AVALIAÇÃO DE UM EXTRATO RICO EM AMINOÁCIDOS OBTIDO DA AUTÓLISE DE LEVEDURAS DE CERVEJARIA COMO NUTRIENTE EM PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO

Isabela Maria Macedo Simon Sola (PIBIC/UEPG), Giuliane Sviercoski, Alessandro Nogueira (Orientador), e-mail: alessandronog@yahoo.com.br
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Engenharia de Alimentos.

Ciências agrarias: Ciência e tecnologia de alimentos

Palavras-chave: Nitrogênio; *S. cerevisiae*; aproveitamento de resíduo.

Resumo

A biomassa residual de leveduras descartada após o processo de fermentação alcoólica é gerada em grande quantidade pelas indústrias cervejeiras. Esta biomassa é rica em nitrogênio e em estudos prévios foi obtido um extrato de nitrogênio (em processo de depósito de patente). O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação do extrato nitrogenado em concentrações variando de zero a 200 mgN/L obtido da biomassa de leveduras na cinética de fermentação alcoólica (*Saccharomyces cerevisiae* RCH) em diferentes tipos de mosto (solução de glucose [120 g/L]; mosto de maçã artificial e mosto natural de maçã). No mosto natural de maçã foram testadas três diferentes cepas de *S. cerevisiae* (RCH, Aromatic e Bouquet). O extrato foi eficiente na fermentação alcoólica nos mostos de glucose e artificial de maçã, sendo que a melhor concentração foi de 150 mgN/L. A adição de 100 mgN/L do extrato no mosto de maçã aumentou a velocidade de fermentação (1,64 a 1,86 vezes) e a população máxima de leveduras (1,32 a 3,62 vezes) para as três cepas. Portanto, o extrato nitrogenado foi efetivo na melhoria dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica.

Introdução

A *Saccharomyces cerevisiae* têm um papel fundamental na indústria de bebidas alcoólicas. As leveduras passam de 10^6 UFC/mL (inóculo) a populações máximas de até 10^8 UFC/mL. A capacidade desta levedura em produzir etanol depende dos fatores de crescimento que consistem principalmente em nitrogênio (N) assimilável, oxigênio (O_2) dissolvido e vitaminas (tiamina). Estes fatores influenciam tanto o crescimento das leveduras quanto a taxa de produção de etanol e consequentemente afetam diretamente a cinética de fermentação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2017).

Após o término do processo de fermentação a biomassa de leveduras pode ser re-utilizada até 3 vezes antes de ser descartada. A indústria cervejeira produz e descarta toneladas de biomassa de levedura por ano (2,0 kg de biomassa de levedura úmida para cada mil litros de cerveja) (FERREIRA et al., 2010). Este resíduo contém de 40 a 60% de proteína que consiste em uma fonte de nitrogênio segura e barata (CHAE et al., 2001).

Em trabalhos prévios foi desenvolvido um processo tecnológico de obtenção de um extrato nitrogenado a partir da biomassa de leveduras da indústria da cerveja, para ser usado na correção nutricional de mostos. Este extrato encontra-se em processo de depósito de patente. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação deste extrato na cinética de fermentação alcoólica em solução de glucose, mosto artificial de maçã e mosto de maçã.

ISSN 1676-0093

Material e Métodos

Mostos*:* **[1]** o mosto de glucose consistiu em uma solução contendo 120 g/L. **[2]** o mosto artificial de maçã foi produzido segundo Santos *et al.* (2016). **[3]** o mosto de maçã foi produzido a partir de maçãs obtidas no comércio local, as quais foram selecionadas, lavadas, sanitizadas e trituradas em processador MET Visa, Tipo MPA (Brusque, Santa Catarina, Brasil), acondicionadas em telas de polipropileno, prensadas em Prensa hidráulica (Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brasil), à pressão de 3,0 kgf/cm^2 durante 5 minutos. Após a extração os mostos foram despectinizados (Pectinex 3XL Novozymes do Brasil) na concentração de 3,0 mL/hL durante 60 minutos a 40ºC (ALBERTI et al., 2011).

Fermentadores de 250 mL munidos de batoque: Para o mosto de maçã artificial e com o mosto de glucose foram adicionadas as concentrações de 0, 50, 75, 100, 150 e 200 mgN/L de extrato de nitrogênio. A levedura seca ativa (LSA) *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus* (Fermol Reims Champagne-RCH, França) foi adicionada a uma proporção de 0,2 g/L. Para o mosto de maçã foram adicionadas as concentrações de 0 e 100 mgN/L de extrato de nitrogênio. Este lote foi divido em 3, sendo que no primeiro foi inoculada a levedura seca ativa (LSA) *Saccharomyces cerevisiae* Fermol Reims Champagne, no segundo *S. cerevisiae* Fermol Aromatic e no terceiro *S. cerevisiae* Bouquet (AEB Group, Itália) a uma proporção de 0,2 g/L. Todas fermentações ocorreram a 21ºC em anaerobiose.

Análises*:* O processo fermentativo foi monitorado conforme Alberti et al. (2011). Os fermentados de maçã artificial e de glucose foram coletados após 18 dias de fermentação alcoólica. Os fermentados de maçã foram coletados nos dias 0, 1, 3, 6, 10 e 15 de fermentação, em seguida foi realizado a contagem de leveduras em câmara de Neubauer (XB-K-25, SMIC, China) (LEE et al., 1981). O teor alcoólico das amostras foi determinado por leitura em ebuliômetro. Os açúcares redutores totais por Somogyi- Nelson. A acidez total titulável segundo Tanner & Brunner (1985). O nitrogênio total e amoniacal foram quantificados segundo IAL (2008). As analises estatísticas ANOVA e Fischer LSD foram realizadas no programa Statistica 13.12 (StatiSoft Inc. Tulsa, OK, EUA).

Resultados e Discussão

No experimento com mosto de glucose, pode ser observado que a velocidade máxima aumentou com o aumento da concentração de nitrogênio adicionado, sendo que na concentração de 150 mgN/L os açúcares foram totalmente exauridos do meio com a produção de 5,6ºGL, indicando a máxima eficiência do extrato nesta condição de mosto (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros cinéticos e físico-químicos do mosto de glucose (120 g/L, 18 dias de fermentação).

Concentração de extrato (mgN/L)	Concentração de nitrogênio Inicial (mg/L)	NTKf (mg/L)	CO2 liberado (g/L)	Vmáx (gCO2/L/d)	Tempo de Vmáx (d)	ART (g/L)	Etanol (°GL)	pH	Acidez (g/100mL)
0	11,00 ± 1,73	11,00^{e} ± 1,73	2,6^{e}	nd	nd	8,65^{a} ± 0,01	0,40^{f} ± 0,10	3,36^{a} ± 0,01	0,03^{d} ± 0,01
50	43,00 ± 1,73	29,00^{d} ± 1,73	20,3^{d}	nd	nd	8,71^{a} ± 0,01	0,97^{e} ± 0,06	3,18^{d} ± 0,01	0,08^{c} ± 0,01
75	61,00 ± 2,99	38,00^{c} ± 4,58	32,1^{c}	1,9^{d}	1^{a}	4,73^{c} ± 0,01	2,13^{d} ± 0,23	3,33^{b} ± 0,01	0,10^{b} ± 0,01
100	86,00 ± 1,73	39,00^{c} ± 3,00	32,2^{c}	2,6^{c}	1^{a}	5,08^{b} ± 0,01	2,73^{c} ± 0,15	2,95^{f} ± 0,01	0,15^{a} ± 0,01
125	105,00 ± 1,73	48,00^{b} ± 3,00	62,8^{b}	4,7^{b}	0,1^{b}	1,26^{d} ± 0,01	4,97^{b} ± 0,06	3,12^{e} ± 0,01	0,14^{a} ± 0,01
150	132,00 ± 5,99	51,00^{a} ± 3,00	68,3^{a}	6,6^{a}	0,1^{b}	0,21^{e} ±0,01	5,60^{a} ± 0,10	3,25^{c} ±0,01	0,14^{a} ±0,01

Nota: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05). mgN/L = miligramas de nitrogênio por litro de mosto; NTKf= nitrogênio total Kjedahl ao final da fermentação; Vmáx= velocidade máxima de fermentação; ART= açúcares redutores totais; nd= não detectado.

O segundo experimento realizado em mosto artificial de maçã, as concentrações entre 100 a 150 mgN/L não apresentaram diferença significativa no consumo dos açúcares e na produção de etanol (Tabela 2). Entretanto, a maior velocidade de fermentação foi observada com 150 mgN/L, o que resulta em ganho de tempo do processo.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos e físico-químicos do mosto sintético de maçã após 18 dias de fermentação.

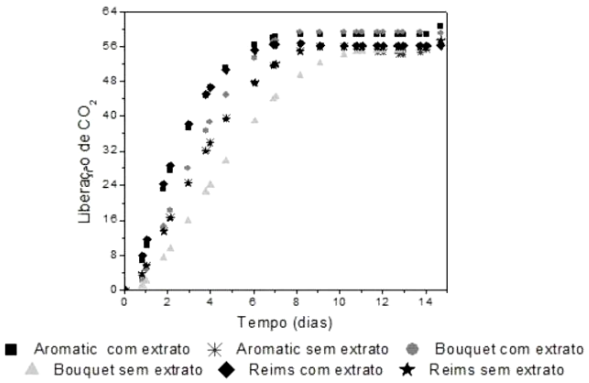
Concentração de extrato (mgN/L)	Concentração de nitrogênio Inicial (mg/L)	NTKf (mg/L)	CO2 liberado (g/L)	Vmáx (gCO2/L/d)	Tempo de Vmáx (d)	ART (g/L)	Etanol (°GL)	pH	Acidez (g/100mL)
0	18,00 ± 0,0	15,00^{e} ± 0,0	12	nd	nd	10,40^{a} ± 0,27	1,03^{d} ± 0,15	3,18^{a} ± 0,01	0,13^{d} ± 0,01
50	52,00 ± 6,24	23,00^{c} ± 1,73	59,7	3,9	1,5	0,53^{b} ± 0,04	5,23^{c} ± 0,21	2,99^{b} ± 0,01	0,20^{b} ± 0,01
75	72,00 ± 3,00	18,00^{d} ± 0,00	70,8	6,1	1	0,55^{b} ± 0,01	6,00^{b} ± 0,17	3,02^{c} ± 0,01	0,19^{c} ± 0,01
100	91,00 ± 3,46	28,00^{b} ± 3,46	71	7,6	1	0,11^{c} ± 0,01	6,47^{a} ± 0,15	3,07^{d} ± 0,01	0,20^{b} ± 0,01
125	112,00 ± 4,58	28,00^{b} ± 1,73	69,6	9,9	1	0,07^{c} ± 0,01	6,37^{a} ± 0,12	3,12^{e} ± 0,01	0,20^{b} ± 0,01
150	140,00 ± 4,58	40,00^{a} ± 4,58	70,6	13,1	0,1	0,07^{c} ±0,01	6,27^{ab} ±0,15	3,18^{a} ±0,01	0,21^{a} ±0,01

Nota: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05). mgN/L = miligramas de nitrogênio por litro de mosto; NTKf= nitrogênio total Kjedahl ao final da fermentação; Vmáx= velocidade máxima de fermentação; ART= açúcares redutores totais; nd= não detectado.

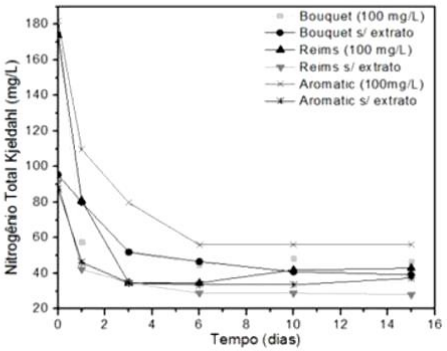
No mosto de maçã, foram testadas três diferentes cepas de leveduras e o extrato foi fixado em 100mN/L. As leveduras adicionadas de extrato Reims e Aromatic alcançaram uma velocidade de 18,5 e 18,3 gCO_2/L/dia respectivamente, seguida da Bouquet com 12,7 gCO_2/L/dia (Figura 1a). O consumo maior de nitrogênio em relação ao controle indica uma carência do nutriente no mosto (Figura 1b).

Figura 1. Liberação de gás carbônico e consumo de nitrogênio em fermentados de maçã produzidas com diferentes cepas de leveduras na presença e ausência de extrato (100 mgN/L).

a)



b)



A adição de 100 mgN/L do extrato no mosto de maçã aumentou a velocidade de fermentação (1,64 a 1,86 vezes) e a população máxima de leveduras (1,32 a 3,62 vezes) para as três cepas (Tabela 3).

Tabela 3. Valores referentes aos parâmetros cinéticos de fermentação dos fermentados de maçã na ausência e presença de extrato (100 mgN/L).

Parâmetros cinéticos	Ausência de extrato			Presença de extrato (100mg/L)		
	Bouquet	Aromatic	Reims Champagne	Bouquet	Aromatic	Reims Champagne
CO2 liberado (g/L)	57,2	57,3	57,7	59,3	61	56,1
Vmáx (gCO2/L/d)	7,9	10,2	9,9	13	18,3	18,5
Tempo de Vmáx (d)	3	0,5	1	1	0,5	0,5
População máxima (10^6) UFC/mL	8,8	9,5	19,8	31,9	12,6	35,1

No consumo de açúcares, observa-se que no 6º dia de fermentação não se detectou açúcares residuais (dados não apresentados). Em relação ao teor de álcool, nota-se que os fermentados de maçã com adição de extrato nitrogenado, proporcionaram maiores teores (dados não apresentados). As cepas Aromatic e Reims adicionadas de extrato, tiveram um aumento percentual de cerca de 9,5% em etanol comparada com as mesmas cepas sem adição de extrato (dados não apresentados). Os teores de acidez e os valores de pH não foram influenciados pela adição do extrato nitrogenado (dados não apresentados).

O enriquecimento do mosto com nitrogênio se torna fundamental para a cinética de fermentação alcoólica, diminuindo o tempo do processo e melhorando o rendimento na produção de etanol.

Conclusão

A adição de extrato nos três tipos de mostos estudados foi efetiva na melhoria de parâmetros cinéticos. Portanto, o extrato nitrogenado obtido da biomassa de leveduras pode ser um importante aditivo para correção nutricional de mostos antes da fermentação alcoólica.

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária pela bolsa concedida e a UEPG pelo suporte laboratorial para a realização desse trabalho.

Referências

ALBERTI, A., VIEIRA, R. G., DRILLEAU, J. F., WOSIACKI, G., NOGUEIRA, A. Apple wine processing with different nitrogen contents. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 3, p. 551-558, 2011.

CHAE, H.J.; JOO, H.; IN, M.J. Utilization of brewer's yeast cells of the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 253-258, 2001.

FERREIRA, IMPLVO et al. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 2, p. 7784, 2010.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físicos e químicos para análise de alimentos**, 4 ed, Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, 2008.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, n. 11, 1981, p. 641-649.

RIBERÉAU GAYON, P; DUBOURDIEU, D; DONÈCHE, B; LOUVAUD, A. **Traité d'oenologie:** Microbiologie du vin; Vinifivotions. 7. ed. La Vigne: Dunod, 2017. 736 p.

SANTOS, C. M. E. D.; ALBERTI, A.; PIETROWSKI, G. D. A. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; JORGE, R. M. M. Supplementation of amino acids in apple must for the standardization of volatile compounds in ciders. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 2, p. 334-341, 2016.

TANNER, H.; BRUNNER, H. R. **Getränke anlytik: untersuchungsmethode für dia labo**r: und betriebspraxis. Wädesnwill: Verlag Helles, 1985. 206 p.