

ESTUDO DA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO COM LEVEDURA KVEIK IMOBILIZADA EM ALGINATO DE CÁLCIO

RESUMO

Observa-se uma expansão no mercado cervejeiro, sendo que as cervejas artesanais ganham cada vez mais espaço, o que acontece em razão de seu forte sabor e aroma associados ao elevado padrão de qualidade. Nesse contexto, as leveduras Kveik possuem grande potencial a ser explorado. Com isso, o objetivo desse trabalho foi realizar o estudo cinético da fermentação de extrato de malte por levedura Kveik imobilizada em gel de alginato de cálcio. Para isso, realizou-se a imobilização da levedura em gel de alginato de cálcio, fermentação em meio de extrato de malte, análise dos metabólitos em HPLC e caracterização das esferas de alginato por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados demonstraram que toda a glicose foi consumida no meio de fermentação, tanto pela levedura imobilizada quanto pela levedura livre, demonstrando boa assimilação de glicose pelas leveduras Kveik. Além disso, houve consumo gradativo de maltose e produção de cerca de 20 g L^{-1} tanto pela levedura imobilizada como pela livre. Com isso, pode-se concluir que a imobilização não afetou de maneira negativa, tendo havido consumo adequado dos açúcares fermentescíveis e concomitante produção de etanol tanto pela levedura livre quanto pelas células imobilizadas.

INTRODUÇÃO

Atualmente, tem-se observado uma expansão no mercado cervejeiro, sendo que as cervejas artesanais ganham cada vez mais espaço, o que acontece em razão de seu forte sabor e aroma associados a um elevado padrão de qualidade, resultante da seleção das matérias-primas e mudanças nos processos de fabricação (TOZETTO et al., 2019). Além disso, a seleção de leveduras e seu manuseio são fundamentais para a eficiência das fermentações na cervejaria e para a qualidade da cerveja final (STEWART; RUSSELL; ANSTRUTHER, 2017).

Nesse contexto, as leveduras Kveik possuem grande potencial a ser explorado, visto que são leveduras com potencial de fermentar rapidamente açúcares derivados do malte, possibilitando curtos tempos de fermentação e apresentam características como tolerância a etanol e produção de uma variedade de metabólitos de sabor interessante. Além disso, é relatada sua tolerância a altas temperaturas, de modo que podem fermentar em temperatura maior que $30 \text{ }^\circ\text{C}$, enquanto para a maioria das leveduras ales, esta temperatura resulta em aromas e sabores indesejáveis na cerveja (FOSTER et al., 2021; KITS; GARSHOL, 2021; PREISS et al., 2018).

Por outro lado, além da seleção da levedura, a técnica de imobilização de células também é relatada como alternativa para minimização dos efeitos estressantes da fermentação nas leveduras e tem sido buscada com o intuito de inovar na produção e melhorar o desempenho industrial. Isso porque a imobilização de leveduras possibilita vantagens técnicas e econômicas em relação ao sistema convencional de células livres, como alta densidade celular e processos mais rápidos. Assim, células imobilizadas em polímeros como alginato de cálcio podem abrir novas e promissoras estratégias para a produção de bebidas alcoólicas (PINGULI et al., 2020).

Assim, se observa que a produção de cerveja artesanal possui particularidades que fazem a cerveja artesanal ser um produto autêntico com características sensoriais únicas que a distinguem das cervejas produzidas industrialmente (MERLINO et al.,

2020). Desse modo, fatores relacionados à produção como é o caso das leveduras e imobilização, possuem potencial para alavancar o crescimento e a inovação no mercado de cervejas artesanais, além de aumentar o interesse de uma grande variedade de consumidores (BAIANO, 2021).

OBJETIVO

O objetivo geral do trabalho foi realizar o estudo cinético da fermentação de extrato de malte por levedura Kveik imobilizada em gel de alginato de cálcio. Para isso, os objetivos específicos foram realizar a imobilização da levedura em gel de alginato de cálcio, fermentar meio de extrato de malte com as leveduras imobilizadas, analisar os metabólitos em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e caracterizar a morfologia das esferas de alginato por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Para desenvolvimento do estudo foi realizada a imobilização das células, que consistiu em adicionar a suspensão celular a uma solução de alginato de sódio previamente autoclavada a 121 °C por 15 minutos. As esferas de gel foram produzidas pelo gotejamento desta suspensão em uma solução de cloreto de cálcio mantida em agitador magnético. O gotejamento foi realizado com auxílio de uma bomba peristáltica (Sailflo - Dosing Pump, 12 v). Após a imobilização, efetuou-se a cinética da fermentação em frascos de *erlenmeyer* de 250 mL, usando 100 mL de extrato de malte cervejeiro, previamente preparado e esterilizado e 5 g de esferas com leveduras imobilizadas. Para realizar um estudo comparativo, será preparado um ensaio com leveduras livres, na mesma concentração das leveduras imobilizadas. Para avaliar o processo de fermentação alcoólica, alíquotas de mosto fermentado serão retiradas em intervalos de tempos variados e analisadas quanto a açúcares redutores, etanol, glicerol e ácidos orgânicos por meio de HPLC.

Os resultados demonstraram que toda a glicose foi consumida no meio de fermentação, tanto pela levedura imobilizada quanto pela levedura livre, demonstrando boa assimilação de glicose pelas leveduras Kveik, em razão de a glicose ser a principal fonte de carbono para as leveduras. Além disso, houve consumo gradativo de maltose nas primeiras 120 horas de fermentação, sendo estabilizado após esse período para ambas as leveduras (Figura 1).

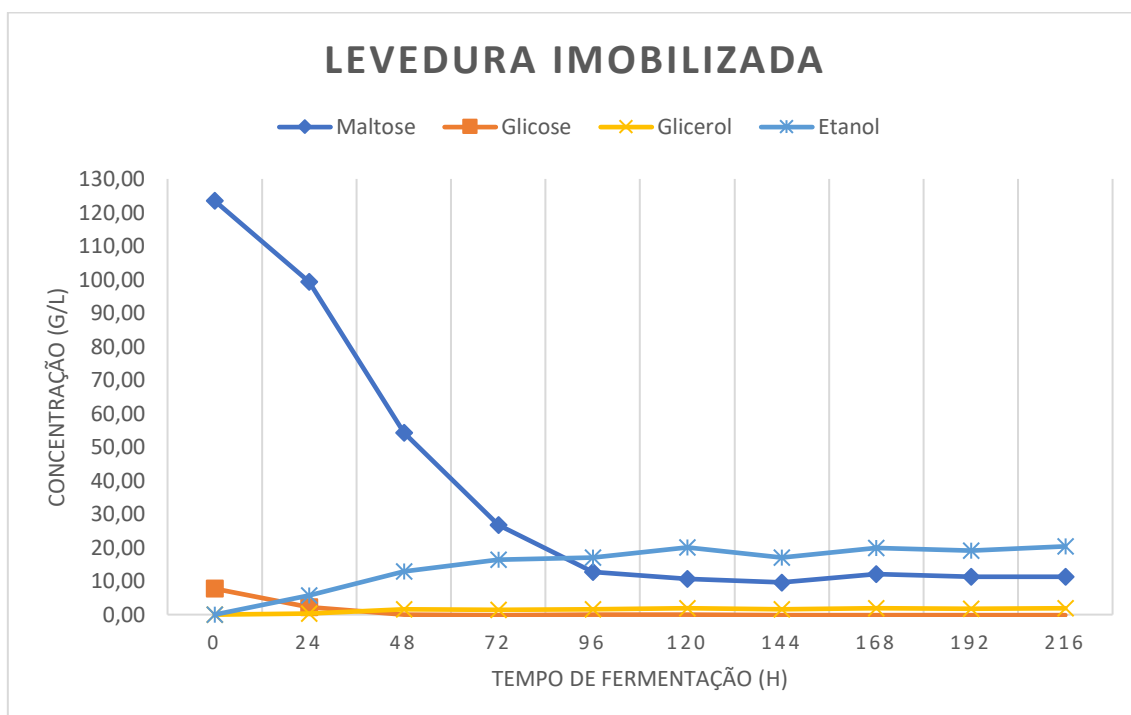
É necessário ressaltar que a cerveja é obtida pela fermentação de um mosto, que leva à conversão da glicose em piruvato e, posteriormente, em etanol e CO₂. Os carboidratos formam 90% do mosto, mas chama-se atenção para o fato de que as leveduras captam os carboidratos do mosto em uma sequência específica: monossacarídeos (glicose e frutose), dissacarídeos (sacarose e maltose) e trissacarídeo maltotriose, fermentando-os na mesma ordem (IORIZZO et al., 2021).

Outro ponto a ser observado é o fato de que a levedura Kveik, por se tratar de uma classe de leveduras híbridas de *Saccharomyces cerevisiae*, pode indicar possuir as mesmas características de expressão dos principais genes transportadores de maltose através da membrana plasmática, bem como a hidrólise pela enzima α -glicosidase no citoplasma liberando moléculas de glicose que serão metabolizadas através da glicólise em etanol (ALVES JR. et al., 2013).

Em relação à produção de etanol, observa-se um valor de 20,07 g L⁻¹ e 20,36 g L⁻¹ para levedura imobilizada e livre, respectivamente, em 120 horas de fermentação. É relevante ressaltar que o etanol é o álcool mais importante na cerveja e desempenha diversas funções, como aumentar a viscosidade e tornar a espuma mais estável, além de ser o principal composto que afeta o sabor da cerveja e precursor necessário para certos ésteres (TANG; LI, 2017). No entanto, conforme aumento da concentração do mosto, as células de levedura são expostas ao estresse hiperosmótico do substrato durante a fase inicial da fermentação e forte estresse de etanol durante a fase de produção de etanol, que pode resultar em fermentação lenta ou estagnada por causa de danos à membrana celular (YANG et al., 2018).

Uma das principais características das leveduras Kveik é sua capacidade em tolerar níveis elevados de etanol, sendo superiores a leveduras *ale* padrão e capazes de dobrar de densidade durante o período de crescimento com etanol a 14% e 16%, como relatado no estudo de Preiss et al. (2018).

Como se sabe, além do etanol, existem outros metabólitos de importância no processo de produção de cerveja, como é o caso do glicerol. O limite favorável de glicerol na cerveja é de 10 g L⁻¹. Assim, os resultados mostram produção de glicerol dentro do limite, com valores de 1,90 g L⁻¹ para levedura imobilizada e 2,31 g L⁻¹ para levedura livre. Em relação à produção de glicerol pela levedura Kveik, Foster et al. (2021) observaram boa produção de glicerol por estas leveduras, principalmente nas primeiras 24 horas de fermentação, principalmente em razão do metabolismo do açúcar aumentado e a temperatura de fermentação mais elevada preferida dessas leveduras. Além disso, níveis ligeiramente mais elevados de glicerol produzidos em temperaturas mais altas podem sugerir uma elevada capacidade fermentativa das cepas Kveik, o que se considera uma grande vantagem.



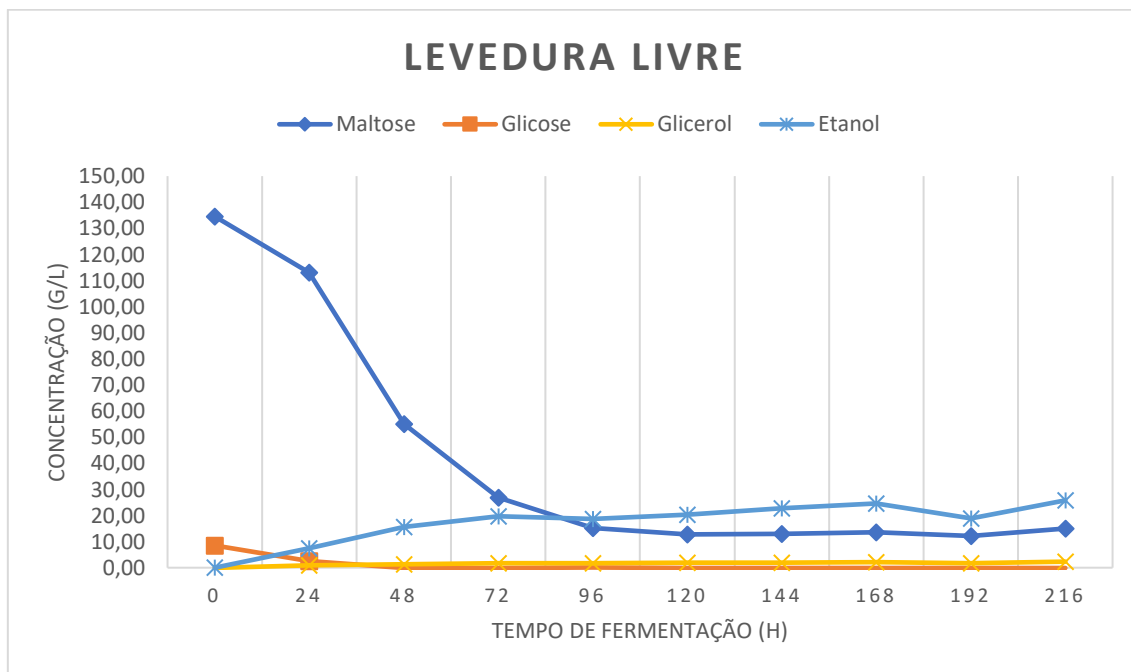


Figura 1: Cinética de fermentação em extrato de malte utilizando leveduras livres e imobilizadas durante 216 horas.

Além disso, as imagens capturadas pelo MEV demonstram a morfologia da superfície das esferas de alginato de cálcio, de modo que se observa que a superfície das esferas apresentam rugosidades e irregularidades, que podem ter sido ocasionadas durante a secagem das esferas. No entanto, as irregularidades não influenciam de modo negativo, visto que foi observado crescimento das células de leveduras dentro das esferas, possibilitando o desenvolvimento da fermentação, com produção relevante de etanol.

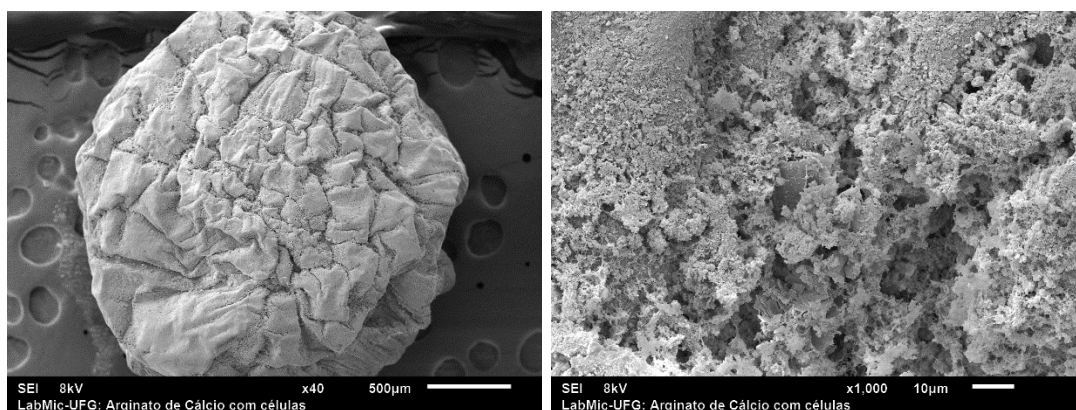


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura nas esferas de alginato de cálcio com ampliação de 40 e 1000x.

CONCLUSÃO

Pode-se observar com os resultados obtidos que a imobilização não afetou de maneira negativa a eficiência da levedura em fermentar o mosto cervejeiro, tendo havido consumo adequado dos açúcares fermentescíveis e concomitante produção de etanol tanto pela levedura livre quanto pelas células imobilizadas em gel de alginato de cálcio. Além disso, a caracterização das esferas por microscopia eletrônica de varredura demonstrou superfície de aspecto rugoso e irregular, mas que não interferiu na condução da fermentação.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. TOZETTO, L. M. et al. Production and physicochemical characterization of craft beer with ginger (*Zingiber officinale*). *Food Science and Technology*, v. 39, n. 4, p. 962–970, 2019.
2. STEWART, G. G.; RUSSELL, I.; ANSTRUTHER, A. An Overview of Brewing. *Handbook of Brewing*, chapter 3, 2017.
3. FOSTER, B. et al. Kveik brewing yeasts demonstrate wide flexibility in beer fermentation temperature and flavour metabolite production and exhibit enhanced trehalose accumulation. *bioRxiv*, p. 2021.07.26.453768, 2021.
4. KITS, D.; GARSHOL, L. M. Norwegian Kveik brewing yeasts are adapted to higher temperatures and produce fewer off-flavours under heat stress than commercial *Saccharomyces cerevisiae* American ale yeast. *bioRxiv*, p. 2021.06.15.448505, 2021.
5. PREISS, R. et al. Traditional Norwegian Kveik are a genetically distinct group of domesticated *Saccharomyces cerevisiae* brewing yeasts. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. SEP, 2018.
6. PINGULI, L. et al. A comparative study of free and immobilized brewing yeast fermentation performance based on kinetic parameters. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, v. 26, n. 4, p. 899–905, 2020.
7. MERLINO, V. M. et al. Innovation in craft beer packaging: Evaluation of consumer perception and acceptance. *AIMS Agriculture and Food*, v. 5, n. 3, p. 422–433, 2020.
8. BAIANO, A. Craft beer: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 20, n. 2, p. 1829–1856, 2021.
9. IORIZZO, M. et al. Role of yeasts in the brewing process: Tradition and innovation. *Processes*, v. 9, n. 5, p. 1–16, 2021.
10. ALVES JR., S. L.; THEVELEIN, J. M.; STAMBUK, B. U. Expression of *saccharomyces cerevisiae* a-glucoside transporters under different growth conditions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 31, n. 1, p. 1–8, 2014.
11. TANG, K.; LI, Q. Biochemistry of Wine and Beer Fermentation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*, p. 281–304, 2017.
12. YANG, H. et al. Improvement of Multiple-Stress Tolerance and Ethanol Production in Yeast during Very-High-Gravity Fermentation by Supplementation of Wheat-Gluten Hydrolysates and Their Ultrafiltration Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 39, p. 10233–10241, 2018.