio, avaliando importantes parâmetros para a compreensão do processo, a viabilidade da célula encapsulada para a reutilização do microrganismo em diferentes ciclos e o comportamento da fermentação em ampliação de escala.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os insumos cervejeiros foram adquiridas em comércio local especializados em produtos para cervejarias. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química (Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

A cerveja tipo Ale foi obtida segundo o fluxograma de produção (Figura 1), em ensaios com volume de 20mL, 10L e 20L.

Figura 1 – Fluxograma do processo



Fonte: a autora, 2019

2.1. PRODUÇÃO DO MOSTO

O processo de produção do mosto cervejeiro contou com as etapas moagem do grão até a clarificação do mosto para a fermentação.

2.1.1. Moagem do malte

O malte *pilsen* (250g/L) foi moído a seco em um moedor de grãos (Araceba) de forma a obter uma granulometria capaz de preservar parcialmente a casca do grão expondo o seu endosperma (Figura 2). A integridade da casca permite a sua utilização como agente filtrante na trasfega para a etapa de fervura.

Figura 2 – Malte moído

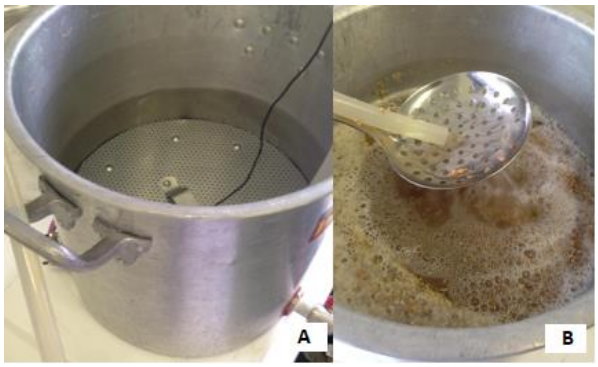
Fonte: a autora, 2019

2.1.2. Mosturação

Os grãos moídos foram colocados em um tanque de alumínio com um fundo falso filtrante (Figura 3A) contendo água mineral a 72°C ($V_{água}$: V_{Mosto} = 0,8). Para que o processo obtenha uma ótima eficiência, permitindo a hidrólise do amido para a formação de açúcares fermentescíveis e geração de produtos secundários, a temperatura foi controlada manualmente durante 90 minutos entre 65 a 67°C, e aumentada ao final do processo para 75°C, finalizando a atividade enzimática.

Em seguida, torta de malte gerada após a filtração foi lavada com água mineral ($V_{água}$: V_{Mosto} = 0,9) a 75°C para um maior aproveitamento do açúcar formado (Figura 3B).

Figura 3 – Tanque de brassagem com fundo falso(A) Recirculação sobre torta de malte filtrada (B)



Fonte: A autora, 2019

2.1.3. Fervura

Submeteu-se o caldo a etapa de fervura a 100°C, por 90 minutos. Ao atingir a temperatura, foi adicionado o lúpulo *Traditition* (Barth-Haas Group, Nurnberg, Alemanha) com alfa-ácido de 5,20% em uma concentração de $2g.L^{-1}$.

Com o término da etapa de fervura, o mosto foi clarificado e ao atingir 20°C foi transferido para tanques de fermentação devidamente sanitizados, evitando a passagem do *trub* (material mucilaginoso) gerado durante o processo de mosturação.

2.2. PRÉ INÓCULO E IMOBILIZAÇÃO CELULAR

O preparo do inóculo para a fermentação ocorreu com a adição de 0,575g/L (aproximadamente $3x10^8$ cel/ml) de levedura liofilizada (Lesaffre, Marcqe-Baroeul, França), de acordo com o especificado pelo fabricante.

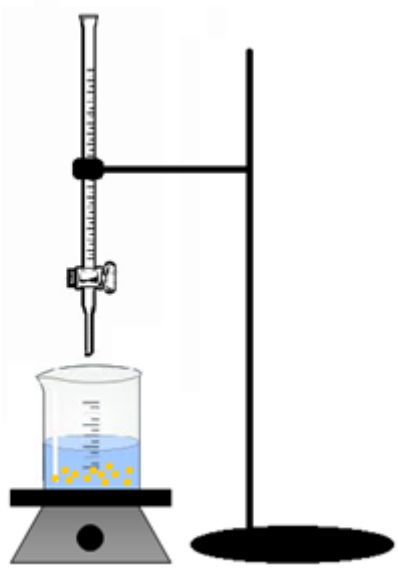
Para as fermentações com leveduras livres, separou-se em um *erlenmeyer* 10% (v/v) do volume do mosto a ser fermentado com temperatura de 20°C, adicionando-se a levedura liofilizada e mantendo durante 30 minutos sob agitação (150rpm) em uma incubadora (Quimis, São Paulo, Brasil). O inóculo preparado permaneceu durante 24 horas à temperatura de 19 ± 0,5°C antes de ser adicionado ao mosto da fermentação.

O preparo do inóculo para fermentações com leveduras imobilizadas ocorreu com a adição da levedura liofilizada em 7,5% (v/v) do mosto fermentativo a temperatura de 20°C, previamente separado em um *erlenmeyer*, também mantendo durante 30 minutos sob agitação (150rpm) em uma incubadora (Quimis, São Paulo, Brasil). Após o preparo do inóculo, foi realizada a técnica de imobilização celular, usando como referência a metodologia proposta por Santos & Maugeri (2007).

O gel de alginato de sódio foi preparado solubilizando o alginato (1,5%(p/v)) em água potável a 80°C. Após o preparo do gel, adicionou-se o inóculo (75% (v/v)) previamente preparado. O sistema foi mantido sob agitação lenta para garantir uma boa homogeneização do gel com o inóculo contendo a levedura. As esferas foram formadas por gotejamento do gel de alginato, com o auxílio de uma bureta (25mL), em solução de cloreto de cálcio (Dinâmica, São Paulo, Brasil) a 0,2 M sob agitação magnética (Quimis, São Paulo, Brasil) (Figura 4). Após o preparo, as esferas foram mantidas em temperatura de 19 ± 0,5°C

imersas no mosto fermentativo durante 72 horas antes de serem adicionadas ao mosto da fermentação. Após a produção das esferas contendo leveduras, foram retiradas dez esferas como amostras representativas para a determinação do diâmetro médio delas, medidas por um paquímetro.

Figura 4 –Esquema para produção de esferas alginato de cálcio



Fonte: autora, 2019

A eficiência da imobilização foi mensurada usando como parâmetro a viabilidade celular antes ($Viab_i$) e após ($Viab_F$) a imobilização (Equação 1).

$$Ef = \frac{Viab_F}{Viab_i} x100\% \qquad \text{(Equação 1)}$$

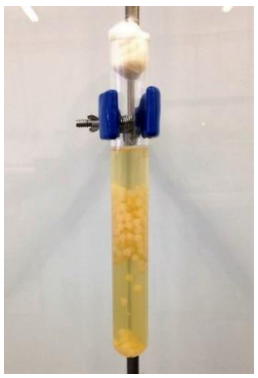
2.3. FERMENTAÇÃO

O estudo da capacidade fermentativa foi conduzido em duas etapas. Na primeira etapa denominado de fermentação em escala primária, com volume total de 20mL, ocorreu em tubos de ensaio de 30mL (Figura 5), sendo transferido para o seu interior o mosto fermentativo e as esferas de leveduras imobilizadas, ocupando dois terços do volume total. Cada tubo de ensaio utilizado no estudo, um total de 60, representou uma amostra. Os tubos foram tampados com algodão hidrofóbico para que houvesse a saída de gás carbônico. Na segunda etapa foi realizado o estudo dos ciclos fermentativos com tanques de 10L e de reprodutibilidade e análise sensorial em fermentações de 20L. Em ambos os dois

diferentes volumes de fermentação, o processo foi realizado em tanques (baldes) de polipropileno. Para liberação do CO_2 foi acoplado aos tanques válvula de *airlock* na tampa de vedação. O volume de mosto com as leveduras imobilizadas ou leveduras livres correspondeu a cerca de dois terços do volume total de cada tanque.

As fermentações ocorreram a temperatura entre 19 ± 0,5°C no interior de um refrigerador (Marca Consul) acoplado a um controlador de temperatura (Modelo STC-1000). A fermentação primária foi encerrada ao atingir valores constantes de sólidos solúveis. A maturação ocorreu durante 5 dias, submetendo a bebida a uma temperatura de 0 a 2°C.

Figura 5 – Reator para fermentação de 20ml



Fonte: A autora, 2019

2.4. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.4.1. Viabilidade Celular

A análise de viabilidade celular foi determinada pela contagem de células vivas e células mortas (Equação 2). Para a contagem utilizou-se 0,5 ml de esferas de imobilização, mensurada por deslocamento de coluna em uma proveta contendo água, no qual foram degradadas submetendo-as a agitação em mesa agitadora (Quimis, São Paulo, Brasil) com 10 ml de citrato de sódio 2% (p/v) (Quimibrás, Rio de Janeiro, Brasil) durante 15 minutos a 200rpm, adaptando a metodologia proposta por Almonacid *et al.* (2012). Com o auxílio da câmara de Neubauer, por meio de microscopia ótica, as leveduras foram contadas utilizando como reagente de coloração uma solução de azul de metileno 0,02% (p/v).

$$Viabilidade\ celular(\%) = \frac{células\ vivas\ x\ 100}{células\ totais}$$ (Equação 2)

2.4.2. Sólidos solúveis, pH e etanol

Para a determinação de sólidos solúveis (°brix) foi utilizado o refratômetro de bancada (Astral Científica, Paraná, Brasil), e para o pH, um pHmetro de bancada (MS Tecnopon, São Paulo, Brasil), método proposto pela Associação de Químicos Agrícolas Oficiais (AOAC). A determinação da formação de álcool nas fermentações em volume de 20mL e 10L ocorreram por meio dos dados obtidos da análise dos sólidos solúveis, utilizando-se o *software* computacional Brewer's Friend (https://cervejariafaller.com.br/calculadora/), no qual apresentou a concentração de álcool mediante ao valor da análise de refratometria. Para a determinação de etanol nas fermentações em volume de 20L foi utilizado o ebuliômetro.

2.4.3. Concentração de substrato

Os açúcares redutores foram quantificados por espectrofotometria, utilizando como reagente de redução o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), a glicose (Neon, São Paulo, Brasil) como açúcar padrão, e o comprimento de onda de 540nm, segundo método proposto por Miller (1959). Para a determinação utilizou-se espectrofotômetro (Astral Científica, Paraná, Brasil) e cubetas de vidro.

2.4.4. Análise da absorção de glicose por esferas de alginato de cálcio

Esse estudo permite determinar o momento inicial da fermentação, acreditando-se que a redução da concentração de açúcar no começo da reação deve-se a difusão.

A análise para avaliar absorção de glicose por esferas de alginato seguiu a metodologia descrita por Nogueira *et al.* (2009) com algumas modificações, tendo como premissa a avaliação da diminuição da concentração de glicose ao longo do tempo causada pela absorção por esferas de alginato de cálcio contendo leveduras inativas.

A inativação da levedura ocorreu por tratamento térmico de acordo com a metodologia proposta por Al-Rub *et al.* (2004), no qual as esferas foram submetidas a um aquecimento a 80°C, durante uma hora, em banho-maria.

Após a inativação, as esferas foram adicionadas em um *erlenmeyer* de 500mL contendo 250mL de solução de glicose (100g/L), coletando-se amostras de 5mL ao longo de 1 hora, em intervalos regulares de 10 minutos para a avaliação do teor de glicose. Em seguida, as amostras foram filtradas com filtros de 0,22µm para serem submetidas a análise cromatográfica.

A determinação da concentração do açúcar foi realizada no laboratório de cromatografia do Departamento de Engenharia Química na Universidade Federal de Pernambuco (DEQ/UFPE), utilizando cromatógrafo de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo HP1047A Refractive Index, coluna C18 Phenomenex Luna (250mm x 4,60mm x 5µm), fase móvel H_2O deionizada com H_2SO_4 (0,5mM), com vazão de 0,9ml/min.

2.4.5. Análise Sensorial

Para realização da análise sensorial o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Pernambuco (UPE/PROPEGE), número de processo 14154419.9.0000.5207. Data de aprovação: 06/08/2019.

A metodologia utilizada para a realização da análise sensorial foi o teste triangular, um método sensorial discriminativo (BENTO, ANDRADE & SILVA, 2019), no qual os provadores avaliaram as amostras de cerveja *Ale* com leveduras livres e imobilizadas a fim de reconhecer alguma diferença entre elas, para que ao final da análise fosse possível detectar a existência ou não de diferença sensorial significativa entre as duas amostras.

As cervejas produzidas com leveduras livre e imobilizadas utilizadas nesta análise tiveram a mesmo método de preparo, sendo envasadas em garrafas âmbar com volume de 330ml, por um sistema de gaseificação forçada, no qual um cilindro de CO_2 foi acoplado a um tanque de inox contendo a bebida.

O recrutamento e realização ocorreu no Departamento de Ciência do Consumo da UFRPE, no Laboratório de Análise sensorial com cabines individuais próprias para análise sensorial, tendo como população estudantes, funcionários da universidade e integrantes da comunidade acadêmica, indivíduos caracterizados como consumidores comuns, sem experiência ou

treinamento prévio de degustação de cerveja. O recrutamento ocorreu com abordagem direta, intervendo o provador de forma oral horas antes das refeições principais e para recrutar a quantidade de provadores necessário, foram espalhados cartazes nas proximidades do departamento, como também um anúncio no perfil da rede social da universidade. Participaram ao todo 100 degustadores.

Primeiramente, realizou-se uma triagem dentre os possíveis provadores por meio de questionário (APÊNDICE 1). Em seguida, os degustadores aprovados receberam um termo de consentimento livre e esclarecido para que pudesse prosseguir a análise.

Ao degustador, foram entregues três amostras (30ml) codificadas com números aleatórios de três dígitos em um copo plástico branco de polipropileno, um formulário de resposta (APÊNDICE 2), água mineral a temperatura ambiente para o enxágue das papilas e bolacha de água e sal.

As respostas obtidas foram avaliadas afim de determinar a existência ou não de uma diferença significativa entre as amostras, considerando-se um nível de significância de 5%, tendo como base para avaliação a tabela presente no ANEXO 1.

2.5. ESTUDO CINÉTICO

Os cálculos realizados para avaliar o perfil cinético da fermentação levaram em consideração as fases exponencial e estacionária, desconsiderando a etapa de latência e morte celular.

Para o estudo cinético da fermentação foi analisada toda a evolução da concentração de substrato e produto ao longo do tempo. Dentre a grande variedade de produtos formados, foi considerado o etanol, por seu valor econômico e sensorial, além de representar uma grande parte da parcela de produtos gerados.

Ao envolver atividade microbiana em uma reação, o seu mecanismo de ação e sua avaliação se torna mais complexo, pois existe uma dependência de certos fatores, como influências externas (pH e temperatura). Sendo assim, os componentes principais de uma fermentação devem ser analisados individualmente, estabelecendo uma relação entre eles ao longo do tempo.

Na determinação dos fatores de conversão, no qual são relacionadas as concentrações dos componentes da fermentação, foi considerado todo o tempo da reação, sendo calculado a partir da Equação 3 (HISS, 2001), o fator de conversão de substrato em produto.

$$\Upsilon_{P/S} = \frac{P - P_o}{S_o - S} \qquad \text{(Equação 3)}$$

O cálculo da produtividade do produto da fermentação (P_P), levou em consideração a concentração final e inicial do etanol (P, P_o) e o tempo final de fermentação em relação a formação de produto (t_{fP}), como é apresentado na Equação 4.

$$P_P = \frac{P - P_o}{t_{fP}} \qquad \text{(Equação 4)}$$

O rendimento da fermentação (R) foi considerado o fator de conversão do substrato em produto ($\Upsilon_{P/S}$) e o fator de conversão máximo teórico ($\Upsilon_{P/S}$*), segundo a Equação 5.

$$R(\%) = \frac{\Upsilon_{P/S}}{\Upsilon_{P/S}{}^{*}} \,.\, 100 \qquad \text{(Equação 5)}$$

Seguindo a reação de fermentação alcóolica (Equação 6) e levando em consideração a massa molar de etanol sendo 46 g/mol e da glicose como 180 g/mol, a determinação do fator de conversão máximo teórico ($\Upsilon_{P/S}$*), foi igual a 0,511 como mostrado na Equação 7.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \qquad \text{(Equação 6)}$$

$$\Upsilon_{P/S}{}^{*} = \frac{2\ x\ massa\ molar\ do\ etanol}{massa\ molar\ da\ glicose} = \frac{2\ x\ 46}{180} = 0{,}511 \qquad \text{(Equação 7)}$$

Ou seja, a cada 1g de glicose consumida, é gerado 0,511g de etanol.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

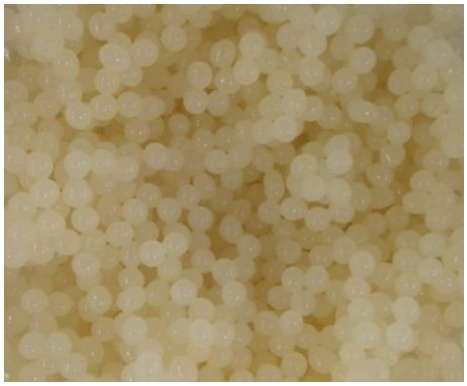
3.1. IMOBILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM ALGINATO DE CÁLCIO

As esferas de imobilização da levedura apresentaram um formato praticamente uniforme (Figura 6) com diâmetro médio de 3,63 mm ± 0,24. Em

estudo realizado por Mishra *et al.* (2016), ao avaliar a produção de etanol com *S. cerevisiae* imobilizadas em diferentes tamanhos (menor ≈ 3,0 mm; médio ≈ 4,0 mm; grande ≈ 5,0 mm), percebeu-se um rendimento maior em esferas com tamanho médio em comparação as outras, chegando a apresentar um ótimo rendimento até o 25° ciclo de produção.

Segundo Mishra *et al.* (2016), tamanhos menores de esferas não são adequadas para a reutilização das leveduras durante muitos ciclos, pois existe uma maior frequência de descarga de cálcio causada pela facilidade de transferência de massa em relação a esferas de outros tamanhos, além disso, elas não suportam durante muito tempo a pressão causada pelo CO_2 produzido ao longo da fermentação. Esferas com diâmetro maior possuem maior resistência para serem reutilizadas durante muitos ciclos, porém, por apresentar uma baixa taxa de transferência de massa e uma menor área de superfície (volume unitário), o seu rendimento acaba sendo menor e demorando mais tempo para a transformação de substrato em produto.

Figura 6 – Esferas de imobilização celular



Fonte: a autora, 2018

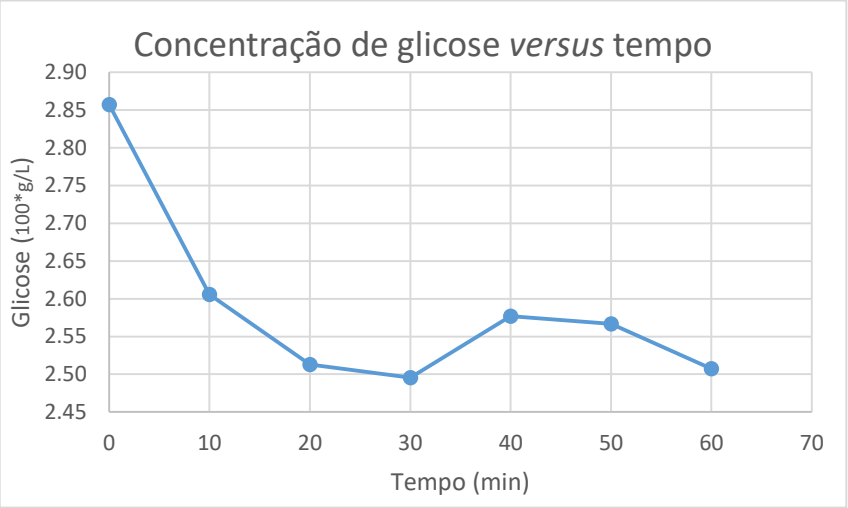
A técnica de imobilização submete a levedura a uma situação de estresse, tirando-a de seu estado natural, reduzindo seu espaço, podendo acarretar na morte de células (PAJIC-LIJAKOVIC *et al.*, 2017), entretanto não impede reações metabólicas fundamentais (crescimento e produção de compostos secundários, etanol e gás carbônico durante a fermentação). Antes do processo de imobilização, as leveduras apresentaram viabilidade celular de 80,94% ± 0,01, após a imobilização, esse valor passou para 71,27% ± 0,03. Ao analisar a eficiência do processo de imobilização, tem-se que 88,05% da viabilidade foi mantida após a técnica de imobilização (Equação 1). Apesar da

diminuição, a viabilidade celular foi maior do que 70%, possibilitando a continuidade do projeto.

3.2. ABSORÇÃO DE GLICOSE POR ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

O efeito difusional é um importante parâmetro, que precisa ser analisado ao encapsular biocatalisadores. A barreira porosa gerada entre o meio fermentativo e o microrganismo altera a passagem de compostos tanto internamente como externamente e consequentemente influencia no comportamento da fermentação.

Figura 7 – Concentração de glicose ao longo do tempo em meio com esferas de alginato



Fonte: autora, 2019

Nota-se que existe um decaimento acentuado da concentração de glicose apenas nos primeiros 20 minutos do processo (Figura 7).

Baseando-se em estudo de Al-Rub *et al* (2004) e Jiang *et al* (2007), foi realizado um estudo cinético de absorção de glicose pelas esferas de alginato testando-se um modelo de pseudo 2ª ordem (Equação 8)

$$\frac{dq}{dt} = k_{ab}.(q_e - q)^2 \qquad \text{Equação 8}$$

No qual,

$$q = (C_O - C_F).\frac{V_L}{m} \qquad \text{Equação 9}$$

Tem-se que k_{ab} é a constante de velocidade (g_{esf}/g_{glic}.min), q_e é a quantidade de glicose adsorvida no equilíbrio (g_{glic}/g_{esf}), q é quantidade de glicose adsorvida (g_{glic}/g_{esf}), C_O é a concentração inicial de glicose no mosto (g/L), C_F é a concentração de glicose no mosto (g/L), V_L é o volume do mosto (L) e m é a massa total de esfera (g).

Após a integração e linearização da Equação 8, gerou-se a seguinte Equação 10

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_{ab} \cdot q_e^2} + \frac{1}{q_e} . t \qquad \text{Equação 10}$$

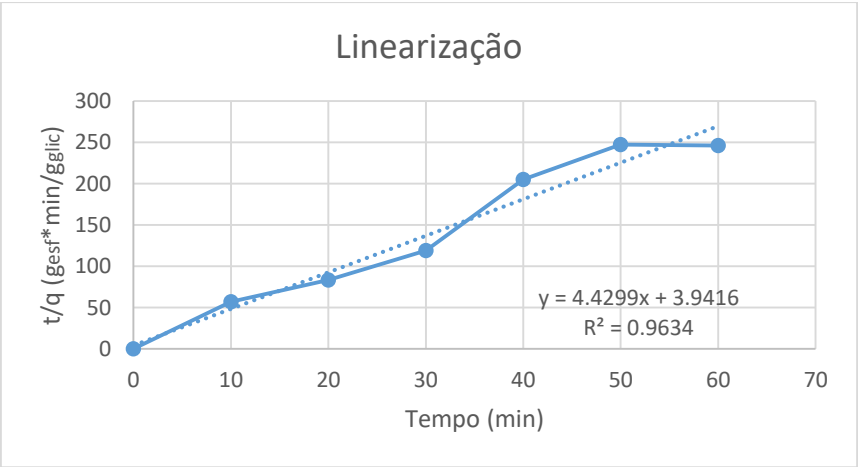
Com a quantidade de açúcar adsorvido e o valor de t/q em cada ponto (Tabela 1) foi possível gerar um gráfico (Figura 8).

Tabela 1 – Dados gerados para o gráfico t/q *versus* tempo

t (min)	q(g_{glic}/g_{esf})	t/q
0	0	0
10	0,175	57,14
20	0,240	83,36
30	0,252	119,02
40	0,195	204,93
50	0,202	247,17
60	0,244	246,25

Fonte: autora, 2019

Figura 8 - Linearização do modelo de pseudo 2º ordem para absorção de glicose em esferas de alginato de cálcio



Fonte: autora, 2019

O gráfico se ajusta a uma reta, mostrando que o fenômeno de absorção da glicose por esferas de alginato de cálcio é representado por cinética de pseudo 2ª ordem (Figura 8).

A equação gerada da linearização do gráfico de absorção foi a seguinte,

$$y = 4{,}4299.x + 3{,}9416$$

Sendo assim, tem-se que o valor de q_e é 0,226 g_{glic}/g_{esf}, ou seja, é absorvido 0,226g de glicose por grama de esfera presente no mosto e uma constante de velocidade de absorção de 4,967 $g_{esf}/(g_{glic}.min)$.

Esses dados são de grande importância para a projeção de reatores e ampliação de escala para processos que envolvam a utilização de biocatalisadores imobilizados em processos fermentativos, pois determinam a massa de substrato absorvida pela esfera de imobilização e consequentemente consumida pelo microrganismo, como também a velocidade em que ocorre tal absorção (PRADELLA, 2001).

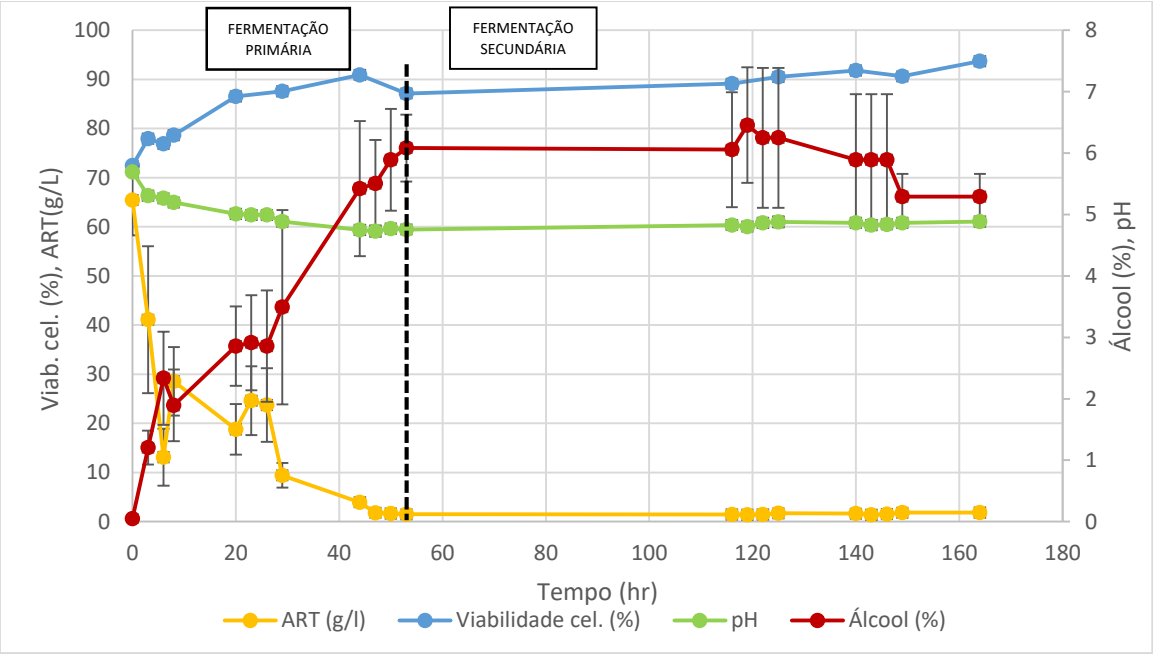
3.3. FERMENTAÇÃO

A prática de inoculação prévia implica na adaptação do microrganismo ao nutriente, causando praticamente a eliminação da fase *lag,* permitindo que a fase tumultuosa ocorra no início, para que o processo seja conduzido de forma mais uniforme (HISS, 2001). Com a inoculação prévia, foi gerada a adaptação do microrganismo ao meio de fermentação possibilitando a sintetização de enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio e aumento da densidade celular. Prática semelhante foi adotada por Behera e Ray (2014), para produzirem etanol a partir de açúcar hidrolisado da farinha de mandioca com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio. As esferas de imobilização foram imersas em meio de fermentação durante 24 horas para que fosse obtido uma alta densidade celular, iniciando o processo fermentativo na fase exponencial e atingindo valores máximos da produção de etanol em 96 horas.

3.3.1. Estudo preliminar da fermentação com leveduras imobilizadas

Considerada como etapa inicial, realizou-se a avaliação da fermentação em volume de 20mL para determinar a real eficácia do processo de produção de cerveja com leveduras imobilizadas com resultados apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Perfil fermentativo em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio em função do tempo (volume de 20ml)



Fonte: autora, 2019

Observa-se que logo nas primeiras horas iniciais ocorre um decaimento expressivo da concentração de substrato, passando de 65 g/L para 13 g/L em 3 horas, e o aumento da produção de álcool, ao gerar 2g/L no mesmo tempo (Figura 9). Nesta etapa, ocorre o consumo de substrato e produção de álcool mais expressivo, em que a concentração de nutrientes é superior às necessidades do microrganismo (LIMA, 2001).

Após 53 horas de processo (Figura 9), ao ser observado que não mais existia o consumo do substrato e a produção de etanol, a fermentação primária foi finalizada apresentando um crescimento de aproximadamente 20% da viabilidade celular. De acordo com Lima (2001), a estabilidade do processo

fermentativo após a fase estacionária pode ser justificada por possível esgotamento de nutrientes e/ou acúmulos de metabólitos tóxicos.

O consumo total de substrato ocorre aproximadamente com 53 horas de reação (Figura 9), obtendo uma produção máxima de álcool em 6,08°GL, tendo assim um coeficiente de conversão de substrato em produto de 0,438. Dessa forma, a eficiência foi de 85,7% com uma produtividade de 0,904 $g.L^{-1}.h^{-1}$.

No início da fermentação primária ocorreu uma diminuição do valor do pH, passando de 5,69 para 4,7 em 30 horas de fermentação. Segundo Walker & Stewart (2016), a redução do valor do pH pode estar relacionada a uma combinação de fatores como a liberação de prótons H^+ com o transporte de nutrientes ao interior da célula (ação causada pela enzima ATPase presente na membrana plasmática da célula), produção direta de ácidos orgânicos, responsáveis por atribuir características sensoriais à cerveja, remoção de agentes tamponantes e a formação e dissolução de CO_2.

A redução do pH ocorre apenas no início da fermentação, mantendo-se praticamente estável ao longo do processo, variando entre 5 e 4,7 (Figura 9), aproximadamente, valores favoráveis para fermentação alcoólica, no qual é indicado entre 4,5 e 6,5 (WALKER & STEWART, 2016). De acordo com Pires (2014), a justificativa para isso é a utilização dos ácidos orgânicos produzidos pela levedura para a produção de ésteres em uma reação de condensação química enzimática, juntamente com álcool.

Do início da fermentação primária (0hr) até 20 horas do processo, houve um crescimento da viabilidade, ocorrendo um aumento de 71% para cerca de 86,5%, passando, logo em seguida, a assumir valores praticamente constantes (Figura 9).

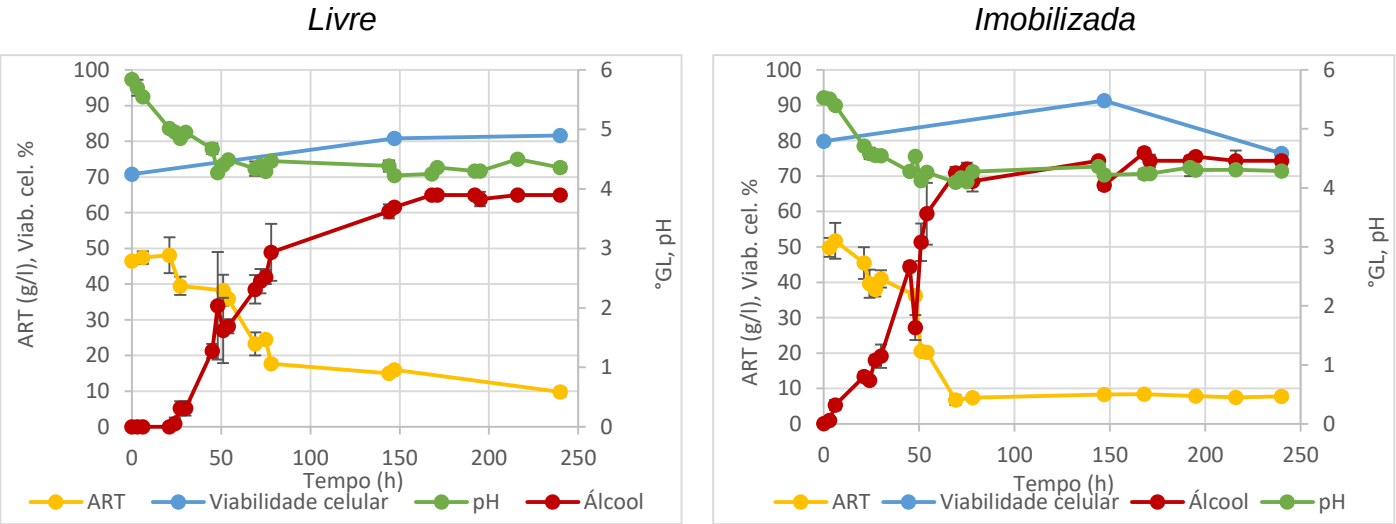
Os resultados apresentados ao final desta etapa inicial demonstraram valores satisfatórios de eficiência e produtividade, como também, um perfil fermentativo em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular correntes a uma fermentação alcoólica. Com isso, iniciou-se a segunda etapa, realizando um estudo comparativo da fermentação entre *Saccharomyces cerevisiae* livre e imobilizada em volume de 10 litros, avaliando o comportamento do processo fermentativo com a reutilização dos biocatalizadores.

3.3.2. Estudo da reutilização (ciclos) das leveduras em fermentação

A reutilização de biocatalizadores em fermentação é uma prática comum em cervejarias industriais, pois diminui o custo e pode acelerar o processo sem que altere o produto, caso seja realizado de forma adequada. Com isso, esta etapa do estudo foi realizada para a avaliação da reutilização das leveduras, além de analisar o perfil fermentativo com o aumento do volume no reator.

A Fermentação 1 com leveduras imobilizadas apresentou um tempo mais curto, 69 horas a menos em relação a fermentação de leveduras livres (Figura 10), para que houvesse a estabilidade da produção de etanol e consumo de substrato, gerando uma produtividade maior do que a fermentação com leveduras livres (Tabela 2).

Figura 10 – Perfil fermentativo da Fermentação 1 em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio (volume de 10L)



Fonte: autora, 2019

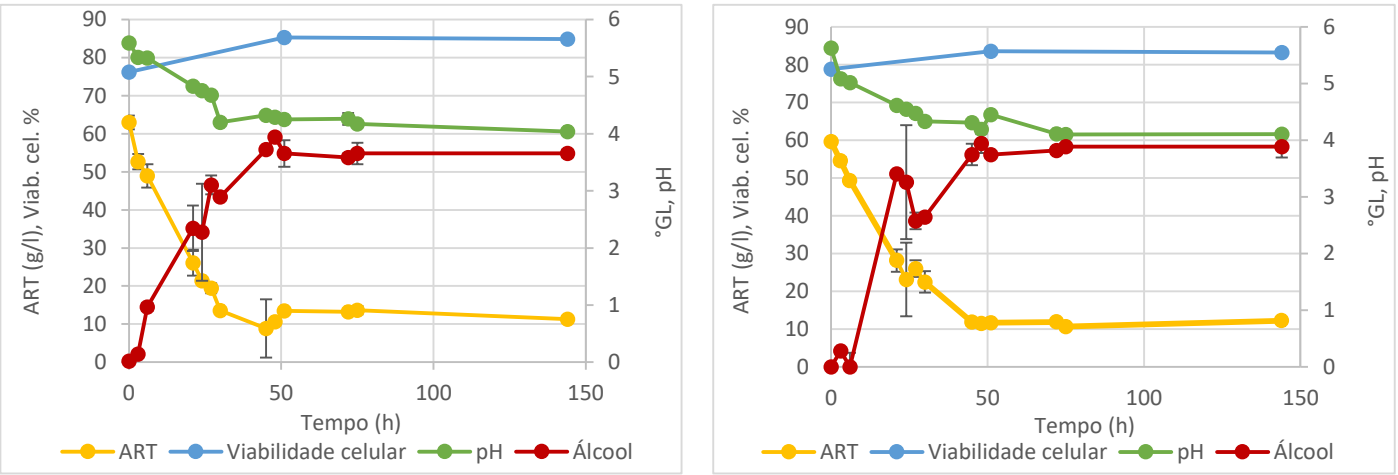
Uma possível causa para isto é a manutenção das leveduras imobilizadas no mosto para que houvesse crescimento do microrganismo, gerando o aumento da densidade celular no interior das esferas de imobilização. As leveduras imobilizadas foram mantidas durante 72 horas no mosto antes da fermentação, enquanto as leveduras livres mantiveram-se em 24 horas.

O decaimento da viabilidade no final da fermentação das leveduras imobilizadas pode também ser justificado pelo maior tempo de atividade da levedura (Figura 10).

Prosseguindo com a reutilização dos biocatalisadores, realizou-se as três fermentações seguidas obtendo-se resultados apresentados nas Figuras 11, 12 e 13.

Figura 11 - Perfil fermentativo da Fermentação 2 em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio (volume de 10L)

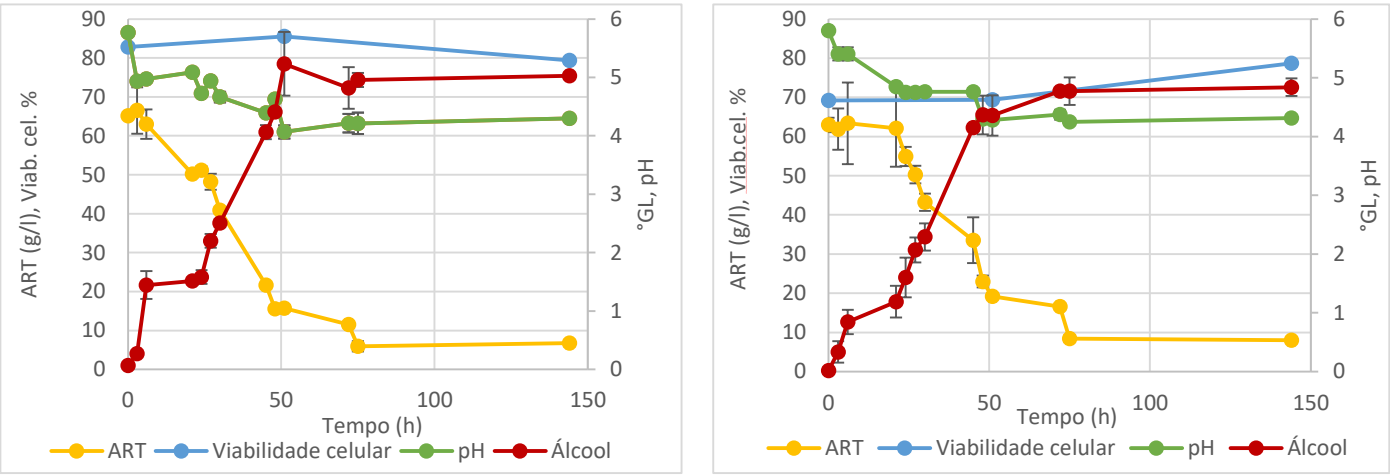
Livre *Imobilizada*



Fonte: autora, 2019

Figura 12 - Perfil fermentativo da Fermentação 3 em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio (volume de 10L)

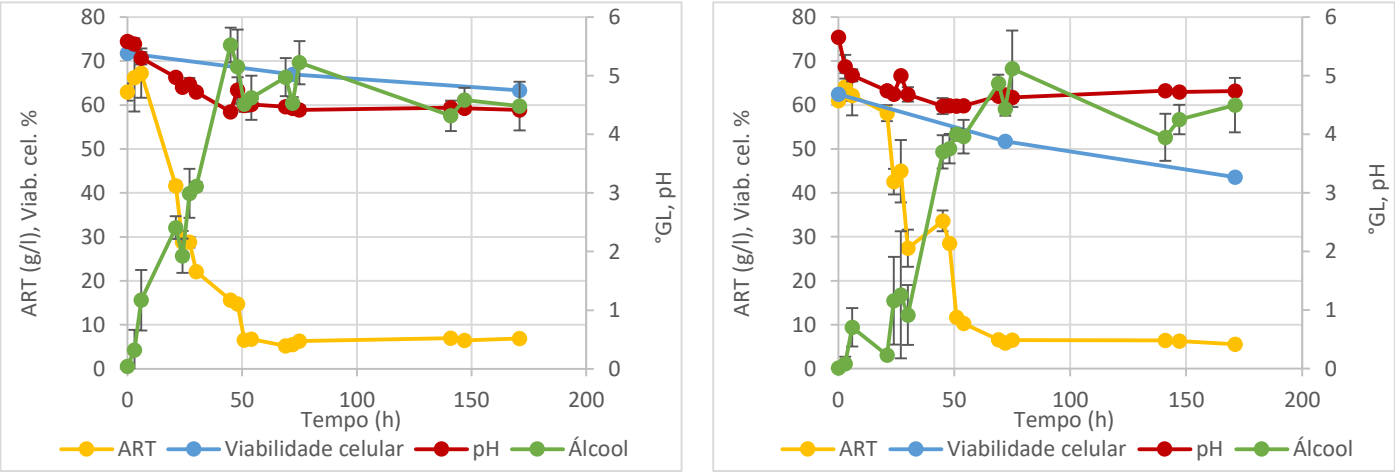
Livre *Imobilizada*



Fonte: autora, 2019

Figura 13 - Perfil fermentativo da Fermentação 4 em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio (volume de 10L)

Livre *Imobilizada*



Fonte: autora, 2019

Observa-se que após as Fermentações 2, 3 e 4 o tempo de reação foi bem menor, passando a atingir a produção máxima de etanol e o consumo máximo de substrato entre 50 e 70 horas (Figuras 11, 12 e 13). Mesmo

comportamento foi observado em estudo realizado por Duarte *et al.* (2013), para produção de etanol a partir da fermentação de glicose e sacarose com leveduras imobilizadas, no qual notaram um rápido consumo de substrato e produção de etanol já nas primeiras horas de reação na terceira fermentação em diante, algo que não foi notado na primeira fermentação.

No trabalho realizado por Petelkov *et al.* (2016), na qual foi elaborado um estudo cinético da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em matriz de alginato e quitosana, as células imobilizadas iniciaram a fermentação mais lentamente que as células livres, porém, conduziram o processo fermentativo ao mesmo tempo, indicando uma maior velocidade de reação, havendo uma redução de 24 horas, apresentando uma maior taxa de acúmulo de etanol. O retardo para o início do processo pelas leveduras imobilizadas pode ser explicado pela limitação da difusão de substrato a célula, causado pela barreira de Ca-alginato (VERBELEN *et al.*, 2006).

Observa-se uma similaridade no consumo de substrato e formação de álcool nas fermentações ocorridas com leveduras livre e imobilizadas (Figuras 11, 12 e 13), resultado similar ao encontrado por Naydenova *et al.* (2013). Essa similaridade também pode ser observada na eficiência do processo, produtividade e no fator de conversão de substrato em produto (Tabela 2) nas duas distintas condições das leveduras, no qual apresentaram valores muito próximos.

Tabela 2 – Taxa de produção de etanol (PP), conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e Rendimento de processo (R%) nas Fermentações 1, 2, 3 e 4

		PP (g/L.h)	***$Y_{P/S}$***	***R (%)***
Fermentação 1	**Livre**	0.202	0.431	84.382
	Imob.	0.454	0.433	84.712
Fermentação 2	**Livre**	0.564	0.434	84.981
	Imob.	0.579	0.438	85.754
Fermentação 3	**Livre**	0.527	0.431	84.421
	Imob.	0.522	0.436	85.290
Fermentação 4	**Livre**	0.568	0.439	85.953
	Imob.	0.556	0.449	87.791

Fonte: autora, 2019

Esperava-se que não houvesse um decaimento da produtividade nas primeiras fermentações reutilizando leveduras, porém, justificado pela diminuição da viabilidade celular no início da Fermentação 3 (Figura 12), é possível observar o declínio na conversão de substrato em produto, causada pela baixa concentração de células viáveis responsáveis pela produção de etanol.

Observa-se a diminuição da viabilidade celular das leveduras imobilizadas na Fermentação 4, passando a ser no final do processo aproximadamente 44% (Figura 13). Dentre os possíveis fatores que tenham levado a essa diminuição, a deterioração da estrutura das esferas pode ser considerada como uma causa. Ao final da Fermentação 4 foram observadas deformidades na estrutura de algumas esferas de imobilização (Figura 14).

Figura 14 – Alterações presentes na estrutura das esferas de imobilização celular ao final da Fermentação 4

Fonte: autora, 2019

O enfraquecimento das esferas que tenham levado a sua ruptura pode ser causado pela interação mecânica e eletrostática entre a célula e a matriz de Ca-alginato, formação de CO_2 pelas leveduras e interação química da matriz com componentes presentes no meio de fermentação, que podem ser íons não gelificantes e compostos quelantes como fosfato (PAJIC-LIJAKOVIC *et al.,* 2015), tendo em vista que o fosfato, com teor entre 3 a 5% do peso seco celular (WALKER & STEWART, 2016), é um importante nutriente inorgânico do metabolismo celular para a biossíntese de ácidos nucleicos, fosfolipídios e ATP.

A interação eletrostática entre parte da cadeia de alginato da matriz e a membrana celular da levedura pode causar o enfraquecimento das esferas de imobilização, causada pela repulsão entre elas, já que a membrana da célula

possui um potencial elétrico negativo, assim como a matriz de Ca-alginato (YOU *et al.*, 2001; RAFIEE *et al.*, 2014).

Em estudo realizado por Pajic-Lijakovic *et al.* (2015), no qual analisou as alterações da estrutura de esferas de imobilização celular com Ca-alginato ao longo do tempo, conclui-se que no tempo inicial o enfraquecimento da estrutura foi causado pela interação eletrostática entre a matriz e a célula, nos dois primeiros dias a maior influência foi a interação química dos compostos presentes no meio, do segundo ao quarto dia a rigidez permaneceu constante, passando a aumentar do quarto dia até o último (sexto dia) causado pelo rápido crescimento celular.

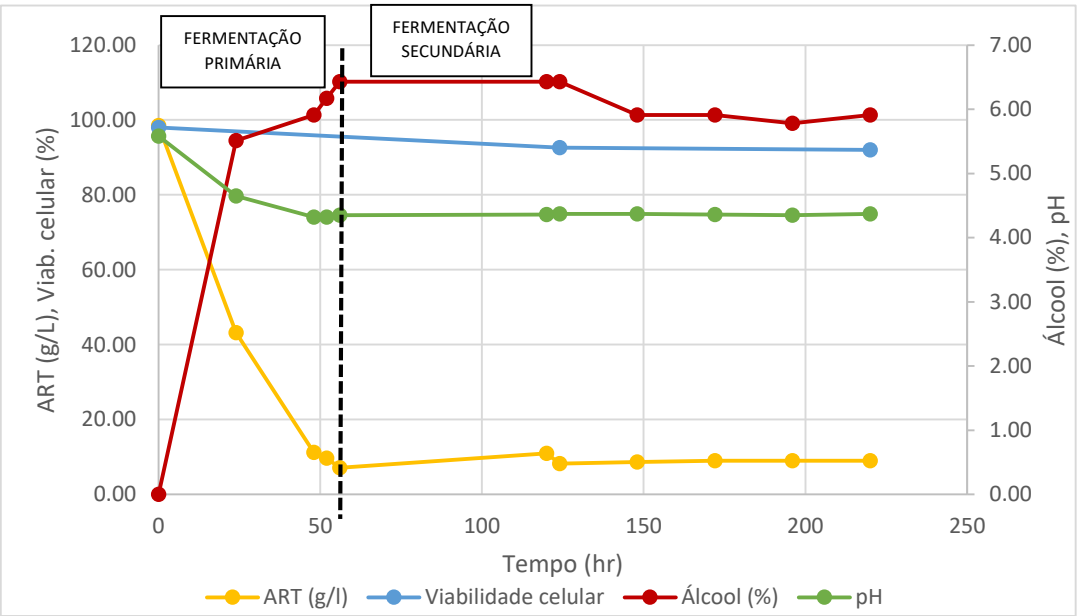
A produção de gás carbônico durante a fermentação também pode ser um fator que causa alterações estruturais as esferas de imobilização, gerando uma maior pressão interna capaz de romper a estrutura. Porém, a presença de CO_2 reduz o estresse da matriz de hidrogel causado pela expansão das células imobilizadas. As bolhas formadas no interior das esferas são capazes de amortecer localmente os efeitos de compactação que ocorrem com o crescimento celular (PAJIC-LIJAKOVIC *et al.,* 2017).

A manutenção das esferas de alginato em solução de cloreto de cálcio com substrato entre uma fermentação e outra durante o processo de reutilização para fermentação, pode ser uma alternativa para conservar por mais tempo a estrutura das esferas.

3.4. FERMENTAÇÃO EXPERIMENTAL

Com os resultados apresentados durante a fermentação em volume de 10L, passou-se para a etapa do estudo em fermentação de 20L (Figura 15). Para avaliar a reprodutibilidade do processo com aumento de escala visando aplicação industrial, e análise sensorial.

Figura 15 - Perfil fermentativo em relação ao consumo dos açúcares fermentescíveis, teor alcoólico, pH e viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio em função do tempo (volume de 20L)



Fonte: autora, 2019

Observa-se que o perfil da fermentação com leveduras imobilizadas em um volume de 20L é similar ao apresentado em volume teste de 20ml (Figura 15), no qual o tempo de finalização da fermentação primária também foi de aproximadamente 53 horas, obtendo-se o coeficiente de fator de conversão de substrato em produto de 0,429. A eficiência do processo foi 83,9% e a produção de etanol foi 0,831 $g.L^{-1}.h^{-1}$. A viabilidade celular apresentou uma diminuição de apenas 7% e o comportamento do pH ao longo da reação foi semelhante ao ocorrido na fermentação piloto com decaimento logo no início e depois mantendo-se estável.

O resultado apresentado nesta fermentação (Figura 15) demonstra a viabilidade do processo de fermentação para produção de cerveja com levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio. Porém, como o presente estudo tem como objetivo simular um processo industrial, se faz necessário uma análise sensorial para a garantia de que o produto gerado agrada sensorialmente ao consumidor, não causando rejeição pela produção de *off-flavor* ou destoando das características de uma cerveja tradicional.

3.5. ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial demonstrou que no total de 100 provadores, 55 detectaram diferenças nas características dos produtos acertando qual dentre as três amostras era a diferente. Desta forma, as amostras apresentam diferenças sensoriais significativas ($p<0,05$) ao avaliarem características como cor, aroma, gosto, aparência e refrescância.

Em pesquisa proposta por ALMONACID *et al.* (2012), caracterizado pelo estudo de fermentação descontínua com leveduras imobilizadas para a produção de cerveja *stout*, avaliou-se possíveis diferenças sensoriais da cerveja verde (pré-maturação) e pós maturação através do teste triangular com 24 provadores treinados. Os degustadores indicaram uma diferença significativa ($p<0,05$) nas amostras de cerveja verde, tendo como possível justificativa as mudanças do comportamento celular durante a imobilização sendo capazes de produzirem compostos que alterem o sabor e a cor original.

O processo de imobilização tem demonstrado alterações em características sensoriais no produto final, causado por processos durante a etapa da fermentação primária, que muitas vezes limita o metabolismo celular. Porém, as consequentes mudanças na etapa de maturação são mínimas, visto que não existe um representativo crescimento celular e nem formação de compostos que caracterizam sabor, ocorrendo de forma significativa apenas a redução de compostos indesejáveis. Por este motivo, projetos que avaliam processos fermentativos com leveduras livres durante a fermentação primária e imobilizadas na fermentação secundária, foram desenvolvidos (YAMAUCHI et al, 1995; DOMENY *et al.*, 1998; KRONLÖF *et al.*, 2000; PAJUNEN *et al.*, 1989; LESKOSEK-CUKALOVIC & NEDOVIC, 2005).

4. CONCLUSÃO

Os dados obtidos permitem concluir que a metodologia utilizada para a imobilização das leveduras foi satisfatória, uma vez que foi possível fermentar o mosto cervejeiro, apresentando uma similaridade entre a fermentação com volume de 20ml e de 20L, cujo rendimento de processo foi muito semelhante, 85,7% e 83,9%, respectivamente, em um tempo de 53h. Com a técnica de imobilização possibilitou a reutilização dos biocatalizadores em fermentações descontínuas com rendimento final satisfatório de 87,79%, sem, contudo, alterar

de forma significativa a viabilidade celular, demonstrando que a imobilização não compromete o processo fermentativo da levedura.

No aspecto sensorial, as amostras de cerveja com levedura imobilizada e com levedura livre demonstraram existir uma diferença significativa ($p<0,05$) capaz de serem percebidas por consumidores comuns.

REFERÊNCIAS

ALMONACID, S.F., NÁJERA, YOUNG, S.F., SIMPSON, R.J., ACEVEDO, C. A. *A comparative study of stout beer batch fermentation using free and microencapsulated yeasts*. Food Bioprocess Technol, vol. 5, p. 750-758, nov/2010

AL-RUB, F.A.A.; EL-NASS, M.H.; BENYAHIA, F.; ASHOUR, I. *Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells. Process Biochemistry*, v.39, 1767–1773, jul/2004

AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHIMIDELL, W., LIMA, U.A. Biotecnologia Industrial na produção de alimentos – Volume 4. 1º Edição. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ldta, 2001

AZEREDO, H.M.C., *Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos*. Alim. Nutr., v. 16, n. 1, p. 89-97, mar/2005

AZHAR, S. H.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; GANSAU, J. A.; MOHD FAIK, A. A.; RODRIGUES, K. F. *Yeasts in sustainable bioethanol production: A review.* Biochemistry and Biophysics Reports, v.10, p.52–61, mar/2017

BEHERA, S.; RAY, R. C. *Batch ethanol production from cassava (Manihot esculenta Crantz.) flour using Saccharomyces cerevisiae cells immobilized in calcium alginate.* Annals of Microbiology, v.65(2), p.779–783,mai/2014

BENTO, R.A.; ANDRADE, S.A.C.; SILVA, A.M.A.D. Técnico em Alimentos: Análise Sensorial de Alimentos. 2013. Disponível em: < http://proedu.rnp.br/handle/123456789/950>. Acesso em: dezembro/2019

BEZBRADICA, D.; OBRADOVIC, B.; LESKOSEK-CUKALOVIC, I.; BUGARSKI, B.; NEDOVIC, V. *Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation*. Process Biochemistry, v.42(9), p.1348–1351, abr/2007

BRUNELLI, L.T. Produção de Cerveja com Mel: Características Físico-químicas, Energética e Sensorial. 2012. 103f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo

CERVBRASIL. Anuário 2016. Acesso em: out/2018. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuario/

CERVEJARIA FALLER. Calculadora. Disponível em:< https://cervejariafaller.com.br/calculadora/>. Acesso em: out/2018

COMPAGNO, C.; DASHKO, S.; PIŠKUR, J. *Introduction to Carbon Metabolism in Yeast.* Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism, p.1–19, 2014

COVIZZI, L.G., GEISE, E.C., GOMES, E., DEKKER, R.F.H., SILVA, R. *Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas*. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, dez/2007

DASHKO, S.; ZHOU, N.; COMPAGNO, C.; PIŠKUR, J. *Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?* FEMS Yeast Research, v.14(6), p.826–832, mai/2014

DEKA, J.; PAUL, A.; CHATTOPADHYAY, A. *Modulating enzymatic activity in the presence of gold nanoparticles.* RSC Advances, v.2(11), p.4736-4745, mar/2012

DJORDJEVIC, R.; GIBSON, I.I.; VUNDUK, K.J.; NIKICEVIC, N.; NEDOVICK, V. *Raspberry wine fermentation with suspended and immobilized yeast cells of two strains of Saccharomyces cerevisiae*. Wiley Online Library, v.32, p.271–279, jan/2015

DJORDJEVIĆ, V.; WILLAERT, R.; GIBSON, B.; NEDOVIĆ, V. *Immobilized Yeast Cells and Secondary Metabolites.* Fungal Metabolites, p.599–638, 2017

DRAGONE, G., MUSSATTO, S.I., SILVA, J.B.A. *Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas*

tendências para o aumento da produtividade. Ciênc. Tecnol. Aliment., v.27, p.37-40, ago/2007

DUARTE, J.C.; RODRIGUES, J.A.R.; MORAN, P.J.S.; VALENÇA, G.P.; NUNHEZ, J.R. *Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation*. AMB Express, v.3, mai/2013

ES, I.; VIEIRA, J.D.G.; AMARAL, A.C. *Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application*. Appl Microbiol Biotechnol, v.99(5), p.2065-2082, Jan/2015

FERREIRA, V.L.P. *et al.* Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos. Campinas, SP: SBCTA, 2000

FOGLER, H. S. Elementos de engenharia das reações químicas. 4º edição. Rio de Janeiro: LTC, 2012

GALLONE, B.; STEENSELS, J.; PRAHL, T.; SORIAGA, L.; SAELS, V.; HERRERA-MALAVER, B.; VERSTREPEN, K. J. *Domestication and Divergence of Saccharomyces cerevisiae Beer Yeasts*. Cell, v.166(6), p.1397–1410, set/2016

GRASSI, S.; AMIGO, J.M.; LYNDGAARD, C.B.; FOSCHINO, R.; CASIRAGHI, E. *Assessment of the sugars and ethanol development in beer fermentation with FT-IR and multivariate curve resolution models*. Food Research International, v.62, p. 602–608, ago/2014

HICHKERT, L.R.; CRUZ, M.M.; DILLON, A.J.P.; FONTANA, R.C.; ROSA, C.A.; AYUB, L.A.Z. Fermentation kinetics of acid–enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors *of Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, *and their co-cultivations*. Biochemical Engineering Journal, v.88, p.61-67, jul/ 2014

HISS, H. Cinética de Processo Fermentativos. In LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial - Volume 2: Engenharia Bioquímica. Editora: Edgard Blücher LTDA. São Paulo, p. 93-122, 2001

HOUGH, J. S. Sweet wort production. In: HOUGH, J. S. The biotechnology of malting and brewing. Cambridge: Cambridge University Press, 1991, p.54-72

KOURKOUTAS, Y., BEKATOROU, A., BANAT, I.M, MARCHANT, R., KOUTINAS, A.A. *Immobilizations Technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review*. Food Microbiology, v.21, p.377-397, ago/2004

KREGIEL, D.; BERLOWSKA, J.; AMBROZIAK, W. *Growth and metabolic activity of conventional and non-conventional yeasts immobilized in foamed alginate*. Enzyme and Microbial Technology, v.53(4), p.229–234, mai/2013

KROGERUS, K.; GIBSON, B. R. *125thAnniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation*. Journal of the Institute of Brewing, v.119, p.86-97, ago/2013

KWAKITA L.H., QUEIROZ, M. O. Produção de cerveja artesanal em uma cidade do interior de Mato Grosso do Sul: um estudo de caso para implementação em Paranaíba-MS. In: I Simpósio Sul-Mato-Grossense de Administração, 2017, Mato Grosso do Sul. *Anais*... Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2017

LYUBENOCA, V.; DENKOVA, R.; SHOPSKA, V.; KANEVA, M. *Encapsulation of brewing yeast in alginate/chitosan matrix: Kinetic characteristics of the fermentation process at a constant fermentation temperature*. Compt. rend. Acad. bulg. Sci., v. 69, n.10, p.1355-1364, mai/2016

MARGARITIS, A., MERCHANT, F.J.A., ABBOT, B. J. *Advances in Ethanol Production using Immobilized Cell Systems*. Journal Critical Review in Biotechnology, v.1, p.339-393, set/2008

MILLER, G. L. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical Chemistry, v. 31, p. 426, mar/1959

MISHRA, A.; SHARMA, A. K.; SHARMA, S.; BAGAI, R.; MATHUR, A. S.; GUPTA, R. P.; TULI, D. K. *Lignocellulosic ethanol production employing*

immobilized Saccharomyces cerevisiae in packed bed reactor. Renewable Energy, v.98, p.57–63, fev/2016

MORENO-GARCIA, J.; GARCIA-MARTINEZ, T.; MAURÍCIO, J.C.; MORENO, J. *Yeast Immobilization Systems for Alcoholic Wine Fermentations: Actual Trends and Future Perspectives*. Frontiers in Microbiology, v.9, n.241, fev/2018

NAYDENOVA, V.; BADOVA, M.; VASSILEV, S.; ILIEV, V.; KANEVA, M.; KOSTOV, G. *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, jul/2014

NAYDENOVA, V.; VASSILEV, S.; KANEVA, M.; KOSTOV, G. *Encapsulation of brewing yeast in alginate/chitosan matrix: comparative study of beer fermentation with immobilized and free cells*. Bulgarian Journal of Agricultural Science, v. 19, n.2, p. 123-127, out/2013

NEDOVIĆ, V., GIBSON, B., MANTZOURIDOU, T. F., BUGARSKI B., DJORDJEVIĆ, V., KALUŠEVIĆ A., PARASKEVOPOULOU, A., SANDELL, M., ŠMOGROVIČOVÁ, D., YILMAZTEKI, M.; *Aroma formation by immobilized yeast cells infermentation processes*. Yeast, vol. 32, p. 173–216, set/2015

NIKOLIC, S.; MAJOVIC, L.; RAKIN, M.; PEJIN, D.; NEDOVIC, V. *Effect of different fermentation parameters on bioethanol production from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of Saccharomyces cerevisiae var.ellipsoideus*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v.84(4), p.497–503, out/2008

NOGUEIRA, A.R.S. Fermentação Contínua de Mosto com leveduras imobilizadas em Alginato. 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Química. Universidade de Aveiro, Aveiro

NOGUEIRA, A.R.S. *Fermentação Contínua de Mosto com Leveduras Imobilizadas em Alginato*. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro/Portugal

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. Fundamentos de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. São Paulo: Manole, 2006

PAJIC-LIJAKOVIC, I. *Micro-environmentally restricted cell growth dynamics – modeling considerations*. Critical Reviews in Biotechnology, v.35(3), p.402–409, mar/2014

PAJIC-LIJAKOVIC, I.; LEVIC, S.; HADNAĐEV, M.; STEVANOVIC-DAJIC, Z.; RADOSEVIC, R.; NEDOVIC, V.; BUGARSKI, B. *Structural changes of Ca-alginate beads caused by immobilized yeast cell growth.* Biochemical Engineering Journal, v.103, p.32–38, jun/2015

PAJIC-LIJAKOVIC, I.; MILIVOJEVIC, M.; LEVIC, S.; TRIFKOVIC, K.; STEVANOVIC-DAJIC, Z.; RADOSEVIC, R.; BUGARSKI, B. *Matrix resistance stress: A key parameter for immobilized cell growth regulation*. Process Biochemistry, v.52, p.30–43, out/2017

PARK, J.K.; CHANG, H.N. *Microencapsulation of microbial cells*. Biotechnology Advances, v.18, p.303–319, 2000

PEREIRA, A. P.; MENDES-FERREIRA, A.; ESTEVINHO, L. M.; MENDES-FAIA, A. *Mead production: fermentative performance of yeasts entrapped in different concentrations of alginate.* Journal of the Institute of Brewing, v.120, p.575–580, set/2014

PEREIRA, A.P.; MENDES-FERREIRA, A.; OLIVEIRA, J.M.; ESTEVINHO, L.M.; MENDES-FAIA, A. *Effect of Saccharomyces cerevisiae cells immobilisation on mead production*. LWT - Food Science and Technology. v.56, p.21-30, abr/2014

PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A. *Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast.* Applied Microbiology and Biotechnology, v.98(5), p.1937-1949, jan/2014

PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. *In:* AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A. Biotecnologia Industrial na produção de alimentos – Volume 2. 1º Edição. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ldta, 2001, p. 355-370

RAFIEE, A.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; GAZORI, T.; RIAZI-RAD, F.; FATEMI, S. M. R.; PARIZADEH, A.; HAVASKARY, M. *Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, v.4(5), p.372–377, out/2014

RATHORE, S.; DESAI, P.M.; LIEW, C.V.; CHAN, L.W.; HENH, P.W.S. *Microencapsulation of microbial cells*. Journal of Food Engineering, v.116, p.369–381, jan/2013

REBELLO, F.F.P., *Produção de cerveja: Revisão*. Revista Agrogeoambiental, n.3, dez/2009.

ROKSTAD, A. M. A.; LACÍK, I.; DE VOS, P.; STRAND, B. L. *Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation*. Advanced Drug Delivery Reviews, v.67-68, p.111-130, 2014

SANTOS, A.M.P., MAUGERI, F. *Modelling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design*. Bioresource Technology, v.16, p.3142-3148, dez/2007

SAQIB, A. A. N.; WHITNEY, P. J. *Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars*. Biomass and Bioenergy, v.35(11), p.4748–4750, set/2011

SHEN, H.Y.; MOONJAI, N.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R. *Impact of Attachment Immobilization on Yeast Physiology and Fermentation Performance.* Journal of the American Society of Brewing Chemists, v.61(2), p.79–87, fev/2018

SHIBAMOTO, T. *Diacetyl: Occurrence, Analysis, and Toxicity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.62(18), p.4048–4053, abr/2014

TATA, M., BOWER, P., BROMBERG, S., DUMCOMB, D., FEHRING, J., LAU, V., RYDER, D., STASSI, P. *Immobilized Yeast Bioreactor Systems for Continuous Beer Fermentation*. Biotechnol. Prog., v.15, p.105−113, jan/1999

VENTURINI, W.G. Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia. 2º Edição. São Paulo: Blucher, 2016

VERBELEN, P. J.; DE SCHUTTER, D. P.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R. *Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications*. Biotechnology Letters, v.28(19), p.1515–1525, ago/2006

VILELA, A.; SCHULLER, D.; MENDES-FAIA, A.; CÔRTE-REAL, M. *Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized Saccharomyces cerevisiae cells.* Applied Microbiology and Biotechnology, v.97(11), p.4991–5000, jan/2013

WALKER, G.; STEWART, G. *Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages.* Beverages, v.2(4), nov/2016

YOU, J.O.; PARK, S.B.; PARK, H.Y.; HAAM, S.; CHUNG, C.H.; KIM, W.S. *Preparation of regular sized Ca-alginate microspheres using membrane emulsication method*. J. Microencapsulation, v.18, n.4, p.521-532, jan/2001

APÊNDICE 1

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS

Questionário

As informações aqui prestadas serão confidenciais, não sendo repassado para pessoas que não estejam envolvidas diretamente na pesquisa do referido projeto
Nome: _____
Data: _____
Endereço e/ou Telefone: _____

Por favor, responda às seguintes perguntas:
1. Idade:
( ) 18 a 20 anos ( ) 21 a 25 anos ( ) 26 a 35 anos ( ) 36 a 45 anos ( ) 46 a 50 anos ( ) mais de 50 anos

2. Grau de escolaridade:
( ) 1°Grau incompleto ( ) 1°Grau completo ( ) 2°Grau incompleto
( ) 2°Grau completo ( ) Superior incompleto ( ) Superior completo

3. Atividade Profissional: _____

4. Qual sua frequência de consumo de bebidas alcoólicas:
( ) inferior a 1 vez por mês ( ) 1 a 3 vezes por mês ( ) 1 vez por semana ( ) 2 ou mais vezes por semana ( ) diariamente

5. Qual sua frequência de consumo de cerveja:
( ) inferior a 1 vez por mês ( ) 1 a 3 vezes por mês ( ) 1 vez por semana ( ) 2 ou mais vezes por semana ( ) diariamente

6. Você é fumante? ( ) Sim ( ) Não

7. Você é gestante ou lactante? ( ) Sim ( ) Não

8. Atualmente, você está fazendo o uso de medicamentos que alterem o seu paladar?
( ) Sim ( ) Não

9. Você apresenta alguma doença no trato respiratório como gripe ou resfriado?
( ) Sim ( ) Não

10. Após a avaliação, nas próximas 12 horas você irá conduzir algum veículo de transporte?
( ) Sim ( ) Não

11. Você tem experiência em degustação profissional de cerveja ou participou de algum treinamento?
( ) Sim ( ) Não

Obrigado pela colaboração!!

APÊNDICE 2

TESTE TRIANGULAR

Nome:_____
Data:_____

Você está recebendo três amostras de cerveja. Duas das três amostras são iguais, sem nenhum tipo de alteração em seu tratamento ou composição. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita, escreva os códigos nas três linhas a baixo e faça um círculo na amostra diferente. Você pode reavaliar as amostras quantas vezes forem necessárias, porém entre uma amostra e outra, mastigue a bolacha e enxágue a boca com água.

_____ _____ _____

Comentários:
_____
_____
_____

Obrigada!

ANEXO 1

Tabela 5.1: Continuação da tabela anterior. Número mínimo de respostas corretas para estabelecer diferença significativa entre as amostras, em vários níveis de significância.

38	19	19	19	20	21	21	23
39	19	19	20	20	21	22	23
40	19	20	20	21	21	22	24
41	20	20	20	21	22	23	24
42	20	20	21	21	22	23	25
43	20	21	21	22	23	24	25
44	21	21	22	22	23	24	26
45	21	22	22	23	24	24	26
46	22	22	22	23	24	25	27
47	22	22	23	23	24	25	27
48	22	23	23	24	25	26	27
49	23	23	24	24	25	26	28
50	23	24	24	25	26	26	28
60	27	27	28	29	30	31	33
70	31	31	32	33	34	35	37
80	35	35	36	36	38	39	41
90	38	39	40	40	42	43	45
100	42	43	43	44	45	47	49

Fonte: Ferreira *et al.*, 2010