

ADIÇÃO DE NUTRIENTES À FERMENTAÇÃO DA CERVEJA VISANDO ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES

*Fernanda Gabriela Fregonesi¹, Marcelo Calide Barga²,
Camila Nunes de Moraes Ribeiro³ e Daniela Florencio Maluf⁴*

RESUMO

O aumento da aceitação pelos consumidores das cervejas artesanais tem colocado o estado do Paraná em posição de destaque na produção do Brasil. As cervejarias artesanais focam em produtos que possuem qualidades sensoriais diferenciadas das cervejas comerciais, como diferentes notas de aroma e sabor através da adição de lúpulos, insumos e do uso de diferentes cepas de leveduras para a fermentação. Para aumentar a eficácia da fermentação, diferentes nutrientes podem ser incorporados ao mosto. Neste estudo foram utilizados dois tipos de nutrientes em diferentes quantidades em mostos de 14° e 18° Brix, averiguando assim, o metabolismo de açúcares redutores, produção de álcool e alteração da densidade dos mostos iniciais até o resultado fermentado. As amostras fermentadas foram analisadas por CLAE para confirmação dos testes laboratoriais. Foram obtidas fermentações de acordo com a adição dos nutrientes e suas quantidades, obtendo-se valores mais próximos ou mais distantes das fermentações controle, que não possuíam nutrientes. Alguns fatores não obtiveram modificações relevantes como, por exemplo, a densidade, mas foram observadas significativas alterações em análises como dosagem de açúcar redutor e grau brix, indicando que a suplementação na fermentação agrega melhorias ao produto final.

Palavras-chave: Nutrientes. Cerveja. Cromatografia.

ABSTRACT

Increased acceptance by consumers of craft beers have placed the State of Paraná in a prominent position in the production of Brazil. The craft breweries focus on products that have sensory qualities distinguished from commercial beers as different grades of aroma and flavor with the addition of hops, inputs and the use of different strains of yeast for fermentation. To increase the efficiency of fermentation, different nutrients can be incorporated into the mash. In this study we used two types of nutrients in different quantities in grape 14 and 18 Brix, checking the metabolism of reducing sugars, alcohol production and change the density of the grape must start up the fermented result. Fermented samples were analyzed by HPLC for confirmation of the laboratory tests. Brews were obtained according to the addition of nutrients and their amounts, obtaining values closer or farther away from the fermentation control, which did not possess nutrients. Some factors have not been relevant modifications, such as density, but significant changes were observed in analyses such as reducing sugar dosage and degree brix, indicating that supplementation on fermentation adds improvements to the final product.

Keywords: Nutrients. Beer. Chromatography.

1 INTRODUÇÃO

A rápida expansão do mercado artesanal cervejeiro no Brasil tem levado à busca pela identidade da cerveja paranaense. Os esforços dos fabricantes de cervejas denominadas especiais

1 Acadêmica do Curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

2 Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia, Prof. MSc. do curso de Biotecnologia da Universidade Positivo.

3 Biomédica, Profa. Dra. Coordenadora do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

4 Farmacêutica, Prof. Dra. do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

são concentrados em desenvolver novas propriedades sensoriais em seus produtos, melhorando o sabor, aroma e aspecto. Um fator fortemente responsável por este avanço na qualidade da cerveja é a completa conversão dos açúcares, sem contaminações, durante a fermentação¹⁻⁵.

A cepa de levedura mais popularmente utilizada para a fabricação da cerveja é a *Saccharomyces cerevisiae* que, ao realizar a fermentação, contribui para acentuar o sabor e enaltecer aromas da cerveja. Esta fermentação pode ser conduzida de várias maneiras, como as chamadas baixas fermentações (realizadas a temperaturas entre 7°C a 13°C) que levam em torno de seis a doze dias, e as altas fermentações (15 a 20°C) que duram de dois a quatro dias⁶⁻⁸.

Durante o período de fermentação, as leveduras passam do metabolismo aeróbio para o anaeróbio utilizando a via alcoólica para produção de ATP, que converte glicose em álcool e dióxido de carbono, e conseqüentemente produzindo ésteres. A escolha da cepa a ser utilizada tem grande importância no resultado final, não influenciando somente o aroma como também a graduação alcoólica e produção dos chamados *off flavours*, aromas indesejados na cerveja⁸⁻¹².

O objetivo deste trabalho é verificar o comportamento da cepa de levedura WLP 0001, levedura versátil de alta fermentação, na presença de nutrientes verificando a influência da suplementação na fermentação e possíveis alterações na taxa de produção de álcool, redução de açúcares fermentáveis, pH e densidade¹³⁻¹⁵.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Malte

A composição do mosto (malte ou extrato de malte) é muito importante para a fermentação dos nutrientes do malte até a quantidade de açúcar presente no mesmo⁸. Ao cozinhar o malte ocorre a hidrólise do amido em açúcares através da ação de enzimas, descritas na tabela 1.

TABELA 1: Enzimas presentes no malte

Enzima	Temperatura	pH	Função
Fitase	30-52°C	5,0 – 5,5	Abaixa o pH da mostura
Debranching	35-45°C	5,0 - 5,8	Solubilização do amido
BetaGlucanase	35-45°C	4,5 - 5,5	Quebra os glucanos
Peptidase	45 – 44°C	4,6 – 5,3	Produção do amino-nitrogênio livre
Protease	45 – 55°C	4,6 – 5,3	Quebra de proteínas grandes que produzem a turvação
Beta amilase	55 – 65°C	5,0 – 5,5	Decomposição do amido em maltose
Alfa amilase	68 – 72°C	5,3 – 5,7	Decomposição do amido para dextrinas inferiores.

Fonte: BODEN, H. 2009

Para padronização dos mostos, foi utilizado um extrato de malte em pó, cujas especificações estão descritas na tabela 2.

TABELA 2: Características físico-químicas do extrato de malte utilizado

ANÁLISES	ESPECIFICADO	OBTIDO
pH	4,5 – 6,0	6,0
Açúcar redutor (%)	60 – 80	71,50
Carboidratos totais (%)	88-100	91,50
Proteínas (%)	4,5 -6,0	4,50

2.2 Lúpulo

Para o presente trabalho a variedade de lúpulo escolhida foi Galena, de origem norte americana, que pode ser utilizado tanto para amargor, como para sabor e aroma por possuir 12% de α -ácidos e aroma aparente. Os α -ácidos são os componentes mais expressivos do amargor do lúpulo, que também contém outros óleos essenciais. À medida que o mosto sofre fervura, os α -ácidos alteram sua estrutura química e resultam em ácidos iso- α . Estes ácidos são os responsáveis por aumentar o amargor da cerveja. O Galena foi adicionado no início da fervura, com duração de 1 hora, conferindo assim mais amargor do que aroma à cerveja¹⁶⁻¹⁸.

2.3 Levedura

A fermentação foi conduzida utilizando a cepa de levedura WLP 0001, a qual foi repicada e replicada para o presente trabalho. A taxa de inóculo utilizada foi de $6,0 \cdot 10^6$ células/ mL.

TABELA 3: Características da levedura WLP001

Floculação	Média
Temperatura ótima de fermentação	20-24°C
Tolerância ao álcool	Alta
Atenuação	73-80%

Fonte: WHITE LABS, 2009

2.4 Análise do mosto

2.4.1 Açúcares Redutores por DNS

Açúcares que possuem uma hidroxila livre no carbono 1 de sua molécula são denominados “açúcares redutores” por possuírem boa capacidade de reduzir íons metálicos como o cobre e a prata em soluções alcalinas³.

Devido ao bom poder redutor, além de íons metálicos, outros compostos também são reduzidos por estes açúcares. Por exemplo, o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que é reduzido ao ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao custo da oxidação do grupo carbonílico ou cetônico do açúcar. O resultado é o desenvolvimento de coloração avermelhada, que pode ser lida espectrofotometricamente a 540 nm e comparada a uma curva-padrão.

2.4.2 Teor Alcoólico

A análise do teor alcoólico foi realizada mediante destilação de 200 mL de amostra e aferição do destilado com alcoômetro Gay Lussac em temperatura corrigida para 20°C.

2.4.3 Densidade

A medida da densidade do mosto foi obtida com auxílio de um densímetro, comparando a OG (Original Gravity, ou densidade original) com a FG (Final Gravity, ou densidade final da cerveja), calculada após a fermentação.

2.4.4 pH

A análise do pH, obtida com auxílio de um pHmetro, compreendeu a aferição dos valores inicial e final do mosto de cada experimento, em triplicata.

2.4.5 Avaliação da adição de nutrientes

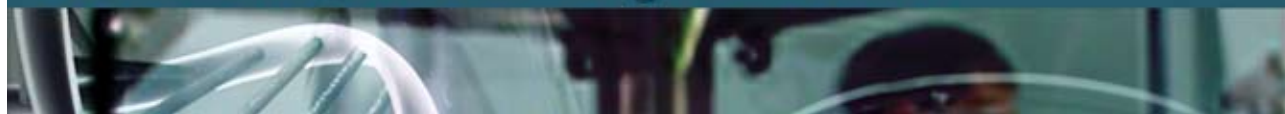
Os nutrientes escolhidos foram o Fermoplus Energy® e o Enovit® da empresa AEB. O Fermoplus Energy® possui em sua composição 99,4% de cascas de levedura, sendo que esta celulose facilita a homogeneização da distribuição das leveduras no mosto. Ainda contém 0,6% de moléculas nitrogenadas em sinergia com a vitamina B1, substâncias úteis para o metabolismo da levedura, que melhoram sua eficiência.

O Enovit® regula e ativa a fermentação estimulando a multiplicação das leveduras, restabelecendo o nitrogênio amoniacal e vitaminas do mosto. Os nutrientes foram adicionados ao mosto antes do inóculo do fermento¹⁹.

Os nutrientes foram utilizados nas proporções descritas na tabela 4.

TABELA 4: Distribuição dos nutrientes nos Erlenmeyers

Experimento	Concentração de nutriente utilizada
1	0,105g Fermocell e 0g Enovit
2	0,21g Fermocell e 0g Enovit
3	0g Fermocell e 0,105g Enovit



4	0g Fermocell e 0,21g Enovit
5	0,21g Fermocell e 0,21g Fermocell
6	0,105g Fermocell e 0,105g Enovit
7	0,21g Fermocell e 0,105g Enovit
Controle	0g Fermocell e 0g Enovit

2.5 Fermentação e Maturação

Após o inóculo do fermento e dos nutrientes, o mosto foi fermentado durante 13 dias à temperatura de 18°C. Após este período houve maturação por 15 dias à temperatura de 0°C.

2.6 Preparo e Análise das Fermentações

2.6.1 Fermentação A

Foram inoculados em 6 Erlenmeyers previamente esterilizados, 700mL de mosto. O preparo do mosto foi realizado pela dissolução de 600g do extrato de malte em 4,2 L água e, em seguida, realizado o processo de sacarificação do mosto através da fervura, com posterior adição de 18 g de lúpulo Galena ao início da fervura, que teve duração de 1 hora. Durante a fervura ocorre a isomerização dos α -ácidos do lúpulo que confere o amargor à cerveja.

Após o final da fervura o mosto foi analisado quanto ao pH, determinação de graus Brix, Gravidade Original (OG) e quantidade de açúcares redutores.

TABELA 5: Resultados da análise de mosto da fermentação A

pH do mosto	6,16
Graus Brix	18°
Gravidade Inicial	1065
DNS	129,55 g/L

Após o resfriamento do mosto a 18°C, foram inoculados 26,25 mL de fermento com contagem de $1,6 \cdot 10^8$ células, com 94% de vitalidade, alcançando assim uma taxa de inóculo de $6,0 \cdot 10^6$ células/mL.

2.6.2. Fermentação B

O segundo experimento foi preparado, em triplicata, um mosto com 14° Brix para verificar a atenuação da levedura. Foram inoculados 700 mL do novo mosto em cada um dos 9 erlenmeyers previamente esterilizados.

Para os 6,3 L do novo mosto foram utilizados 599,94 g de Extrato de Malte e 17,95 g de lúpulo Galena. Após a diluição o mosto fora sacarificado através de 1 hora da fervura.

Neste mosto resfriado foram inoculados 27 mL de fermento com contagem de $1,56 \cdot 10^8$ células, 100% de vitalidade, garantindo a mesma taxa de inóculo de $6,0 \cdot 10^6$ células/mL.

TABELA 6: Resultado das análises do mosto da fermentação B

pH	6,10
Graus Brix	14°
Gravidade Inicial	1052
DNS	92,17

2.7 Análise Cromatográfica por CLAE

De cada experimento foi retirado uma alíquota de 15 mL para a análise cromatográfica dos subprodutos produzidos pela fermentação em cada variação de nutriente, tanto para a primeira quanto para a segunda fermentação, para confirmação e complementação dos resultados obtidos. Para a análise de açúcar residual foi utilizada a coluna BioRad HPX 87H; fase móvel H_2SO_4 5 mmol/L; vazão 0,6 mL/min; temperatura 25°C; pré coluna Carbo H+ e para a análise de etanol, coluna BioRad HPX 87H; fase móvel H_2SO_4 5 mmol/L; vazão 0,7 mL/min; temperatura 65°C, pré coluna Carbo H+.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise da fermentação A

TABELA 7: Resultados das análises da fermentação A

Experimento	Nutrientes (mg/mL)	pH	Grau Brix	Densidade (g/L)	Teor alcoólico (%)	Açúcar redutor (g/L)
Controle	0	4,6	11	1028	5,1	74,39
1 (Fermoplus)	105	4,63	11	1028	4,2	23
2 (Fermoplus)	210	4,72	10	1028	4,5	23
3 (Enovit)	105	4,59	11,2	1029	5,3	23
4 (Enovit)	210	4,48	10,5	1028	4,6	24
5 (Fermoplus/Enovit)	210/ 210	4,43	12	1030	5,3	25
6 (Fermoplus/Enovit)	105/210	4,49	12	1031	5,5	25

TABELA 8: Resultado das análises da fermentação B

Experimento	Nutrientes (mg/mL)	pH	Grau Brix	Densidade (g/L)	Teor alcoólico (%)	Açúcar redutor (g/L)
Controle	0	4,7	9	1023	4,5	57,86
1 (Fermoplus)	105	4,61	9	1022	3,5	29,45
2 (Fermoplus)	210	4,56	9	1022	3,1	34,19
3 (Enovit)	105	4,46	9	1022	3,6	37,87
4 (Enovit)	210	4,65	9	1022	3,8	35,24
5 (Fermoplus/Enovit)	210 / 210	4,51	9	1022	4	44,71
6 (Fermoplus/Enovit)	105/210	4,5	9	1022	3,5	32,08
7 (Fermoplus/Enovit)	210 / 105	4,7	11	1027	4	47,86

Após a maturação os produtos das fermentações foram analisados com os mesmos procedimentos realizados ao mosto inicial.

3.2 Análises da fermentação B

Apesar do menor grau Brix inicial, a associação dos nutrientes obteve o menor desempenho na diminuição do grau Brix, densidade, bem como de açúcares redutores.

3.3 Comparação entre as fermentações A e B

3.3.1 pH

Observou-se que na fermentação A (gráfico à esquerda) houve pouca diferença entre o controle (0) e as demais amostras, sendo o experimento 5 com o menor pH registrado em referência ao controle, chegando a 4,43, e o experimento 2 como o maior pH registrado em referência ao controle, alcançando 4,72.

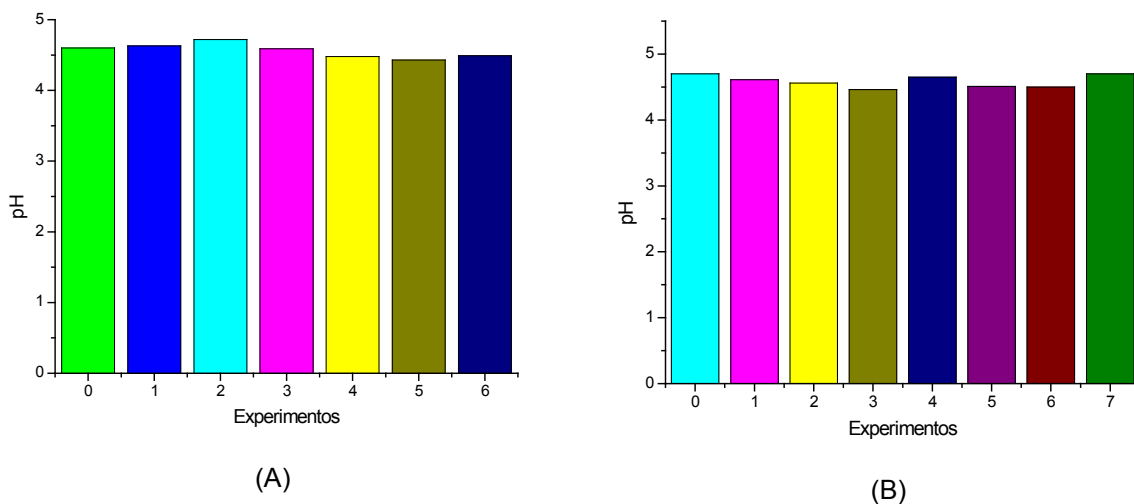


FIGURA 1: Análise do PH das fermentações (A) e (B)

Na fermentação B, o experimento 7 obteve o mesmo pH do controle, e o experimento 6 fora o que obteve o pH mais baixo, com 4,50.

O pH de cervejas prontas variam de 4 a 4,5. Valores de pH acima de 4,5 tornam a cerveja mais vulnerável a contaminações, tornando-a “áspera” em matéria de análise gustativa e abaixo do pH 4 a cerveja se torna ácida demais, descaracterizando o paladar^{19,20}.

3.3.2 Grau Brix

Houve grande variação entre os resultados da diminuição do grau Brix durante a fermentação A. Os experimentos 5 e 6 obtiveram menor consumo de açúcares em referência ao controle, ambos os experimentos foram realizados com a associação dos nutrientes Fermoplus e Enovit, variando apenas as concentrações, sendo o experimento 5 com 210 mg/mL de ambos os nutrientes e o experimento 6 com 105 mg/mL de Fermoplus e 210 mg/mL de Enovit.

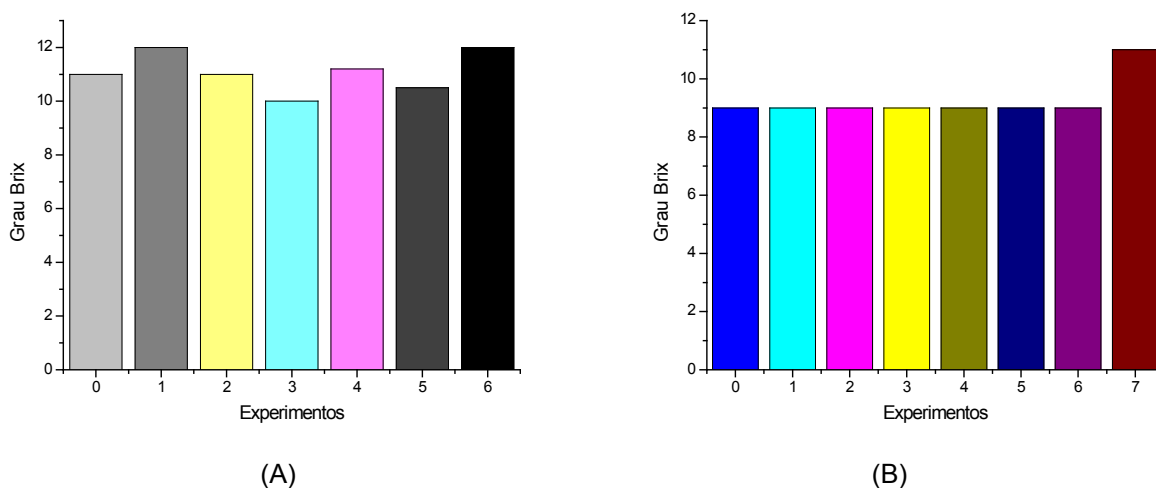


FIGURA 2: Determinação do Grau Brix das fermentações (A) e (B)

Os experimentos 2 e 4 obtiveram o maior consumo de açúcares, ambos possuíam a mesma concentração (210 mg/mL) de nutrientes, variando apenas o nutriente envolvido, no experimento 2 foi utilizado o Fermoplus, enquanto que no experimento 4 foi utilizado o Enovit.

Observou-se na fermentação B que houve apenas um resultado divergente ao resultado do experimento controle, este experimento possuía 210 mg/mL de Enovit e 105 mg/mL de Fermocel, nele foram consumidos menos açúcares do que nos demais experimentos.

3.3.3 DNS

Observou-se grande variação dos controles de fermentações para os demais experimentos, especialmente na fermentação A onde o experimento 5 obteve resultados mais próximos ao controle, com apenas 25 g/L de açúcares redutores ao final da fermentação, enquanto os outros experimentos não apresentaram variação significativa sendo o menor número o de 23 g/L nos experimentos 1, 2 e 3.

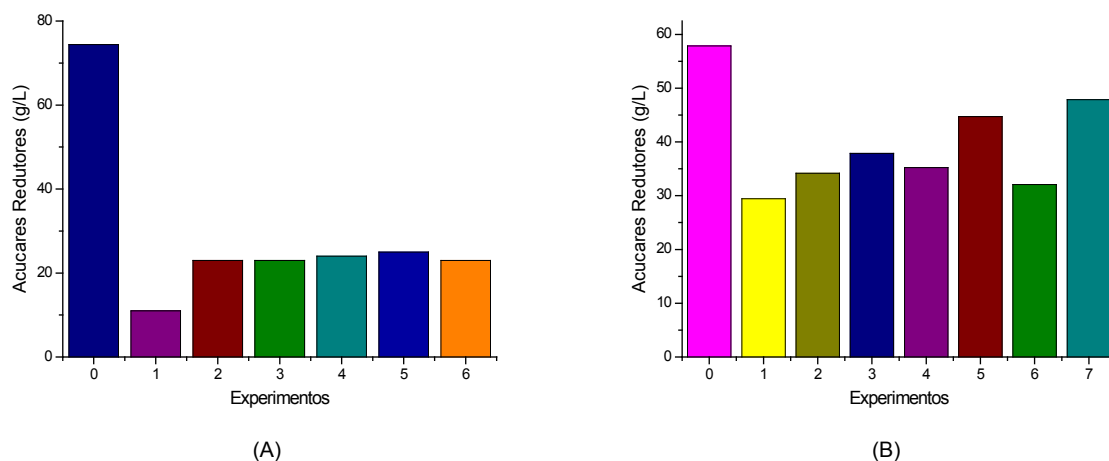


FIGURA 3: Dosagem de açúcar redutor nas fermentações (A) e (B)

No gráfico da fermentação B observa-se grande flutuação de resultados, sendo o mais próximo ao controle o experimento 7, apresentando 47,48 g/L de açúcares redutores, enquanto o menor número obtido foi o do experimento 2, com 34,19 g/L.

Esta variação da concentração dos açúcares redutores influencia nas características do produto final, de forma que quanto maior a concentração, mais adocicado o sabor do produto. Cervejas que possuem teor alcoólico maior apresentam também maior concentração de açúcares redutores.

3.3.4 Teor Alcoólico

Observaram-se grandes variações entre os teores alcoólicos de ambas as fermentações. Na fermentação A observou-se três resultados abaixo do controle e três resultados acima do controle, sendo eles respectivamente, 1,2 e 4 abaixo e 3,5 e 6 acima. Os resultados mais próximos do controle (5,1%) foram os experimentos 3 e 5 com 5,3% de teor alcoólico.

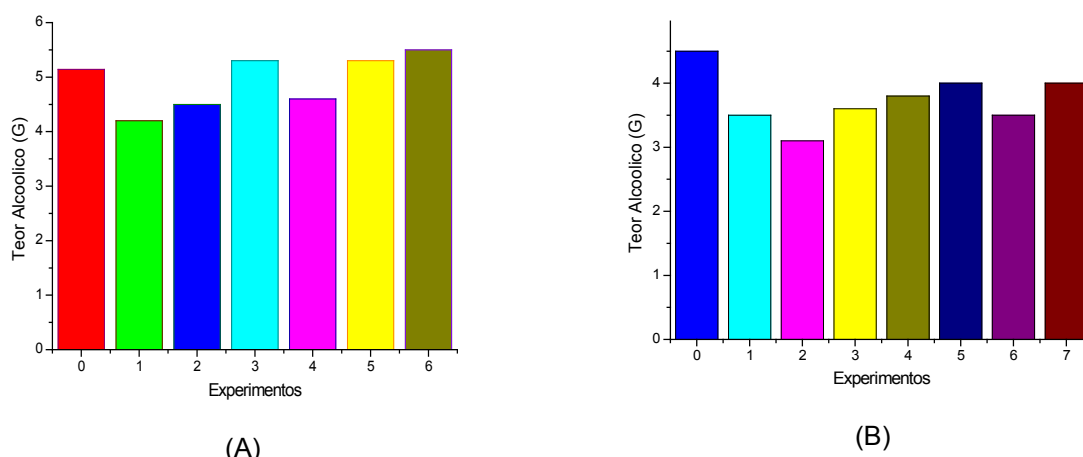


FIGURA 4: Determinação do teor alcoólico nas fermentações (A) e (B)

Já na fermentação B observou-se que todos os resultados foram inferiores ao resultado do controle, sendo os resultados mais próximos os dos experimentos 5 e 7, que alcançaram 4,0% de álcool tendo o controle 4,5% de teor alcoólico.

3.3.5 Densidade

Não foram observadas variações significativas de densidades em nenhuma das fermentações.

3.4 Resultados das Análises Cromatográficas

Foi observado após análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que dos açúcares restantes na amostra, o experimento 1 apresentou a maior concentração de Sucrose (sacarose) entre os demais experimentos, apresentando também a maior concentração de Frutose e Glicose.

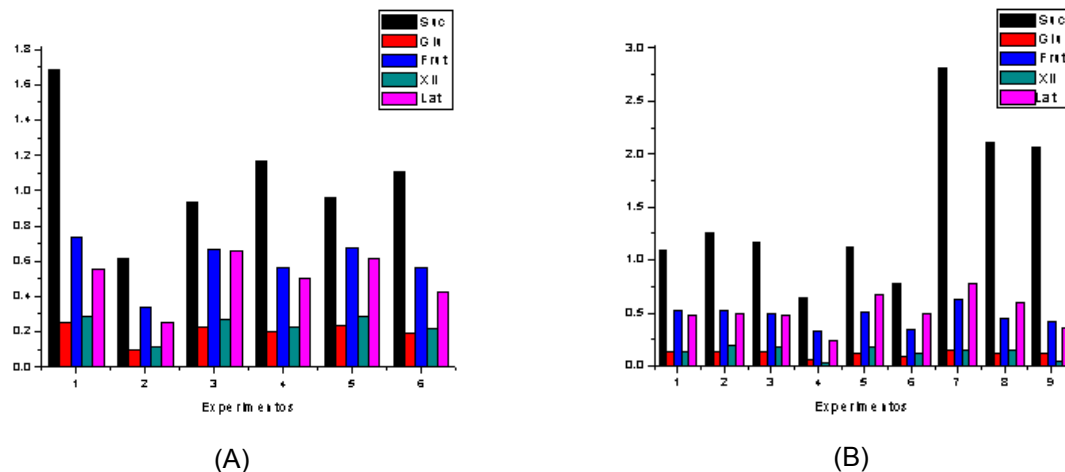


FIGURA 5: Comparação da produção de açúcares entre as fermentações (A) e (B)

O experimento 3 por sua vez apresentou a maior concentração de ácido láctico, componente responsável pela estabilização de pH, favorecendo a precipitação das proteínas do mosto.

O experimento 5 apresentou a maior concentração de xilitol, adoçante natural presente no malte, seu aumento está ligado a aeração ineficiente do mosto, resultando em um metabolismo de fermentação mais lento.

Observou-se na cromatografia da fermentação B que o experimento 7 apresenta a maior concentração de Sucrose, bem como a maior concentração de ácido láctico e frutose. O experimento 2 apresentou a maior concentração de xilitol e o experimento 3 apresentou a maior concentração de glucose.

Os resultados da fermentação B apresentaram em referência a fermentação A, menor produção de xilitol e maior produção de ácido láctico.

CONCLUSÃO

Dentre os resultados, os melhores desempenhos foram vistos onde não houve associação entre os nutrientes em ambos os experimentos. Neles se obteve o menor índice de açúcares redutores finais e maior índice de atenuação de densidade e graus Brix. Com isso pode-se constatar que os objetivos do trabalho foram alcançados, observando alterações nas fermentações variando conforme a quantidade e o tipo de nutriente adicionado.

REFERÊNCIAS

AEB Group – ENOVIT. Disponível em: <<http://www.aeb-group.com/or4/or?uid=aeb.main.index&oid=201428>> Acessado em 06/10/2012.

AEB Group – FERMOPLUS BLANC VARIETAL. Disponível em: <<http://www.aeb-group.com/or4/or?uid=aeb.main.index&oid=201023>> Acessado em 06/10/2012.

AEB group *Protegendo a cerveja e suas matérias primas*. Junho de 2007.

ARAÚJO, F. B.; P. H. A. Silva; V. P. R. Minim; *Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro*. Ciências e tecn. Alimen., Campinas, 23(2): 121-128, maio-ago, 2003.

BAMFORTH, W. C. *Brewing – New technologies*. 2006.

BODEM, H. *Processos de produção: Brassagem*. 09/09/2009. Disponível em: <<http://henrikboden.blogspot.com.br/2009/09/processo-de-producao-brassagem.html>> Acessado em 24/01/2013

BRANCO R. F. et al. *Produção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator de coluna de bolhas* Faculdade de Engenharia Química de Lorena – Depto. de Biotecnologia – Grupo de microbiologia aplicada e bioprocessos. Lorena- SP 2005.

ESTEVES, E. *Guia dos trabalhos práticos de Análise Sensorial*. Área Departamental de Engenharia Alimentar, EST U. Algarve, Faro, 2008.

GALENA hops. Disponível em: <<http://beerlegends.com/galena-hops>>. Acessado em 24/01/2013

KANIAK, T. *Curitiba, a nova Meca da cerveja artesanal*. Disponível em: <<http://revistaideias.com.br/ideias/materia/curitiba-nova-meca-da-cerveja-artesanal>>. Acessado em 07/10/2012

LANATI, D. *De vino. Lezionidienotecnologia*. 3ª edição, 2004.

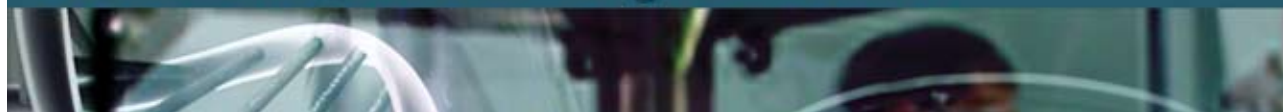
LEÃO, R. M. *Fermentação alcoólica ciência & tecnologia*. 2005

MAFART, P. *Souche de levure de fermentation et flaveur des boissons alcoolisées*. Bios. v. 20, n.3, mar. 1989.

PAPAZIAN, C. *The complete joy of home brewing*. 3ª Edição. 2003.

REINOLD, M.R. *Manual Prático de Cervejaria*. 1.ed. São Paulo: Aden, 1997.213p.

SILVA, N.C.C, 2004 120f. *Avaliação do processo biotecnológico e determinação das condições da desalcoolização da bebida obtida por fermentação controlada de suco de maçã*. Tese Doutorado pelo



programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos Agroindustriais, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná.

STRONG, G. *Brewing better beer: Master lessons for advanced homebrewers*. Brewers Publications, 2011 .

THE CHEMISTRY of hops and alpha acids. Disponível em: <<http://beerlegends.com/chemistry-of-hops-and-alpha-acids>> Acessado em: 21/01/2013.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation* 2010 1ª edição.

WLP 001. Disponível em: <http://www.whitelabs.com/beer/strains_wlp001.html> Acessado em: 04/10/2012.