

**AUTORES**  
AUTHORS

✉ **Giuliano DRAGONE\***  
**Solange Inês MUSSATTO**  
**João Batista de ALMEIDA e SILVA**

Faculdade de Engenharia Química de Lorena,  
Departamento de Biotecnologia  
Rodovia Itajubá-Lorena km 74,5,  
CEP: 12600-970, Lorena-SP, Brasil

\*Author for correspondence:  
Tel.: +55 12 3159 5107; fax: +55 12 3153 3165  
\*e-mail: gdragone@debiq.faqnquil.br

**RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue estudiar la fermentación continua de cerveza con levaduras cerveceras inmovilizadas en bagazo de malta (principal subproducto del proceso de producción de cervezas). Los mostos utilizados tenían densidades originales de 11,3°P y 7,5°P (obtenido por la dilución del mosto de 11,3°P con agua destilada) y la levadura era una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (tipo lager). El experimento fue realizado a 15°C en un reactor airlift de circulación interna con un volumen total de trabajo de 3,7 L. Los resultados mostraron que el desempeño óptimo de la fermentación en el biorreactor de células inmovilizadas fue alcanzado con un tiempo de residencia de 25 h (tasa de dilución: 0,04 h<sup>-1</sup>) con el mosto de 11,3°P y fue caracterizado por la cerveza con un extracto aparente y concentración de etanol de 2,56°P y 4,62% v/v, respectivamente. Observaciones microscópicas revelaron que la adhesión de las células de levadura en la superficie en las partículas planas del soporte ocurrió en múltiples capas y resultó en una carga máxima de células de 0,37 g células secas/g soporte seco.

**SUMMARY**

The aim of this work was to study the continuous beer fermentation with brewing yeast immobilized on spent grains (main brewing by-product). The used worts had original gravities of 11,3°P and 7,5°P (obtained by diluting the 11,3°P wort with distilled water) and the employed yeast was an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* (lager type). The experiment was carried out at 15°C in an internal-loop airlift reactor with a total working volume of 3,7 L. Results showed that the optimum fermentation performance of the immobilized cell bioreactor was achieved at a residence time of 25 h (dilution rate 0,04 h<sup>-1</sup>) with the 11,3°P wort, and was characterized by a beer with an apparent extract and ethanol concentration of 2,56°P and 4,62% v/v, respectively. Microscopic observations revealed that the yeast adhesion to the surface of the plain sheet-like carrier particles occurred in multiple layers and resulted in a maximum cell load of 0,37 g dry cell/g dry carrier.

**PALABRAS CLAVE**  
KEY WORDS

bagazo de malta; cerveza; fermentación;  
inmovilización; levaduras /  
spent grains; beer; fermentation; immobilization; yeast

## 1. INTRODUCCION

El uso de células inmovilizadas en procesos continuos para la producción de bebidas fermentadas representa una línea de investigación de elevado interés debido a las ventajas económicas y técnicas que presenta en comparación a los sistemas discontinuos con células libres. En ese sentido, los procesos que utilizan levaduras de cerveza inmovilizadas, proporcionan la oportunidad de superar los largos tiempos de fermentación y maduración encontrados en las industrias cerveceras tradicionales (DEBOURG, 1993). Básicamente existen dos métodos prácticos disponibles para alcanzar una apropiada inmovilización de levaduras: el aprisionamiento de las células en una matriz o la adsorción en la superficie de un soporte (PAJUNEN, 1996). Según DEBOURG (1993), la adsorción de células en superficies sólidas constituye actualmente el método más utilizado para la inmovilización de levaduras cerveceras. Ese método permite reducir los problemas de transferencia de masa asociados a otros sistemas de inmovilización, debido a que las células inmovilizadas en los soportes se encuentran en contacto directo con los sustratos del medio líquido.

Ejemplos típicos de soportes que han sido satisfactoriamente utilizados para la inmovilización de diferentes especies de *Saccharomyces*, incluyen: virutas de madera, tierra de diatomácea, rocas volcánicas, cerámicas, acero inoxidable, vidrio poroso, dietilaminoetil-celulosa, cubos de poliuretano, sílica porosa y matrices de células de plantas (MASSCHELEIN et al., 1994).

Estudios recientes (BRÁNYIK et al., 2001; 2002) demostraron que el bagazo de malta (principal subproducto de la industria cervecería) puede ser utilizado como soporte de inmovilización de levaduras debido a que presenta una elevada capacidad de adsorción de células, es estable, permite ser regenerado, esterilizado y preparado de manera simple, y es posible encontrarlo en grandes cantidades y a un bajo costo. El bagazo de malta es considerado un material lignocelulósico rico en proteínas y fibras, que representan cerca de 20% y 70% de su composición, respectivamente. La principal fracción de sus fibras está compuesta de arabinoxilanas (hasta 50% del total de fibras), seguidas de lignina (macromolécula polifenólica) y celulosa (homopolímero lineal de unidades de glucosa) (HERNÁNDEZ et al., 1999). De acuerdo con MUSSATTO et al. (2005), en el año 2002, las cervecerías brasileñas generaron cerca de 1,7 millones de toneladas de bagazo de malta, siendo su principal uso como ración animal.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el bagazo de malta como soporte de inmovilización de la levadura cervicera *Saccharomyces cerevisiae* tipo lager durante la fermentación continua de cerveza en un reactor airlift.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Preparación del mosto cervicero

El mosto cervicero original con una concentración de extracto igual a 11,3°P utilizado durante la fermentación continua, fue preparado de acuerdo con DRAGONE (2002) en

la Microcervicería del Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de Lorena. El mosto diluido con concentración de extracto igual a 7,5°P fue preparado diluyendo el mosto original con agua destilada.

### 2.2. Microorganismo y cultivo del inóculo

La levadura cervicera *Saccharomyces cerevisiae* tipo lager fue cultivada en 500 mL de medio sintético y condiciones aeróbicas, en un agitador de movimiento rotacional a 200 rpm, 30°C durante 30 h. El medio sintético presentó la siguiente composición (en g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,4; extracto de levadura, 1,0; adjunto con alta concentración de maltosa (MOR-REX 1557), 80. De acuerdo con el fabricante, el adjunto MOR-REX 1557 posee la siguiente composición de azúcares: dextrosas, máx 12%, maltosa, mín 42%, maltotriosa, mín 10% y dextrinas, máx 28%.

### 2.3. Preparación del soporte

El bagazo de malta seco (90 g, 10% de humedad) fue tratado con 1,5 L de solución de NaOH 2% (p/v), manteniéndolo en agitación (120 rpm) a 30°C por 24 h. Posteriormente, fue lavado con agua hasta pH neutro, secado en estufa a 50°C, molido y tamizado. Fueron seleccionadas las partículas que pasaron en el tamiz de 16 mesh (abertura de 1,0 mm) y que quedaron retenidas en el tamiz de 28 mesh (abertura de 0,6 mm).

### 2.4. Condiciones de la fermentación continua

Los ensayos fueron realizados en un reactor airlift cilíndrico de tubos concéntricos con un volumen de trabajo de 3,7 L (volumen total: 7 L). La aeración fue efectuada con aire filtrado (0,8 1,0 L/min) a través de un tubo de 1 mm de diámetro. La temperatura del medio de fermentación fue mantenida constante a 15°C, colocando el reactor dentro de una incubadora refrigerada.

### 2.5. Métodos analíticos

La concentración de células inmovilizadas en el soporte fue determinada de acuerdo con BRÁNYIK et al. (2002). Las células libres en suspensión (no inmovilizadas) fueron determinadas por peso seco a 105°C. Las concentraciones de extracto en el mosto (°P) y de etanol (% v/v) fueron medidas en un equipo específico para análisis de cervezas (Beer Analyser 2, ANTON-PAAR, Austria). Fotomicrografías de las partículas de bagazo de malta con las levaduras inmovilizadas fueron realizadas en microscopio electrónico de barrido (LEO 1450VP).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante las primeras 26 h, el experimento fue realizado en régimen discontinuo y usando medio sintético con la misma composición a la utilizada durante la preparación del inóculo. En ese intervalo de tiempo, la levadura alcanzó su fase de crecimiento exponencial, caracterizado por un acentuado

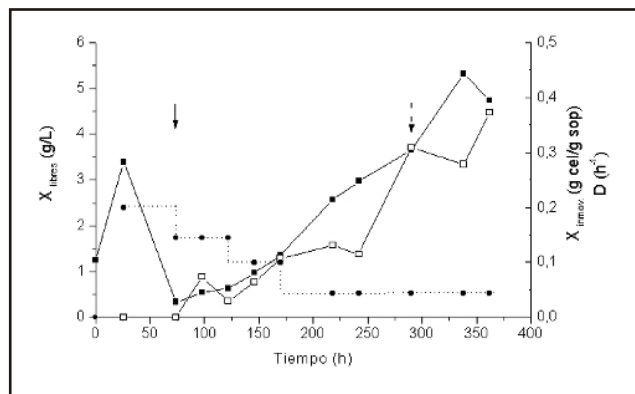
aumento de biomasa, que pasó de 1,25 g/L para 3,39 g/L. Posteriormente, el reactor fue alimentado continuamente con una tasa de dilución (D) igual a 0,2 h<sup>-1</sup>. De acuerdo con BRÁNYIK et al. (2004a), valores de D inferiores a 0,2 h<sup>-1</sup> demoran significativamente el proceso de inmovilización.

Estudios anteriores (BRÁNYIK et al. 2002) también demostraron que la velocidad de unión de las levaduras en el bagazo de malta durante la alimentación continua con medio sintético resulta superior a la obtenida durante la alimentación continua con mosto cervecero. Ese fenómeno puede ser explicado por la alta competición entre las células y las proteínas del mosto por los sitios de adhesión en la superficie del soporte. Las proteínas del mosto adsorbidas forman una camada hidrofílica en los sitios de interacción de las células que debilitan la adhesión de las levaduras. Por ese motivo, entre las 26 y 74 h de fermentación, la alimentación continua del reactor fue realizada con medio sintético.

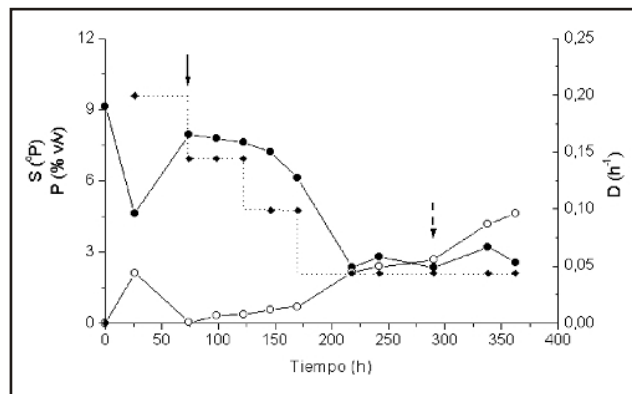
En la Figura 1 se observa que durante la aplicación de la tasa de dilución de 0,2 h<sup>-1</sup> no fue posible obtener una espontánea adhesión de las células en la superficie del soporte. Además, el reactor operó en condiciones cercanas a las de lavado ("wash out") debido a la disminución en la concentración de células libres en suspensión que pasó de 3,39 g/L para 0,33 g/L en el tiempo de 74 h. Esos resultados llevaron a que se trabajara con tasas de dilución inferiores a 0,2 h<sup>-1</sup>. A partir de las 98 h de fermentación, y alimentando continuamente con mosto diluido (7,5°P) y D igual a 0,14 h<sup>-1</sup>, se observó el comienzo de la inmovilización de las levaduras cerveceras en el bagazo de malta. La concentración de células inmovilizadas (X<sub>inmov</sub>) fue aumentando progresivamente, a medida que se utilizaron tasas de dilución menores a 0,14 h<sup>-1</sup> (0,10 h<sup>-1</sup> y 0,04 h<sup>-1</sup>). El mayor valor de X<sub>inmov</sub> fue de 0,31 g cel/g sop, obtenido a las 290 h de fermentación y alimentación continua de mosto diluido (7,5°P) con D igual a 0,04 h<sup>-1</sup>.

En esa condición de fermentación se obtuvo una concentración de extracto de 2,35°P y una concentración de etanol de 2,67% v/v (Figura 2). A partir del tiempo de 290 h, el

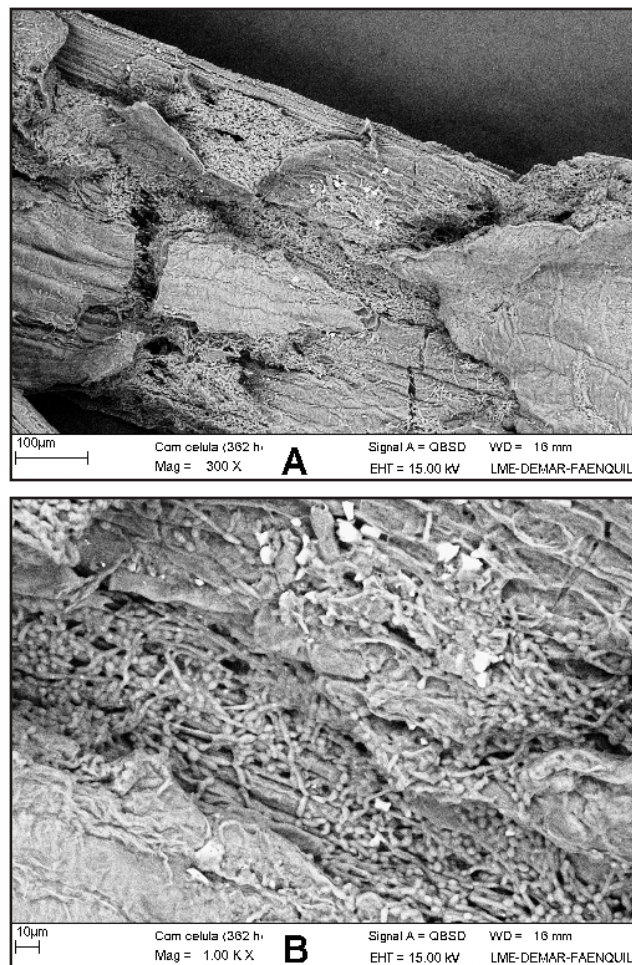
**Figura 1** Concentración de células libres e inmovilizadas durante la fermentación continua de cerveza. X<sub>libres</sub> = células libres (-|-); X<sub>inmov</sub> = biomasa inmovilizada (-?-); D = tasa de dilución (..?..); = cambio de medio sintético para mosto diluido; = cambio de mosto diluido para mosto original.



**Figura 2** Fermentación continua de cerveza en reactor airlift. S = concentración de extracto en el mosto (-?-); P = concentración de etanol (-?-); D = tasa de dilución (..?..); = cambio de medio sintético para mosto diluido; = cambio de mosto diluido para mosto original.



**Figura 3** Fotomicrografías (MEB) de partículas de bagazo de malta con Xinmov = 0,37 g cel/g sop. A) Aumento 300x, B) Aumento 1000x.



mosto diluido que alimentaba continuamente el reactor fue sustituido por mosto con una concentración de extracto de 11,3°P, manteniéndose la tasa de dilución en 0,04 h<sup>-1</sup>. Para esas nuevas condiciones, a las 362 h de fermentación, la concentración de levaduras inmovilizadas alcanzó un máximo de 0,37 g cel/g sop (Figura 1) y concentraciones de extracto y etanol de 2,56°P y 4,62% v/v, respectivamente (Figura 2).

La máxima concentración de etanol obtenida en este trabajo resultó mayor que la relatada por BRÁNYIK et al. (2002) (4,2% v/v), cuando utilizó durante la fermentación continua con levaduras de cerveza inmovilizadas en bagazo de malta, mosto con 13°P y D igual a 0,04 h<sup>-1</sup>.

Observaciones realizadas en microscopio electrónico de barrido (MEB) revelaron una distribución heterogénea de las células en la superficie del soporte, con acumulaciones locales de biomasa que confirman la existencia de sitios preferenciales de unión (Figura 3).

De acuerdo con BRÁNYIK et al. (2002), el contacto entre la superficie del bagazo de malta con la superficie de las levaduras, resulta en interacciones espontáneas y energéticamente favorables, que llevan a la adhesión estable de las células. La acumulación de las levaduras en el bagazo de malta es también sustentada por las asperezas de la superficie del soporte, la cual sirve como protección de las células contra las fuerzas de fricción ejercidas por la turbulencia en el reactor. Las levaduras cerveceras son retenidas mecánicamente dentro de zonas de resguardo (fisuras, poros, fibras entrelazadas) en la superficie de las partículas del bagazo de malta, donde pueden también multiplicarse (BRÁNYIK et al., 2004b).

#### 4. CONCLUSIONES

El presente trabajo demostró que fue posible inmovilizar la cepa industrial de *S. cerevisiae* (tipo lager) utilizando el bagazo de malta como soporte natural para la fermentación continua de cerveza en un reactor airlift.

#### 5. REFERENCIAS

BRÁNYIK, T., VICENTE, A.A., CRUZ, J.M.M., TEIXEIRA, J.A. Spent grains a new support for brewing yeast immobilisation. *Biotechnology Letters*, v.23, p.1073-1078, 2001.

BRÁNYIK, T., VICENTE, A., CRUZ, J.M., TEIXEIRA, J. Continuous primary beer fermentation with brewing yeast immobilized on spent grains. *Journal of the Institute of Brewing*, v.108, p.410-415, 2002.

BRÁNYIK, T., VICENTE, A.A., CRUZ, J.M.M., TEIXEIRA, J.A. Continuous primary fermentation of beer with yeast immobilized on spent grains The effect of operational conditions. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v.62, p.29-34, 2004a.

BRÁNYIK, T., VICENTE, A., OLIVEIRA, R., TEIXEIRA, J. Physicochemical surface properties of brewing yeast

influencing their immobilization onto spent grains in a continuous reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v.88, p.84-93, 2004b.

DEBOURG, A. The developments of brewery fermentations. The impact of new technologies. *Cerevisia and Biotechnology*, v.18, p.25-30, 1993.

DRAGONE, G. Estudo cinético do processo fermentativo de produção de cervejas em mostos concentrados. *Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL*, 2002, 111p.

HERNÁNDEZ, A.M., RODRÍGUEZ, J.L., LÓPEZ, B., ZERQUERA, O.L. Caracterización química y funcional del afrecho de malta. *Alimentaria*, may, p.105-107, 1999.

MASSCHELEIN, C.A., RYDER, D.S., SIMON, J.P. Immobilized Cell Technology in beer production. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.14, p.155-177, 1994.

MUSSATTO, S.I., DRAGONE, G., ROBERTO, I.C. Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 2005, in press.

PAJUNEN, E. The behaviour of immobilized yeast cells. *Cerevisia: Belgian Journal of Brewing and Biotechnology*, v.4, p.33-37, 1996.

#### 6. AGRADECIMIENTOS

Capes, Corn Products Brasil, Malteria do Vale y Departamento de Ingeniería de Materiales (DEMAR / FAENQUIL).