UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

Carolaine da Silva Gomes

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FERMENTATIVA DE UMA CEPA DE LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* NO PROCESSO DE REAPROVEITAMENTO DO FERMENTO CERVEJEIRO

Porto Alegre

2022

Carolaine da Silva Gomes

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FERMENTATIVA DE UMA CEPA DE LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* NO PROCESSO DE REAPROVEITAMENTO DO FERMENTO CERVEJEIRO

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Departamento de Nutrição da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do grau de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Garavaglia.

Porto Alegre

2022

Catalogação na Publicação

SIlva Gomes, Carolaine da
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FERMENTATIVA DE UMA CEPA DE LEVEDURA Saccharomyces cerevisiae NO PROCESSO DE REAPROVEITAMENTO DO FERMENTO CERVEJEIRO / Carolaine da SIlva Gomes. -- 2022.
69 p. : il., tab. ; 30 cm.

Monografia (trabalho de conclusão de curso) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Curso de Tecnologia em Alimentos, 2022.

Orientador(a): Juliano Garavaglia.

1. Cerveja. 2. Fermentação. 3. Levedura.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Carolaine da Silva Gomes

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FERMENTATIVA DE UMA CEPA DE LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* NO PROCESSO DE REAPROVEITAMENTO DO FERMENTO CERVEJEIRO

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Departamento de Nutrição da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do grau de Tecnólogo em Alimentos.

Aprovado em: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Juliano Garavaglia.

Instituição: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

_____

Profª. Dra. Poliana Deyse Gurak

Instituição: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

_____

Bárbara Iegli Tech

Instituição: Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS)

“A piada corrente na sala de fermentação é que, no fundo, nós é que trabalhamos para a levedura.”

Garret Oliver

RESUMO

A produção mundial de cerveja tem aumentado nos últimos anos e a cerveja artesanal ganha cada vez mais espaço nesse cenário. A preocupação na qualidade do produto de cervejarias artesanais se dá não somente com o malte e lúpulo, mas também com o ingrediente que mais contribui para a transformação do mosto em uma cerveja de qualidade, a levedura cervejeira. Além de converter açúcar em etanol e gás carbônico em anaerobiose (processo de fermentação), a levedura também possui a capacidade de multiplicar sua biomassa através da via aeróbia, podendo ser mantida e reutilizada, se nas condições ideais, em diversos ciclos de fermentação da cerveja, sendo um fator importante devido à preocupação das empresas com questões ambientais e custo de produção. Recomenda-se que a reutilização de fermento não ultrapasse 5 ciclos de reutilização, com viabilidade celular a partir de 90%, porém, mantendo a levedura em condições favoráveis fisiologicamente, possa-se reutilizar por mais ciclos o mesmo fermento. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade fermentativa de uma levedura no processo de reutilização do fermento cervejeiro, a partir da avaliação de viabilidade celular após o reaproveitamento das células viáveis de levedura e suas condições de reuso em escala industrial de uma cervejaria artesanal, que utiliza seu fermento por até 10 ciclos de utilização/fermentação. Como resultados tem-se o alcance dos objetivos, visto que foram acompanhados os 10 ciclos de reutilização, podendo concluir que a levedura se manteve apta a reutilização até o último ciclo (10° ciclo), porém há a necessidade de desenvolvimento e aprofundamento de novos métodos de análise da levedura para completa verificação da qualidade do fermento.

Palavras-chave: Cerveja; Fermentação; Levedura.

ABSTRACT

The world production of craft beer has been grows large in recent years and the concern with the quality of the product occurs not only with malted and hops, but with brewe's yeast. Besides converting sugar into ethanol and carbon dioxide in anaerobiosis, yeast also has the ability to multiply its biomass aerobically, and can be maintained and reused in several beer fermentation cycles. The yeast reuse shold not exceed 5 cycles, with cell viability at 90%. However, by keeping the yeast in physiologically favorable conditions, it can be reused for more cycle. The goal was evaluate the fermentative activity of a yeast in the process of reuse of brewer's yeast. This evaluation ocurred from cell viability after the reuse conditions in na industrial scale of a craft brewery, which uses its yeast for up to 10 cycles. As a result, we can conclude that the yeast remained suitable for reuse until the last cycle (10th cycle). Nonetheless, more melthods of yeast analysis for complete verification of yeast quality are needed.

Keywords: Beer; Fermentation; Yeast.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5
2.1 A Cerveja 5
2.1.1 O mercado brasileiro de cerveja 6
2.1.2 A cerveja artesanal 7
2.1.4 Matérias primas para a produção de cerveja artesanal 8
2.1.4.1 Água 8
2.1.4.2 Malte 8
2.1.4.2 Lúpulo 10
2.1.3 A produção da cerveja 11
2.1.5.1 Malteação da cevada 13
2.1.5.2 Moagem do malte 14
2.1.5.3 Mostura 15
2.1.5.4 Clarificação e filtração 16
2.1.5.5 Fervura 16
2.1.5.6 Whirlpool 16
2.2 A Fermentação 17
2.3 A Levedura 18
2.3.1 Metabolismo da levedura 20
2.3.2 *Saccharomyces cerevisae* 23
2.3.3 *Saccharomyces pastorius* 24
2.3.4 Condições ideais para a levedura 25
2.3.5 Propagação da levedura 27
2.3.6 Reutilização da levedura 28
3 OBJETIVO 30
3.1 Objetivo principal 30
3.2 Objetivos específicos 30
4 METODOLOGIA 31
4.1 Materiais e condições do método 31
4.2 Coleta de amostra estéril 31
4.2.1 Coleta do fermento 31
4.2.2 Coleta do mosto 32

4.3 Métodos de análise.....33
4.3.1 Viabilidade celular.....33
4.3.2 Fermentação forçada.....35
4.3.3 Análise microbiológica.....37
4.3.3.1 Plaqueamento da lama.....37
4.3.3.1 Plaqueamento do mosto.....38
4.3.4 Monitoramento do tanque fermentador.....40
5 RESULTADOS.....41
5.1 Parâmetros de atividade fermentativa da levedura.....41
5.1.1 Viabilidade Celular.....41
5.1.2 Fermentação forçada.....42
5.1.3 Controle microbiológico.....44
5.2 Parâmetros acompanhados no período de fermentação.....45
5.2.1 Condições de fermentação.....47
5.2.2 Tempo de fermentação.....47
5.2.3 Atenuação do extrato aparente.....48
5.3 Análise comparativa de resultados.....49
6 CONCLUSÃO.....50
7 REFERÊNCIAS.....51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O texto da Lei de Pureza Alemã 6
Figura 2: Total de estabelecimentos registrados.....7
Figura 3: Malte de cevada germinado 9
Figura 4: Lúpulo 10
Figura 5: Processo produtivo da cerveja 12
Figura 6: Aroma e sabor do malte Weyermann.....13
Figura 7: Moinho de 4 rolos.....14
Figura 8: Faixas de atuação das enzimas durante o processo de mosturação.....16
Figura 9: Composição de açucares do mosto 17
Figura 10: Processo de fermentação alcoólica.....18
Figura 11: Vias metabólicas da levedura 20
Figura 12: Fases do processo fermentativo 21
Figura 13: Gráfico da fermentação alcoólica.....22
Figura 14: Principais contaminantes do mosto e cerveja 26
Figura 15: Gráfico de fases da levedura 29
Figura 16: Coleta estéril de lama.....32
Figura 17: Coleta estéril do mosto.....33
Figura 18: Diluição da amostra.....34
Figura 19: Coloração e contagem da amostra 34
Figura 20: Contagem de células pelo microscópio.....35
Figura 21: Teste de fermentação forçada 36
Figura 22: Esquema de diluição e plaqueamento de lama.....37
Figura 23: Plaqueamento da lama 38
Figura 24: Plaqueamento do mosto 39

Figura 25: Mosto em tubo duran 40

Figura 26: Viabilidade celular da levedura S. pastorius em relação aos ciclos de reutilização do fermento. 42

Figura 27: Extrato aparente da fermentação forçada, em relação aos ciclos de reutilização do fermento. 44

Figura 28: Tempo de fermentação em relação aos ciclos de reutilização do fermento. 47

Figura 29: Atenuação do extrato aparente em relação aos ciclos de reutilização do fermento. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do grão de cevada e do malte. 9

Tabela 2: Parâmetros testados para a levedura.....41

Tabela 3: Parâmetros testados durante a fermentação 46

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Cálculo de *pitching rate* 28

Equação 2: Viabilidade celular 35

1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de cerveja tem aumentado nos últimos anos. Neste mercado, o Brasil representa o terceiro maior produtor de cerveja do mundo e a indústria cervejeira gera mais de 21 bilhões de reais, representando 1,6% do PIB nacional (CERVBRASIL, 2018). Além disso, a cerveja artesanal ganha cada vez mais espaço nesse cenário, apresentando um crescimento exponencial nos últimos anos. Somente entre os anos de 2018 e 2020, houve um aumento de 30% no número de cervejarias artesanais registradas (MAPA, 2020) e em relação à essa porcentagem houve um aumento de 12% no ano de 2021 (SINDICERV, 2022).

A participação das cervejarias neste mercado só é possível se a preocupação com a qualidade do seu produto final englobar-se às matérias primas como um todo: água, malte e lúpulo, além de um dos ingredientes mais importantes para a transformação do mosto em uma cerveja de qualidade, a levedura (KLEY, 2022).

A levedura possui a habilidade de metabolizar os componentes do mosto cervejeiro, rico em açúcares fermentescíveis, transformando-os em etanol e gás carbônico a fim de produzir uma cerveja com qualidade e estabilidade sensorial satisfatória (CARVALHO et al., 2006).

Além de converter açúcar em etanol e gás carbônico, a levedura produz outros componentes, incluindo ésteres, álcoois superiores, cetonas, fenóis e ácidos graxos. Ésteres são moléculas que possuem distintas notas aromáticas e são responsáveis pelas notas frutadas na cerveja, enquanto os fenóis dão notas aromáticas de especiarias (PICCINI, 2002).

Cada vez mais há uma crescente preocupação das empresas no que se refere à responsabilidade ambiental, pelo fato da indústria cervejeira gerar grande quantidade de resíduos ao longo do processo. Ao final da etapa de fermentação, o fermento residual é descartado, possuindo um alto potencial poluidor, devido a fatores como carga orgânica e teor de sólidos.

As cervejarias têm como limitante do processo tanto a viabilidade do fermento reutilizado, estando hábil para uso a partir de 90%, quanto o número de reutilizações no processo. Se recomenda que a reutilização de fermento não ultrapasse 5 ciclos de reutilização, o que acarreta o descarte e destinação à ração animal uma alta quantidade de leveduras em pleno vigor e totalmente viáveis (SAITO, 2007). Esses

resíduos, porém, se destacam pela sua grande capacidade de reaproveitamento, onde a levedura muitas vezes se mantém viável para reutilização entre 5 a 9 vezes, podendo assim ser um fator econômico e de destaque ambiental para cervejarias artesanais (SILVA, 2020).

Durante a etapa de fermentação da cerveja, a levedura inicia seu metabolismo fermentativo e diversos fatores comprometem sua condição celular, tais como a temperatura, pressão, pH, estresse oxidativo e o suprimento de nutrientes. Estes fatores citados podem interferir na viabilidade da levedura e assim, afetar o número de vezes em que a levedura pode ser reutilizada em novas fermentações.

A partir deste fato o presente trabalho apresenta como objetivo principal a avaliação da atividade fermentativa de uma levedura no processo de reutilização do fermento cervejeiro, verificando a viabilidade celular após o reaproveitamento das células viáveis de levedura e suas condições de reuso em escala industrial, utilizando o processo realizado numa cervejaria artesanal, que utiliza seu fermento por até 10 ciclos de utilização/fermentação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Cerveja

A cerveja, que deriva da palavra em latim *bibe-re* (beber), é uma bebida fermentada e consumida a cerca de 6.000 a 8.000 anos (Venturini, 2010).

O Decreto n. 6.871, de 4 de junho de 2009, publicado no Diário Oficial da União de 04 de junho de 2009, regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. De acordo com o Artigo 36 do decreto nº 6871 da legislação brasileira, “Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, oriundo do malte de cevada, e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo” (MAPA, 1994).

Entre centenas de estilos de cervejas, a cerveja Pilsen se tornou a mais popular, sendo criada em 1842, na cidade de Pilsen, na República Tcheca e atualmente representa mais de 90% do consumo cervejeiro mundial (TORRES, 2022). Mais conhecida como Lei de Pureza Alemã, a “Reinheitsgebot” foi uma lei promulgada pelo duque Guilherme IV da Baviera, em 23 de abril de 1516, e estabelece que a cerveja deve ser produzida exclusivamente com malte, lúpulo e água, sem qualquer adjunto. A Figura 1 mostra o texto original publicado da “Reinheitsgebot”.

A levedura cervejeira não deve ser considerada como matéria-prima, é utilizada apenas como agente bioquímico na transformação dos açúcares em álcool pelo processo de fermentação (VENTURINI & CEREDA, 2008). No Brasil, o hábito de tomar cerveja foi trazido por D. João VI, no início do século XIX, durante a permanência da família real portuguesa no país. Nessa época, a cerveja consumida era importada de países europeus (Venturini, 2010).

Figura 1: O texto da Lei de Pureza Alemã

Reinheitsgebot

Wir verordnen, setzen und wollen mit dem Rat unserer Landschaft, dass forthin überall im Fürstentum Bayern sowohl auf dem Lande wie auch in unseren Städten und Märkten, die keine besondere Ordnung dafür haben, von Michaeli (29. September) bis Georgi (23. April) eine Maß oder ein Kopf Bier für nicht mehr als einen Pfennig Münchener Währung und von Georgi bis Michaeli die Maß für nicht mehr als zwei Pfennig derselben Währung, der Kopf für nicht mehr als drei Heller (gewöhnlich ein halber Pfennig) bei Androhung unten angeführter Strafe gegeben und ausgeschenkt werden soll.

Wo aber einer nicht Märzen sondern anderes Bier brauen oder sonstwie haben würde, soll er es keineswegs höher als um einen Pfennig die Maß ausschenken und verkaufen. Ganz besonders wollen wir, dass forthin allenthalben in unseren Städten, Märkten und auf dem Lande zu keinem Bier mehr Stücke als allein Gersten, Hopfen und Wasser verwendet und gebraucht werden sollen.

Wer diese unsere Androhung wissentlich übertritt und nicht einhält, dem soll von seiner Gerichtsobrigkeit zur Strafe dieses Fass Bier, so oft es vorkommt, unnachsichtig weggenommen werden.

Wo jedoch ein Gastwirt von einem Bierbräu in unseren Städten, Märkten oder auf dem Lande einen, zwei oder drei Eimer (enthält etwa 60 Liter) Bier kauft und wieder ausschenkt an das gemeine Bauernvolk, soll ihm allein und sonst niemand erlaubt und unverboten sein, die Maß oder den Kopf Bier um einen Heller teurer als oben vorgeschrieben ist, zu geben und auszuschenken.

Auch soll uns als Landesfürsten vorbehalten sein, für den Fall, dass aus Mangel und Verteuerung des Getreides starke Beschwernis entstünde, nachdem die Jahrgänge auch die Gegend und die Reifezeiten in unserem Land verschieden sind, zum allgemeinen Nutzen Einschränkungen zu verordnen, wie solches am Schluss über den Fürkauf ausführlich ausgedrückt und gesetzt ist.

Fonte: Hofbraubh, 2010.

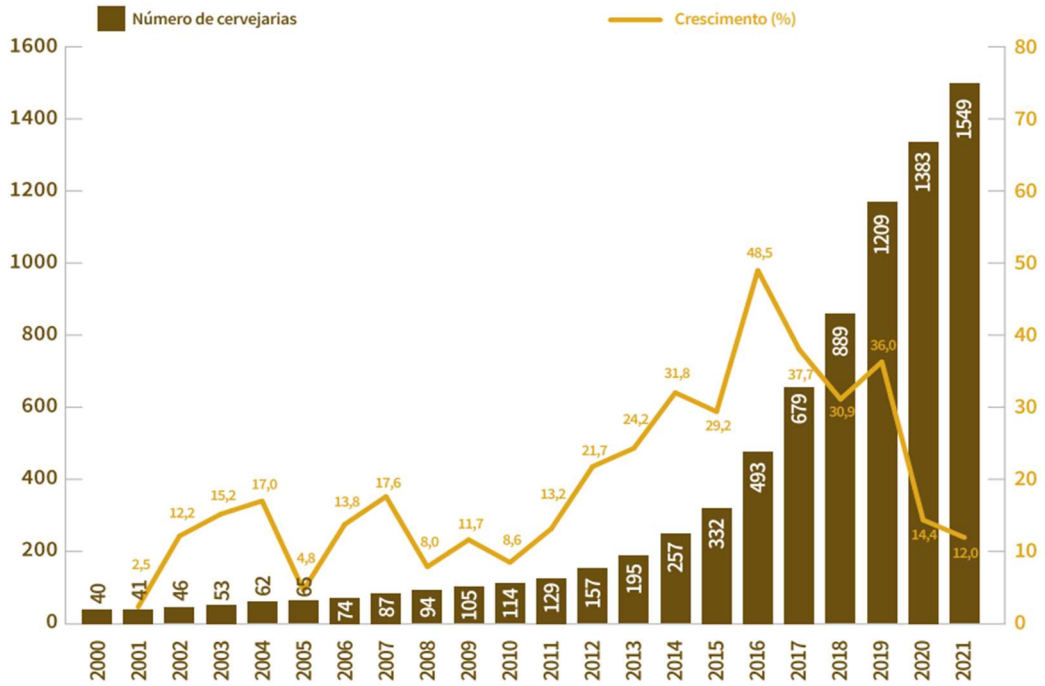
2.1.1 O mercado brasileiro de cerveja

A cerveja é a terceira bebida mais popular do mundo, depois da água e do chá. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regula, inspeciona e fiscaliza os estabelecimentos produtores de bebidas em território nacional, em 2019 houve a consolidação do mercado cervejeiro no país, com mais de 1.000 estabelecimentos legalmente instalados (SINDICERV, 2020).

Apesar da pandemia de Covid-19 ter pressionado os custos de produção e de insumos, ela não interferiu no crescimento da indústria cervejeira dos últimos anos. Em 2020, o aumento do número de fabricantes foi de 14,4%, considerado abaixo do esperado no ano. Porém, em 2020 todos os Estados brasileiros passaram a ter uma cervejaria, com a abertura da primeira fábrica do Acre (MAPA, 2021).

Na Figura 2, é possível verificar o crescimento no número de cervejarias registradas com uma pequena desaceleração visto que de 2019 para 2020 o número de estabelecimentos aumentou em 14,4% e de 2020 para 2021 aumentou em 12,0% (SINDICERV, 2022).

Figura 2: Total de estabelecimentos registrados



Fonte: SINDICERV, 2022.

No ano de 2021, o Brasil atingiu a marca de 1.549 cervejarias registradas no MAPA, equivalente ao aumento de 12% em relação ao ano anterior, que foi de 1.383 estabelecimentos, conforme dados do Anuário da Cerveja 2021 (BRASIL, 2022), onde o volume de vendas no ano atingiu a marca de 14.3 bilhões de litros, de acordo com levantamento da pesquisa de mercado (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2022). Em 2021, o total de novos produtos teve crescimento em 5,2%, em relação a 2020, totalizando 1.178 produtos novos registrados (SINDICERV, 2022).

2.1.2 A cerveja artesanal

Não há definição legal para cervejaria artesanal, microcervejaria, nanocervejaria e brewpub, pois, segundo o MAPA, esses estabelecimentos estão sujeitos às mesmas regras e procedimentos de registro como qualquer outra cervejaria, ainda que existam legislações em outras esferas para fins de zoneamento, licenciamento ou tributação (SINDICERV, 2022).

Cervejaria artesanal é produzida por uma cervejaria independente ou microcervejaria, que não está ligada a grandes grupos (BODAS, 2020). O diferencial das cervejarias artesanais, em relação a grandes grupos produtores de cerveja, está

no foco com a alta qualidade e com uma seleção de ingredientes, sendo esses os seus objetivos e não a produção em larga escala (TORRES, 2022).

As cervejas fabricadas em grande escala têm como característica uma relativa homogeneidade, com isso os consumidores passam a buscar por diferenciação via aquisição de produtos mais sofisticados, como os estilos das cervejas artesanais (SILVA, 2019).

2.1.4 Matérias primas para a produção de cerveja artesanal

2.1.4.1 Água

A cerveja é composta por 90% de água. A composição da água é fortemente alterada pelas condições do solo onde ela se encontra e diversos fatores influenciam na qualidade da água e se ela é apropriada para a produção de cerveja. O Potencial Hidrogeniônico (pH) da água é um dos parâmetros mais importantes na produção da cerveja, pois influencia em todas as fases da brassagem e no auxílio às reações enzimáticas (EISENBAHN, 2022).

Outro fator que influencia na característica da água são os sais minerais, que determinam o tipo de água, podendo ser classificada em quatro tipos: mole, média, dura e super dura. Os minerais presentes na água potável favorecem uma fermentação vigorosa, porém a redução de sais minerais no suprimento de água favorece a produção de cerveja estilo lager.

Uma água com maior quantidade de cálcio e magnésio, será dura. O tipo de água que tem menor quantidade de sais minerais é considerada como mole. Esse é o caso das cervejas Pilsen, por exemplo (CENTRALBREW, 2021).

2.1.4.2 Malte

A cevada (*Hordeum vulgare*) é uma gramínea amarelada de casca dura, possui baixo teor de proteína e alto teor de amido e seu desenvolvimento se dá em climas temperados (Figura 3).

Figura 3: Malte de cevada germinado

Fonte: ESCM, 2020.

Esse cereal possui diversos tipos e variedades, onde passaram a ser misturados e equilibrados ao longo dos anos para maximização do rendimento na agricultura e redução de intensidade de sabor para produção de cervejas mais leves (OLIVER, 2012, p. 27). A Tabela 1 mostra a composição do grão da cevada antes do processo de malteação e após esse processo. O malte é a base da cerveja e é dele que se retiram os açúcares presentes no amido, que serão transformados em álcool pelas leveduras, e seus tipos definem cor e corpo da bebida.

Tabela 1: Composição do grão de cevada e do malte.

Características	Cevada	Malte
Massa do grão (mg)	32 - 36	29 - 33
Umidade (%)	10 - 14	4 -6
Amido (%)	55 - 60	50 - 55
Açúcares (%)	0,5 - 1,0	8 - 10
Nitrogênio total (%)	1,8 - 2,3	1,8 - 2,3
Nitrogênio solúvel (% de N total)	10 - 12	35 - 50
Poder diastásico, °Lintner	50 - 60	100 - 250
α-amilase, unidades de dextrina	Traços	30 - 60
Atividade proteolítica	Traços	15 - 30

Fonte: Cereda (1983).

O processo produtivo de grande parte das microcervejarias inicia na moagem do malte, visto que a malteação da cevada fica a cargo de empresas “malteadoras”, não mais sob responsabilidade do cervejeiro (OLIVER, 2012, p. 28). Porém, o processo como um todo inicia-se na malteação da cevada.

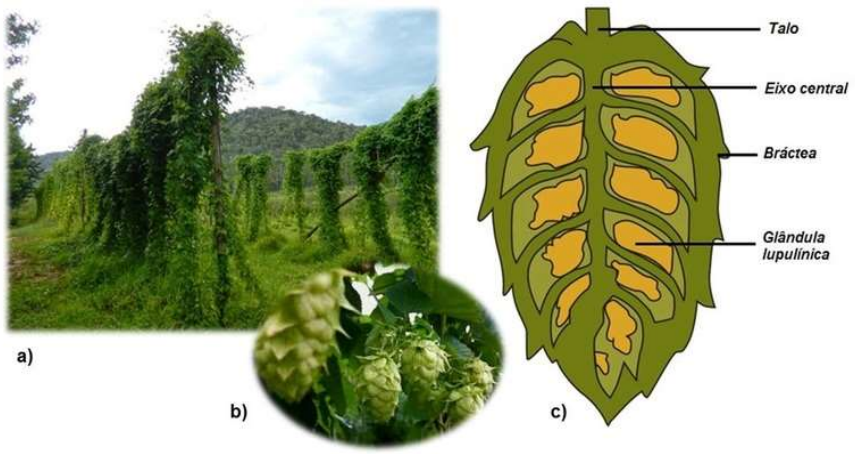
O processo de transformação da cevada em malte resulta em uma maior quantidade de açúcares fermentescíveis, além do aumento da força enzimática para a quebra desses açúcares, além do aumento de fonte de nitrogênio e atividade proteolítica, ambos para auxílio na fermentação do malte pela levedura, a fim de se obter etanol, dióxido de carbono e subprodutos de aroma e sabor (OSHIO, 2022).

2.1.4.2 Lúpulo

O lúpulo é cultivado com rizomas transplantados, onde somente a fêmea é comercializada. Durante a primavera e o verão, seu cultivo pode chegar a 6 metros de altura, sendo a flor do lúpulo uma trepadeira orientada por fios presos a estacas para maior sustentação.

A flor então floresce no final do verão, expondo suas glândulas que produzem um pó amarelado, como mostra a Figura 4, chamado de lupulina, sendo de grande aproveitamento pelos cervejeiros, para caracterização do amargor puro na cerveja (OLIVER, 2012, p. 33).

Figura 4: Lúpulo



Fonte: Nutriagro, adaptado (2022).

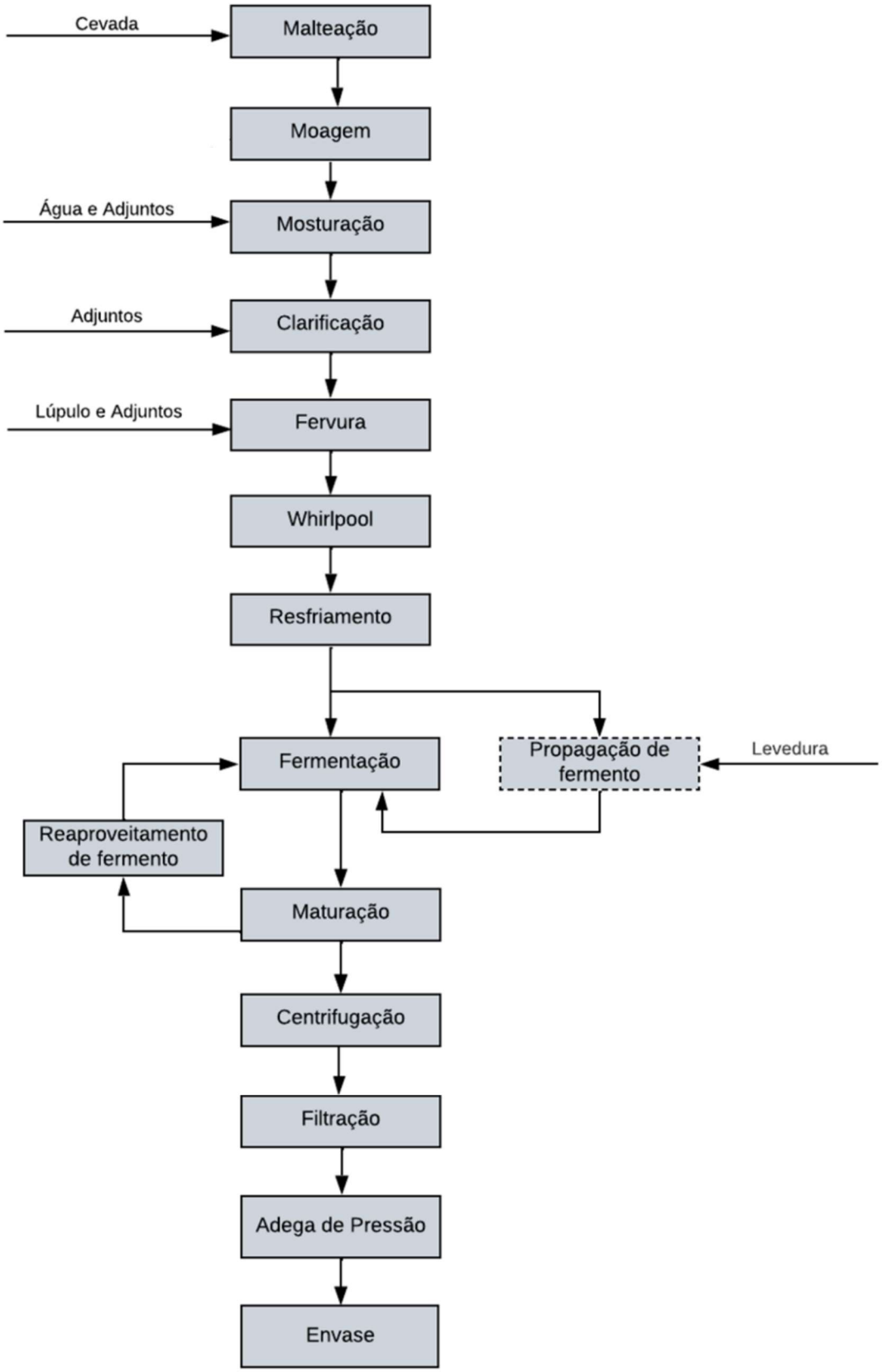
Segundo Oliver (2012, p. 31) “O amargor do lúpulo é a espinha dorsal da cerveja, equilibrando a doçura do malte.” O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma flor responsável por fornecer amargor, sabor e aroma característicos à cerveja. Promove a clarificação da cerveja, devido aos taninos presentes na planta que auxiliam a sedimentação das proteínas, e oferece retenção da espuma no produto final, por atuarem como estabilizantes.

O lúpulo também proporciona uma conservação natural ao produto final, por conta do seu alto teor de ácidos amargos e polifenóis, que são capazes de inibir o crescimento de um amplo espectro de microrganismos (BRIGGS, et al., 2004). Estes compostos ácidos e fenólicos resistem à precipitação durante o arrefecimento e também a fermentação do mosto, chegando ao produto acabado com suas características de amargor e aroma (KUNZE, 1999).

2.1.3 A produção da cerveja

O processo produtivo da cerveja Pilsen é dividido nas seguintes etapas básicas: malteação da cevada, moagem do malte; mosturação, clarificação, filtração e fervura do mosto; tratamento do mosto, whirlpool, resfriamento, fermentação e maturação, seguindo para ajustes finais e envase, como representado na Figura 5. Após maturada a cerveja é centrifugada e, em alguns casos filtrada, estando pronta para envase (SCHEFFER, 2013).

Figura 5: Processo produtivo da cerveja



Fonte: Autora, 2022 - Adaptado.

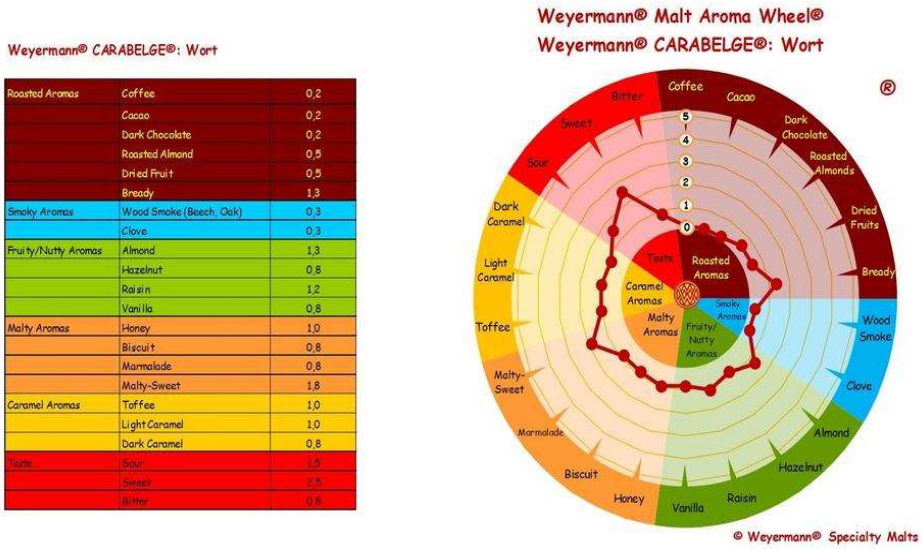
2.1.5.1 Malteação da cevada

A malteação é um processo de germinação e secagem, onde o grão é colocado sob submersão em água até que comece a germinar e então é posto em estufa para secagem. Nesse processo o grão da cevada que antes era firme, passa a ser macio, onde o amido presente no interior do grão apresenta maciez e branquitude pronta para a fermentação (OLIVER, 2012, p. 28).

O grão desenvolve enzimas, ao mesmo tempo que o amido se torna acessível para a quebra e a conversão dos açúcares pela ação das enzimas, processo no qual dura cerca de três dias. A malteação é controlada com parâmetros de tempo, temperatura e umidade, visto que para cada escala parametral resulta em uma variedade de malte. Cada variedade de malte possui sabor, aroma e cor para determinada finalidade.

Na Figura 6 tem-se o exemplo da variedade de aroma e sabor de uma cevada malteada para a produção de cerveja lager.

Figura 6: Aroma e sabor do malte Weyermann



Fonte: Weyermann Maltes Especiais, 2017.

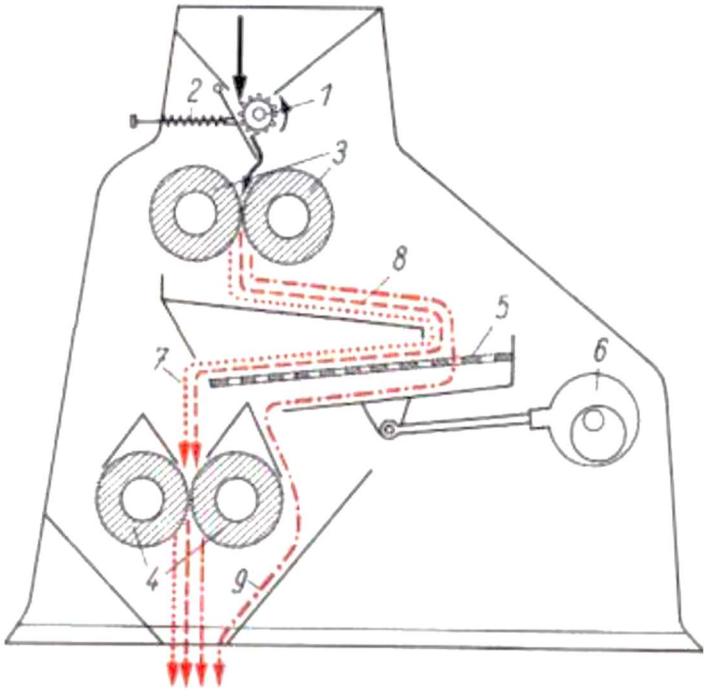
2.1.5.2 Moagem do malte

Segundo Venturini (2010), a moagem do malte tem por finalidade reduzir o grão de cevada, para exposição do interior do grão com o aumento da superfície das partículas, produzindo a permeabilidade da parede celular do endosperma. Havendo a desintegração do endosperma, a moagem promove uma melhor atuação enzimática, pois as enzimas atuam na quebra do amido presente no endosperma em açúcares menores.

Além da quebra das células do endosperma, a moagem do malte tem por objetivo criar uma estrutura apropriada de cascas para clarificação e resulta em rendimento máximo com clarificação rápida e boa qualidade do filtrado (TELEGINSKI,2022).

A moagem do grão de cevada mais adequada para a produção de cerveja artesanal é pelo método de moagem seca em moinho de 2 a 4 rolos. A Figura 7 abaixo exemplifica a composição de um moinho de 4 rolos utilizado em cervejarias de médio porte. O moinho possui apenas 2 passes, no primeiro ocorre a pré-ruptura e no segundo tem-se as cascas, resultando em sêmolas grossas ou, cascas muito trituradas. O grão moído é um preparo para a etapa posterior de mosturação.

Figura 7: Moinho de 4 rolos



Legenda: 1 - Distribuidor / 2 - Regulador de entrada /

3 - Par: ruptura prévia / 4 - Par: ruptura de cascas /
5 – Peneira / 6 – Ajuste /
7 - Cascas com Sêmolas aderidas / 8 - Pré triturado /
9 – Farinha

Fonte: Marcondes, 2022.

2.1.5.3 Mostura

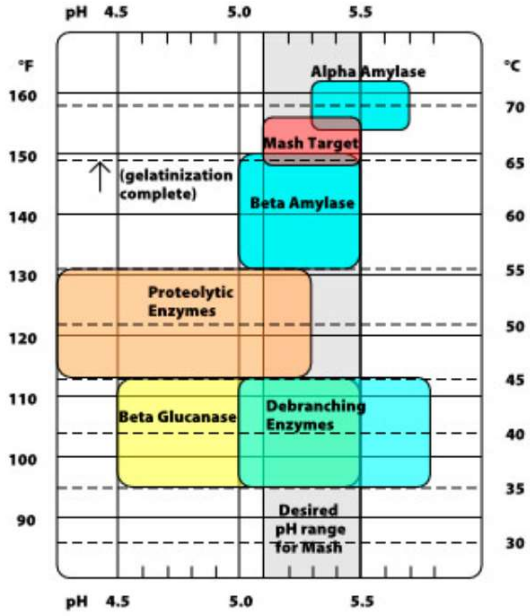
Os açúcares menores provenientes da moagem são convertidos do amido por meio de reações enzimáticas que ocorrem na mistura de grãos com a água, sendo esse processo chamado de mosturação (OLIVER. 2020).

A mosturação consiste na operação de mistura do malte moído juntamente com água em temperatura controlada. Nesta etapa solubilizam-se as substâncias do malte diretamente solúveis em água e, com o auxílio das enzimas, promovendo a hidrólise do amido totalmente exposto após a quebra (SANTOS, 2005).

As enzimas estão envolvidas em todas as fases do processo de produção, desde a malteação, passando pela mosturação e finalizando na fermentação. Na etapa de moagem e mosturação, as amilases são responsáveis pela degradação do amido em açúcares fermentescíveis, sendo a produção de cerveja um processo enzimático (TELINI E MENONCIN, 2022).

As enzimas que atuam na mosturação do malte de cevada são oriundas do próprio malte, e na Figura 8 abaixo são mostrados os tipos de enzimas e as faixas de pH e temperatura ideal para seu desempenho. É possível verificar que a beta-amilase atua com melhor desempenho entre 55 e 65°C com pH entre 5,1 e 5,5 (PANTANERO, 2018).

Figura 8: Faixas de atuação das enzimas durante o processo de mosturação



Fonte: Pantanero, 2022.

2.1.5.4 Clarificação e filtração

A clarificação e filtração tem como objetivo a separação do bagaço de malte do mosto líquido, evitando o arraste desses sólidos para as próximas etapas. Na etapa seguinte adiciona-se o lúpulo e submete-se a mistura à fervura, onde a temperatura do mosto é elevada acima de 100°C por uma hora, com pH próximo de 5,2.

2.1.5.5 Fervura

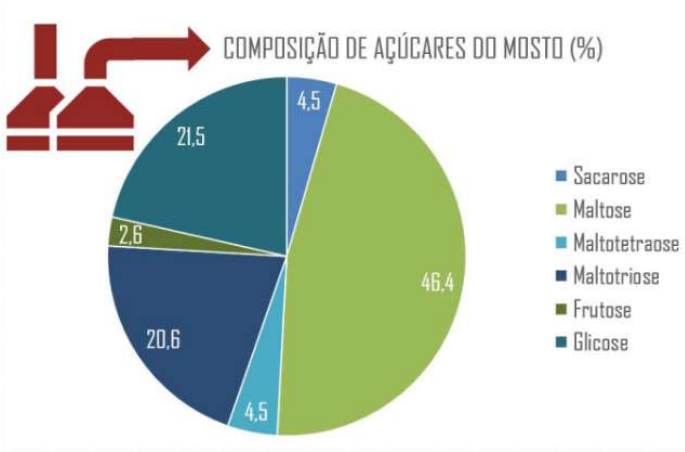
Nesse processo ocorre a inativação de enzimas, a volatilização de substâncias indesejáveis, a esterilização do mosto, a extração de compostos do lúpulo pelo fornecimento de calor para a transformação das substâncias de amargor do lúpulo, os alfa-ácidos, através da isomerização, além da evaporação da água excedente (SCHEFFER, 2013).

2.1.5.6 Whirlpool

Após fervura, ocorre a etapa de tratamento do mosto e filtração, utilizando um filtro específico, chamado de “whirlpool”. O “whirlpool” é basicamente o equipamento onde se faz uso de forças centrípetas por meio da rotação forçada do meio, para que

seja precipitado o “trub”, que são os sedimentos separados do mosto. Após este processo de ajuste das quantidades de açucares fermentescíveis (Figura 9), ou seja, a quantidade de açúcares passíveis de sofrer fermentação alcoólica, o mosto é resfriado e aerado, sendo enviado ao tanque de fermentação (JUNIOR, 2009).

Figura 9: Composição de açucares do mosto



Fonte: Telini e Menoncin, 2022.

2.2 A Fermentação

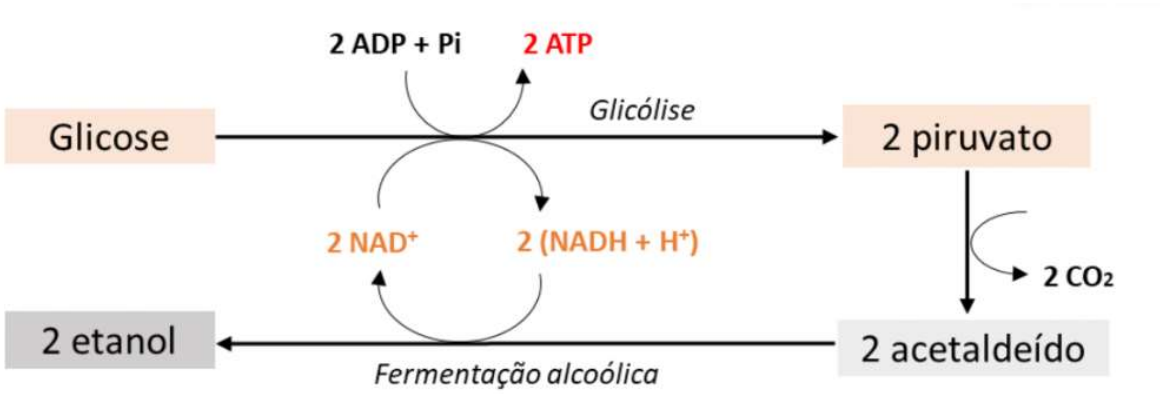
De acordo com AQUARONE et al. (1983), o mosto preparado não sofre espontaneamente a fermentação alcoólica, ocorrendo somente após sua inoculação por leveduras. Entende-se por fermentação o processo metabólico anaeróbio de produção de energia no qual os microrganismos, nesse caso as leveduras, oxidam parcialmente o substrato, atuando sobre um ou mais componentes, gerando produtos modificados e obtendo características desejáveis (SANTOS, 2008).

As leveduras metabolizam açúcares, produzindo etanol e gás carbônico, processo denominado de fermentação alcoólica. Esse tipo de fermentação é realizado por diversos microrganismos, destacando-se os fungos da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Utiliza-se os dois produtos dessa fermentação: o álcool etílico empregado há milênios na fabricação de bebidas alcoólicas (vinhos, cervejas, cachaças etc.) e o gás carbônico, importante na fabricação do pão, um dos mais tradicionais alimentos da humanidade (KLEIN, 2022).

O processo de transformação de açúcares em etanol e CO_2 pela levedura (Figura 10) gera como subprodutos ácidos orgânicos, cetonas, ésteres e outros compostos (OSHIO, 2022).

Figura 10: Processo de fermentação alcoólica



Fonte: OSHIO 2022.

O consumo de substrato pela levedura é avaliado através da concentração de açúcares no mosto, medido com um refratômetro cuja unidade de medida utilizada se dá em °Brix, °Plato ou Specific Gravity, através da razão entre a densidade do mosto e a densidade da água pura.

Segundo Telini e Menoncin (2022), a levedura possui a capacidade metabólica de converter aproximadamente 46,3% do extrato do mosto em dióxido de carbono, 48,4% em etanol e 5,3% em novas células de levedura. Menos de 1% dessa conversão são gerados subprodutos de fermentação, porém essas concentrações podem ter impacto na composição sensorial da cerveja.

2.3 A Levedura

Organismo unicelular do Reino *Funghi*, pertencente ao Filo *Eumycota*, *Subfilos Ascomycotina* ou *Basidiomycotina*, as leveduras formam colônias cremosas ou membranosas e são imóveis devido à ausência de flagelo (CARVALHO, 2010).

A reprodução da levedura ocorre por brotamento, onde crescem e se reproduzem mais rápido que os bolores, por serem células simples e devido a sua maior relação entre a área e o volume, e são mais eficientes na realização de alterações químicas.

As leveduras não realizam fotossíntese e não são protozoários, pois possuem parede celular rígida e se diferenciam das bactérias em virtude de suas dimensões maiores e de suas características morfológicas (CARVALHO et al. 2006). Existem mais de 500 espécies de leveduras, e cada espécie contém milhares de cepas, diferenciando-as pelas suas características específicas, como tolerância ao álcool e temperatura.

A estrutura celular da levedura é preponderante no desempenho metabólico, necessita então estar saudável, organizada e funcional. A parede celular da levedura é composta por carboidratos, polissacarídeos, proteínas e lipídeos, sendo sua estrutura constituída por quitina e nanoproteínas e o interior se dá por uma mistura das duas com β-glicanos (TELINI E MENONCIN, 2022).

A membrana plasmática se faz por uma bicamada lipídica e semipermeável abaixo da parede celular, composta de lipídios, esteróis e proteínas. Sua estruturação se dá pela união de uma série de moléculas chamadas fosfolipídios, que possuem caudas hidrofóbicas, voltadas para a parte interior da estrutura, e a cabeça hidrofílica voltada para a parte externa. O citoplasma é o fluido intracelular onde estão localizados as organelas, enzimas e estoque de glicogênio (TELINI E MENONCIN, 2022).

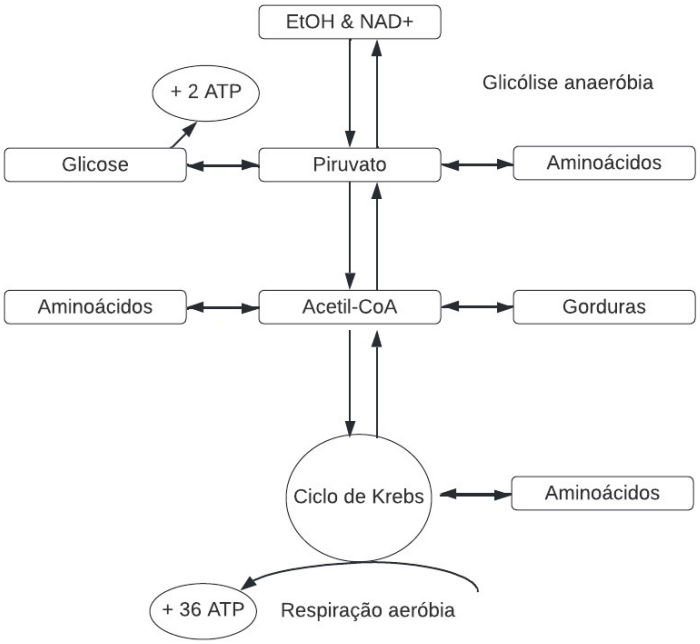
As leveduras também apresentam mitocôndrias, muitas vezes comumente lembradas como função de respiração, mas visto que a levedura muitas vezes se vê em processo de fermentação anaeróbia, a mitocôndria se apresenta na forma de protomitocôndrias e estão apenas funcionais para algumas reações como a síntese de esteróis e acetil-CoA (TELINI E MENONCIN, 2022).

O DNA das leveduras está organizado na forma de cromossomos e é a partir dele que há a informação genética para a produção de enzimas. O gene do DNA se transforma em RNA mensageiro e consequentemente em proteína nos ribossomos. Os ribossomos se encontram no retículo endoplasmático, ocorrendo a síntese de proteínas e também de lipídeos e carboidratos. Os carboidratos formados por sua vez são reservas de açúcar da levedura para sua manutenção (TELINI E MENONCIN, 2022).

2.3.1 Metabolismo da levedura

De acordo com Oliveira (2011) a levedura possui habilidade de se ajustar metabolicamente em presença de oxigênio ou na ausência deste, devido às suas propriedades facultativas. Quando há presença de oxigênio no ambiente onde a levedura está ativa, o açúcar presente no meio de cultivo é consumido pela levedura, se transformando em própria biomassa, gás carbônico e água. Porém, na ausência de oxigênio, ocorre o processo de fermentação alcoólica, com a formação de etanol e dióxido de carbono a partir da metabolização de açucares, ou seja, a transformação do mosto em cerveja. Para a finalidade de promover o crescimento do fermento e sua multiplicação, o processo de aerobiose é energeticamente mais eficiente do que o processo anaeróbio (TELINI E MENONCIN, 2022).

Figura 11: Vias metabólicas da levedura

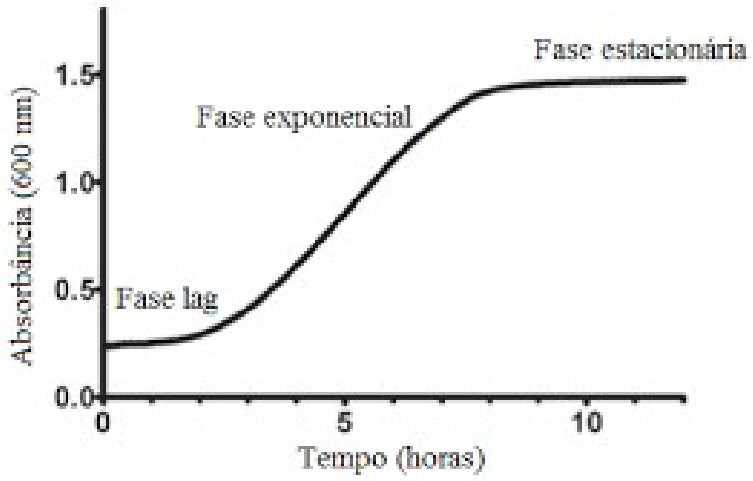


Fonte: Telini e Menoncin, 2022.

O metabolismo aeróbio gera mais energia para a levedura que o metabolismo anaeróbio, porém as leveduras optam pela via fermentativa anaeróbia devido a um comportamento metabólico conhecido como efeito Crabtree que causa uma repressão catabólica em presença de excesso de glicose, onde mesmo na presença de oxigênio, as leveduras fermentam (TELINI E MENONCIN, 2022).

O processo fermentativo é dividido em três fases, representadas na Figura 12: de adaptação (fase lag), exponencial (fase log) e fase estacionária (HELD, 2010). As leveduras iniciam seu ciclo celular na fase lag, período de adaptação ao ambiente e disponibilidade de nutrientes do mosto cervejeiro, onde temperatura e taxa de inoculação de leveduras são controladas.

Figura 12: Fases do processo fermentativo



Fonte: SUHRE, 2014.

> No início da fermentação, as leveduras primeiramente consomem os estoques de glicogênio e assimilam tanto nutrientes quanto oxigênio do mosto para revitalizar suas membranas celulares e aumentar a permeabilidade e transferência de nutrientes e açúcares. As leveduras assimilam os açúcares disponíveis iniciando pela glicose, que é transportada por difusão facilitada, depois frutose, seguida de maltose e maltotriose (TELINI E MENONCIN, 2022).

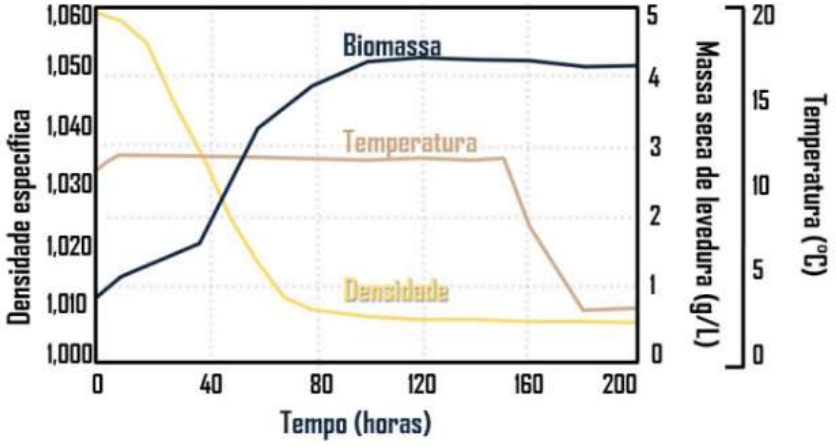
Temperaturas altas causam aumento na velocidade de crescimento celular, podendo desenvolver aromas indesejáveis, além da rápida fermentação, mas causa a diminuição da fase lag. Assim como o inverso pode causar atraso na fase lag e demora no início da fermentação, devido a temperaturas mais baixas ou taxa de inoculação inadequada. (WHITE; ZAINSHEFF, 2010).

Dentre os parâmetros a serem controlados durante a fermentação, o pH do mosto também é importante, pois o crescimento celular de leveduras cervejeiras ocorre numa faixa de pH entre 4 e 5. O baixo pH também diminui a possibilidade de microrganismos contaminantes se desenvolverem na cerveja (PALMER, 2010).

Na fase exponencial, a população de leveduras se multiplica rapidamente e aumenta a taxa de conversão de açúcares do mosto. Durante a fermentação alcoólica, a levedura metaboliza os carboidratos do mosto, produzindo etanol, dióxido de carbono e diversos compostos como ésteres, álcoois superiores e compostos sulfurados que auxiliam na formação do sabor e aroma da cerveja (PIRES et al., 2014). Durante a fase estacionária o crescimento da população de leveduras é constante e similar a taxa de morte celular, mantendo a população de leveduras estável ao longo do tempo. Nesta fase a atividade fermentativa diminui e as leveduras absorvem grande parte dos compostos de aroma indesejáveis, como o diacetil, um composto com característico aroma de manteiga, que em alguns estilos é vantajoso, porém na maioria dos estilos pode originar defeitos sensoriais, diminuindo a qualidade sensorial da cerveja.

A absorção desses compostos traz o amadurecimento e o equilíbrio ao aroma da cerveja. Observando que a fermentação está em baixa atividade ao atenuar o extrato aparente, onde há estabilização do valor de extrato de acordo com cada estilo, tem-se o fim da fermentação (PALMER, 2006). Como mostra a Figura 13, com o consumo de açúcar ao longo do período de fermentação, ocorre o decaimento da densidade do meio, visto que densidade e extrato (quantidade de açúcar presente) podem ser representados como unidades equivalentes. A biomassa se eleva ao longo do consumo do açúcar, devido ao consumo pela levedura com o objetivo de se propagar.

Figura 13: Gráfico da fermentação alcoólica



Fonte: Telini e Menoncin, 2022.

A escolha no uso da levedura certa para determinado estilo de cerveja é predominante para o sucesso da produção. Segundo Oliveira (2011) duas espécies do gênero S*accharomyces* são comumente utilizadas em cervejarias e são capazes de produzir etanol e dióxido de carbono, a espécie S. *pastorius*, também como sinônimo de S. *uvarum* e S. *carlsbergensis*, e a espécie S. *cerevisiae*. Cada cepa de levedura é desenvolvida para fermentar um tipo de cerveja, seguindo alguns critérios, como consumo de açúcar, tempo de fermentação e floculação/decantação do fermento, além da produção de aroma e sabor. As duas principais cepas de leveduras utilizadas comercialmente na fermentação da cerveja são a *Saccharomyces cerevisae* e a *Saccharomyces pastorius*.

A levedura *S. cerevisae* é utilizada para a fermentação de cervejas tipo *Ale*, enquanto que a S. *pastorius* fermenta cerveja do tipo *Lager.* As leveduras tipo *Ale* fermentam em alta temperatura, entre 16 e 24°C, e sua fermentação é rápida, durante cerca de 4 a 5 dias. Durante a fermentação, a levedura produz aromas mais frutados, característico do estilo Ale de cerveja, mais intenso e complexo. Ao fim da fermentação, a levedura tende a subir à superfície do tanque, por isso muitas vezes são chamadas de levedura de superfície, ou leveduras de alta fermentação (Oliver, 2012).

A levedura S. *pastorius* é utilizada na fermentação de cervejas tipo *Lager,* com temperaturas mais baixas, entre 7 e 14°C, e por mais tempo, cerca de 7 a 8 dias. A palavra *Lagerung* significa “armazenamento”, sendo necessário o repouso desse tipo de cerveja sob resfriamento, durante o período de maturação. A levedura, ao fim da fermentação, decanta para o fundo do tanque, onde é coletada, podendo ser reutilizada em um novo lote de cerveja (OLIVER, 2012).

2.3.2 *Saccharomyces cerevisae*

O nome *Saccharomyces* vem da união de dois termos em grego. “Sacch” vem de sákkharon, que significa açúcar e “myces” vem de múkēs, que significa fungo. O gênero *Saccharomyces* significa “fungo do açúcar” (TELINI E MENONCIN, 2022). A maioria dos grandes fabricantes tem sua própria cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que evolui junto do estilo de cerveja que se fabrica, sendo estas comerciais ou naturais, apesar de ambas as cepas realizarem a mesma atividade de

transformar açúcar em álcool e gás carbônico. Um fator que se altera diante de diferentes cepas de levedura de mesma espécie é o sabor e aroma do produto obtido, em função das diferenças metabólicas e formação de substâncias capazes de conferir aroma e sabor ao produto, especialmente se o fabricante tiver sido o criador de um estilo (VENTURINI & CEREDA, 2008; DRAGONE et al., 2010).

Segundo Filho (2017), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui diversas características vantajosas na produção de cerveja, tornando-a modelo na fermentação cervejeira. Além de ser um dos micro-organismos mais conhecidos, possui facilidade de isolamento e manutenção, é atóxica e não oferece patogenicidade, além de ser pouco exigente em sua nutrição (OLIVER, 2012).

2.3.3 *Saccharomyces pastorius*

S. pastorianus, conhecida também como *S. uvarum,* é uma levedura híbrida, originada a partir das leveduras *Saccharomyces eubayanus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Predominantemente do estilo Pilsen, as cervejas tipo Lager são elaboradas com cepas da levedura *Saccharomyces pastorius*, sendo as mais populares mundialmente. Devido às baixas temperaturas usadas no processo, os sabores e aromas das cervejas lager são mais leves, quando comparados com o tipo *Ale* (HARDWICK, 1995).

O tipo de cerveja *Lager* é relativamente novo, mas está entre as cervejas mais populares do mundo. Lagers possuem fermentação mais lenta e menos tumultuada que estilos *Ale,* maturam por mais tempo e as leveduras deste tipo produzem aromas mais brandos e suavizados (OLIVER, 2012).

“Diamond” é uma cepa de levedura comercial utilizada para fermentação de cervejas estilo *Lager*. Originária da Alemanha, oferece um desempenho ótimo de fermentação e possui a capacidade de produzir lagers limpas e autênticas. Classificada como *Saccharomyces pastorianus*, “Diamond” é uma levedura de baixa fermentação. Possui atenuação e floculação alta e aroma e sabor neutros, característicos das Lagers tradicionais. A faixa de temperatura ideal para a levedura “Diamond” ao produzir estilos tradicionais é de 10°C a 15°C (LALLEMAND, 2022).

2.3.4 Condições ideais para a levedura

Por ser rico em açúcares, o mosto exige das leveduras a resistência a maiores concentrações de álcool, para que a fermentação seja desenvolvida de modo uniforme e adequado (AQUARONE, 1983). O termo comumente utilizado para medir a saúde de uma cultura de fermento cervejeiro é a viabilidade e vitalidade celular, onde na vitalidade se analisa a propriedade fisiológica da célula. A viabilidade é a proporção de células de levedura vivas para células de levedura mortas (SMART, 1999) e as leveduras são viáveis quando as células têm membranas intactas.

Durante a etapa de fermentação da cerveja, onde a levedura inicia sua atuação, ocorrem diversos fatores externos que comprometem sua condição celular e a exposição direta a esses fatores implica na viabilidade da levedura. O tempo em que a levedura fica exposta a tais fatores pode agregar à perda de viabilidade ao longo das gerações do fermento reaproveitado (DAVIS, 2016).

Os parâmetros que devem ser considerados e controlados ao longo da atuação da levedura no processo de fermentação são: temperatura, pressão pH, estresse oxidativo e o suprimento de nutrientes. Todos esses fatores têm impacto diretamente no rendimento da fermentação (BSI, 2022).

Os nutrientes são a base para o desenvolvimento da fermentação, pois afetam a velocidade e multiplicação da levedura. A concentração adequada de nutrientes do mosto é de grande importância, pois em quantidades insuficientes de nutrientes no mosto cervejeiro ou em altas concentrações, podem desqualificar o processo fermentativo como um todo, comprometendo o metabolismo da levedura e consequentemente a eficiência da fermentação (DAVIS, 2016).

A temperatura ideal de fermentação para o estilo Lager está entre 10 e 15°C e à medida que a temperatura aumenta, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxicidade do etanol. Porém, temperaturas baixas também podem ser prejudiciais, pois afetam a permeabilidade da membrana das leveduras, ao diminuir a velocidade de absorção dos nutrientes e de açúcar, causando um tempo de fermentação acima do esperado (PEREIRA, et. al,2020).

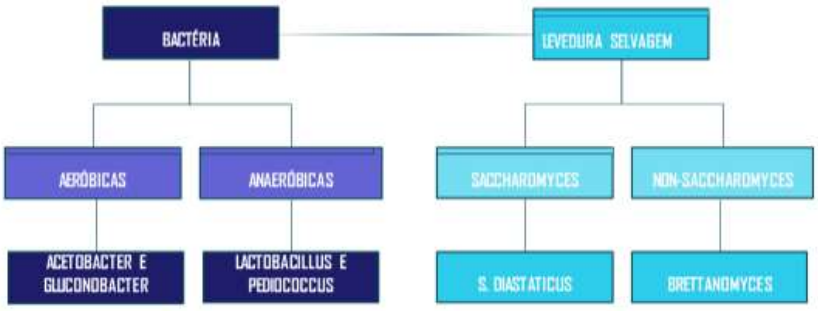
O pH ideal para a fermentação é o pH ácido, entre 3,5 e 5, abaixo desses valores, a levedura fica mais sensível ao álcool e com dificuldades na absorção de alguns nutrientes. As contaminações *por Lactobacillus e Bacillus* também são fatores

extremamente preocupantes, pois acarretam a perda de rendimento do fermento (PEREIRA, ET. AL, 2020).

Apesar da cerveja possuir uma série de fatores protetivos que diminuem as chances de contaminação, sendo um ambiente hostil aos microrganismos contaminantes, devido ao pH baixo, a presença de álcool, dióxido de carbono e baixas concentrações de oxigênio dissolvido, além da acidificação do malte, mostura a quente, fervura do mosto, filtração e pasteurização, é preciso que todas as etapas do processo sejam analisadas para controle e mitigação de possíveis contaminações do produto.

> Algumas bactérias competem com as leveduras cervejeiras por nutrientes, tornando a fermentação incompleta. Além disso, a qualidade da cerveja é afetada pela presença de off-flavours, turbidez e super atenuação, que pode levar à explosão de garrafas. Entre os off-flavours, o destaque fica para os ácidos orgânicos, em especial o ácido acético (que lembra vinagre) e o ácido láctico. Outros ácidos orgânicos podem ser ainda mais desagradáveis, a exemplo do ácido butírico, que lembra vômito (TELINI E MENONCIN, 2022).

Figura 14: Principais contaminantes do mosto e cerveja



Fonte: Telini e Menoncin, 2022.

Para a cepa de leveduras “Diamond”, as condições de armazenamento são predominantes para manter suas características de desempenho celular. A cepa perde sua atividade após a exposição ao ar e deve ser armazenada em condições secas abaixo de 4 °C. Uma mudança de temperatura de mais de 10 °C produz choque térmico na levedura, favorecendo a formação de pequenos mutantes, resultando numa fermentação prolongada ou incompleta e a formação de sabores indesejáveis.

A cepa de levedura “Diamond” necessita de quantidade adequada de carboidratos e ácidos graxos não saturados para alcançar um crescimento ativo (LALLEMAND, 2022).

2.3.5 Propagação da levedura

A utilização do fermento inicia-se pela geração zero, sendo o inóculo uma suspensão de células usada para dar partida em um propagador. Uma cultura pura de levedura que foi cultivada em propagador aerado, com adição de mosto cervejeiro e parâmetros controlados, de temperatura, pressão e tempo de propagação.

O objetivo da propagação é produzir grandes quantidades de biomassa de levedura a partir de pequenas quantidades. Nesse processo, as leveduras são previamente multiplicadas até o volume necessário para a condução da fermentação de modo eficaz e econômico. As células são suspensas em meio de cultura específico, de 10 a 20% do volume total do material a fermentar, sendo chamadas na prática de lêvedo alcoólico, pé de cuba ou simplesmente fermento. Durante a propagação, o consumo dos açúcares fermentescíveis do mosto é devido às atividades das células de levedura empregadas (AQUARONE, 1983).

O número de células inoculada para início da fermentação tem impacto sobre a taxa de atenuação da cerveja, como também afeta a composição sensorial, na formação de compostos aromáticos (TELINI E MENONCIN, 2022).

Deve-se seguir alguns cuidados para que sejam preservadas as características genéticas da levedura, garantindo assim que as células filhas tenham as mesmas características e habilidades da célula mãe. Parâmetros como temperatura, meio de cultura utilizado, pureza microbiológica, relação entre os volumes e demanda de oxigênio são importantes para o sucesso da propagação, sendo o oxigênio indispensável na propagação, com a função de ativação do metabolismo das leveduras, (SAITO, 2007).

A dosagem do número correto de células, termo conhecido taxa de inóculo ou *pitching rate*, se dá pelo cálculo de *pitching rate*, através da Equação 1 abaixo:

Equação 1: Cálculo de *pitching rate*

% PR = volume do mosto a ser fermentado (em mililitros) × densidade da cerveja (em graus Plato) × n° de células por mililitro

Fonte: TELINI E MENONCIN, 2022.

Para a levedura Diamond, a taxa de inoculação pode variar entre 100 e 200 gramas de levedura ativa para inocular 100 litros de mosto. A taxa de inoculação de 100 gramas em 100 litros de mosto pode atingir 5 milhões de células viáveis por mL, e para uma taxa de inoculação de 200 g por 100 L de mosto atinge-se um mínimo de 10 milhões de células viáveis por mL. Antes do uso da cepa, é recomendada a reidratação, pois os fatores de reidratação e inoculação líquida reduzem o estresse osmótico na levedura (LALLEMAND, 2022).

2.3.6 Reutilização da levedura

A partir do fermento propagado para a primeira fermentação, utiliza-se o fermento ao longo de novas outras fermentações (DE FUSCO, 2019), devido ao fato de as células de leveduras ainda estarem vivas e saudáveis após ciclos de fermentações cervejeiras (TELINI E MENONCIN, 2022).

A reutilização da levedura ao fim da fermentação é um método utilizado de suma importância para a redução de custo e maior reposição do fermento, além de proporcionar melhores condições para a fermentação, devido ao fato de que a levedura reciclada não necessita consumir substrato para a fase de crescimento, já estando adaptada ao meio à qual será inoculada. A reutilização também garante o volume de células necessário para fermentar um determinado volume de mosto (SIMPSON; HAMMOND, 1989).

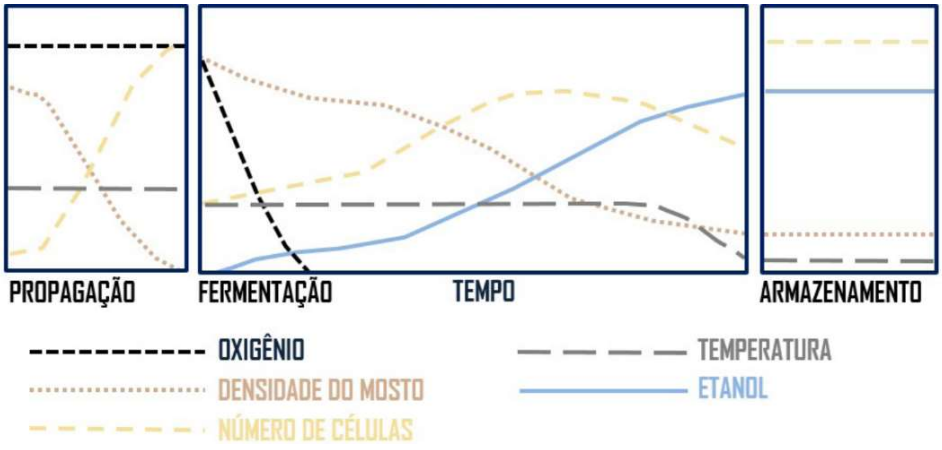
A reprodutibilidade de um lote de cerveja para outro é alcançada através do uso de uma quantidade de levedura de alta viabilidade e vitalidade, um período de fermentação constante a uma temperatura controlada e um período de maturação na presença da levedura. As fermentações são iniciadas utilizando culturas de leveduras renovadas após certo número de ciclos fermentativos (DRAGONE et al., 2010).

O número de vezes que a levedura pode ser reutilizada depende de diversos fatores, como a qualidade da levedura cultivada, a quantidade de células mortas, a política da empresa e seu desempenho ao longo das fermentações. A viabilidade e a vitalidade da levedura determinam se a cepa está em atividade para fermentar um próximo tanque de forma saudável (DE FUSCO, 2019).

Desde a propagação do inóculo a levedura já começa a sofrer estresses no processo, inicialmente com a descarga de oxigênio e excesso de açúcar, em fase aeróbia, já na fase anaeróbia a levedura passa a sofrer com a falta do oxigênio, nutrientes e a presença de álcool que é tóxico para a levedura, na etapa de fermentação.

Após a etapa de fermentação, a levedura decanta até o fundo do tanque fermentador, misturando-se com leveduras mortas, *trub* e bactérias. A falta de nutrientes e a pressão hidrostática em tanques fermentadores de grande volume também se somam aos fatores de estresse para a levedura, podendo ocorrer de forma mais frequente as mutações e a morte celular, sendo esse um dos motivos pelos quais as cervejarias reutilizam suas leveduras, em média, apenas de cinco a dez vezes antes de inserir uma nova cultura (TELINI E MENONCIN, 2022). A Figura 15 mostra, no período de fermentação alcoólica, o decaimento na densidade do mosto, ao ter seus açúcares consumidos pela levedura para a formação de biomassa (número de células) e de etanol.

Figura 15: Gráfico de fases da levedura



Fonte: Telini e Menoncin, 2022.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo principal

Avaliar a atividade fermentativa da levedura Saccharomyces cerevisiae no processo de reaproveitamento do fermento cervejeiro de uma cerveja Lager tipo Pilsen.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a viabilidade celular das leveduras reaproveitadas;
- Realizar teste de fermentação forçada como teste comparativo ao tanque fermentador;
- Realizar a análise microbiológica do mosto e do fermento utilizados.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e condições do método

Foi realizado o método de viabilidade celular e o teste de fermentação forçada em amostras de fermento reutilizados em até dez fermentações subsequentes, além de testes microbiológicos das amostras. Para a primeira fermentação, foi utilizado o fermento Diamond (Lallemand, Canadá) do tipo *Lager,* formado por leveduras da cepa de *Saccharomyces pastorianus*.

Antes da primeira utilização, as leveduras foram hidratadas e propagadas de acordo com as indicações do fabricante. Para o teste de fermentação forçada, além do uso do fermento Diamond de 10 gerações subsequentes, utilizou-se, a cada geração, o mosto estéril do estilo Pilsen, coletado durante a transferência da brassagem para o tanque fermentador. A levedura em teste foi utilizada por 10 gerações, visto que nas condições industriais estabelecidas o limite de reutilização se dá por até 10 vezes, não prolongando seu uso e propagando um novo lote do fermento para um novo ciclo de reutilização por batelada.

4.2 Coleta de amostra estéril

4.2.1 Coleta do fermento

Ainda no período de fermentação da cerveja, o fermento inicia sua sedimentação, sendo mais efetiva na etapa de maturação, onde é realizada a coleta estéril de uma amostra para análise de viabilidade celular e teste de fermentação forçada, além de teste microbiológico.

O volume de fermento transferido para um novo tanque fermentador é chamado de levedura de reuso ou lama. Durante a maturação, as leveduras consomem suas reservas energéticas, perdendo rapidamente viabilidade e vitalidade em tanques cilindrocônicos, essa perda de viabilidade pode ser muito rápida, então o melhor momento para coletar a levedura do fundo do tanque é de um a dois dias após o início do resfriamento. Sob essas condições, a espera de apenas 24 horas a mais pode reduzir a viabilidade do fermento em até 50%.

Durante o processo de coleta de lama, tem-se o objetivo de obter a maior proporção possível da camada intermediária decantada no tanque, descartando

assim as células que decantam antes de fermentar todo o açúcar e as que decantam de forma muito lenta, mesmo quando a concentração de açúcares está baixa (SAITO, 2007).

A coleta de amostra da lama, como representada na Figura 16, foi realizada após o descarte das leveduras da camada mais sedimentada, chamado esse processo de purga de fermentação, com auxílio de um conector autoclavado conectado à válvula inferior do tanque cônico.

Após, a válvula pode ser aberta e o primeiro terço é descartado, pois a levedura residual contém alta quantidade de trub. À medida que a drenagem continua, a lama ganha uma cor mais clara com uma consistência cremosa.

A coleta foi realizada em ambiente estéril com auxílio de um maçarico próximo à válvula inferior e aos materiais utilizados. Após a purga do fermento, foi coletada a amostra em dois frascos estéreis de 50 mL, o primeiro frasco, para a contagem celular e cálculo de viabilidade, utilizou-se cerca de 1 mL de amostra, enquanto a amostra do segundo frasco foi utilizado para o plaqueamento em fluxo laminar e controle microbiológico utiliza-se cerca de 0,1 mL de amostra.

Figura 16: Coleta estéril de lama

Fonte: Autora, 2022.

4.2.2 Coleta do mosto

A coleta de mosto estéril é realizada logo após a brassagem do mesmo, no qual é transferido por tubulação até o tanque fermentador. A amostra é coletada na válvula inferior do tanque fermentador durante a transferência do mosto para o tanque.

Como mostra a Figura 17, a coleta do mosto foi realizada em falcon autoclavado de 50 mL para análise microbiológica, utilizando cerca de 20 mL de amostra, enquanto para a fermentação forçada utilizou-se 300 mL de mosto estéril em erlenmeyer autoclavado de 500 mL, ambos coletados com auxílio de maçarico para manter o ambiente estéril.

Figura 17: Coleta estéril do mosto

Fonte: Autora, 2022.

4.3 Métodos de análise

4.3.1 Viabilidade celular

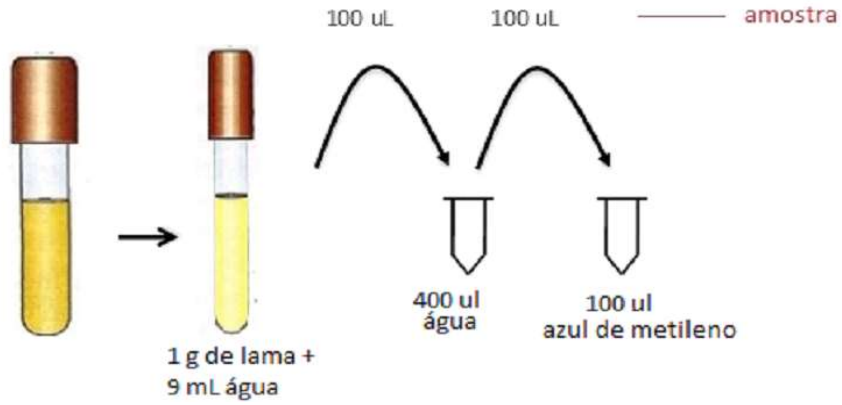
O método mais utilizado para determinação de viabilidade celular da levedura é a contagem de células viáveis, a partir da coloração com azul de metileno na câmara de Neubauer. A coloração metacromática penetra nas membranas danificadas das células mortas, corando-as.

As células de levedura vitais convertem o azul de metileno em uma solução incolor via desidrogenase celular. Por este método é possível distinguir célula morta de célula viva usando microscopia básica de campo claro (DE FUSCO, 2019).

A coloração com azul de metileno foi realizada de acordo com a metodologia proposta pela European Central Bank (ECB, 2011). Após coleta estéril da lama no tanque fermentador que passa à etapa de maturação, foi realizada a contagem de células pelo método de coloração com azul de metileno em hemocitômetro de Neubauer.

A amostra inicialmente passou por uma diluição seriada definida, como mostra o esquema da Figura 18, sendo diluída 10 vezes, com 1 mL de amostra e 9 mL de água destilada, prosseguindo a uma nova diluição de 5 vezes, com 0,1 mL da amostra previamente diluída em 0,4mL de água destilada. Após diluições em água destilada, a amostra foi novamente diluída, com 0,1mL de amostra em 0,1 mL de solução de azul de metileno, para sua homogeneização ao corante.

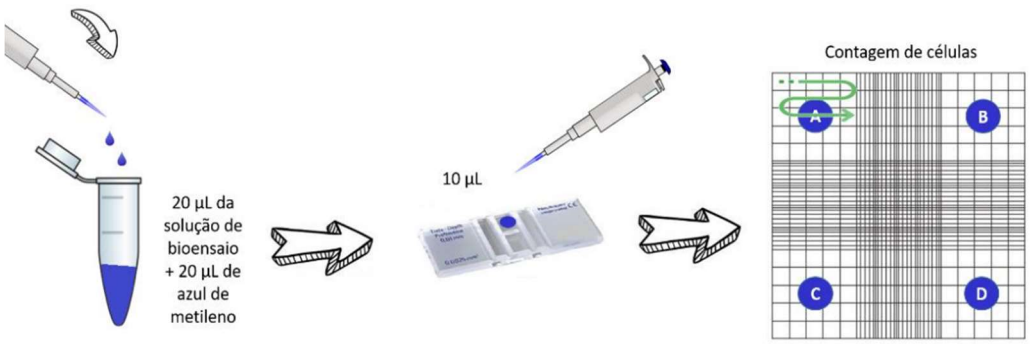
Figura 18: Diluição da amostra



Fonte: Autora, 2022.

Após o término da diluição e coloração da amostra, a mesma foi homogeneizada e transferida para o hemocitômetro, e realizando-se a contagem das células vivas e mortas em cada quadrante da extremidade da lâmina, e também no quadrante central, como detalhado no esquema abaixo da Figura 19.

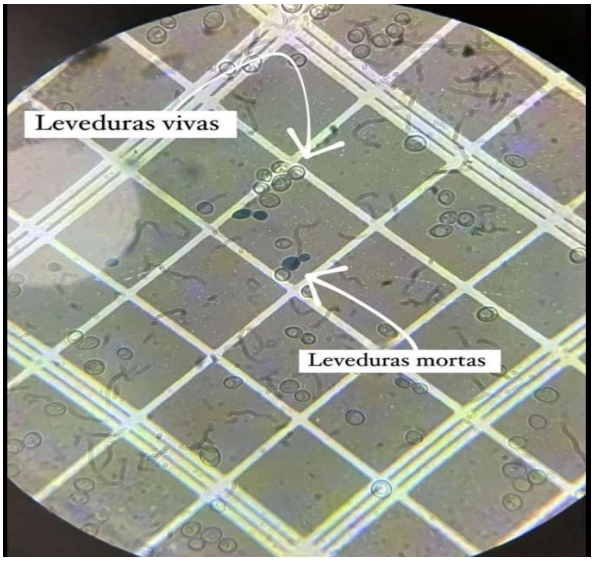
Figura 19: Coloração e contagem da amostra



Fonte: Scientia Plena, 2021.

Após contagem de células vivas e mortas dos quatro quadrantes laterais e do quadrante central, foi possível calcular a viabilidade celular do fermento através de uma fórmula que leva em consideração quantidade de células no total, comparada ao número de células mortas da amostra, como mostra a Figura 20 abaixo, onde o resultado se dá em porcentagem, a partir da quantidade de células por grama de fermento.

Figura 20: Contagem de células pelo microscópio



Fonte: Autora, 2022.

O parâmetro utilizado considera que a partir de 90% de viabilidade, o fermento está adequado para reutilização em um novo tanque de fermentação, utilizando, como exemplo de cálculo de viabilidade, a fórmula a seguir:

Equação 2: Viabilidade celular

% de viabilidade= (células vivas x 100)/ (células vivas + células mortas)

Fonte: De Fusco, 2019.

4.3.2 Fermentação forçada

O teste de fermentação forçada também é conhecido como teste de atenuação forçada. É realizado com a adição de uma amostra de fermento a uma amostra de mosto cervejeiro aerado, mantendo-os sob agitação constante de 100 RPM por 24

horas. Com este teste a amostra atinge sua atenuação máxima de extrato, sendo o valor de extrato aparente encontrado ligeiramente inferior ao extrato final da fermentação tradicional em um tanque de cervejaria industrial. Por isso o teste é chamado de teste de limite de atenuação.

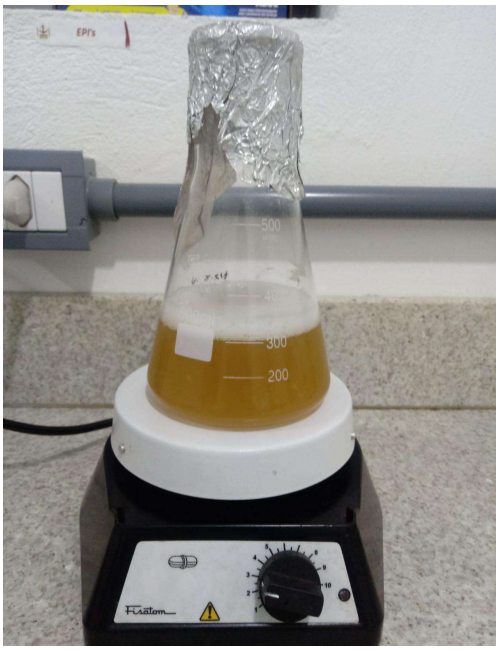
O protocolo de fermentação forçada foi realizado de acordo com a metodologia proposta por WHITE e ZAINSHEFF (2010).

Após coleta de fermento e mosto estéril, ambos foram inoculados com quantidade de lama suficiente para atenuação do extrato para o estilo em 24 horas, onde ao calcular a viabilidade do fermento e ele estando acima de 90%, é necessário em média 1 ml de fermento para 300 ml de mosto para atingir tal atenuação (Figura 21).

Essas quantidades foram postas em um erlenmeyer autoclavado onde foi mantido sob agitação por 24 horas e após esse período foi realizada a desgaseificação da amostra por três minutos em banho ultrassom e filtração da amostra com auxílio de terra diatomácea em filtro duplo.

Por fim foi realizada a leitura de extrato aparente da amostra com o equipamento Alex 500, específico para leitura de extrato e álcool de cerveja ao longo da fermentação, para verificação do decaimento do extrato e o poder atenuante do fermento para a quantidade de mosto, ambos em proporção do tanque fermentador original.

Figura 21: Teste de fermentação forçada



Fonte: Autora, 2022.

4.3.3 Análise microbiológica

Para a realização das análises microbiológicas das amostras, utilizou-se a cabine de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e luz UV e preparada com os materiais autoclavados necessários para realização das práticas em questão. Os meios de cultivos utilizados são meios seletivos para cerveja. O meio de cultivo WL contém o corante bromocresol, um indicador de pH que sinaliza a acidificação do meio e conforme o bromocresol é metabolizado, o meio se torna amarelado apresentando contaminação na amostra.

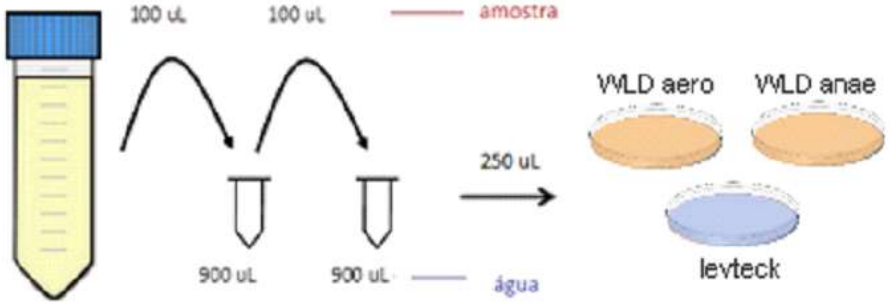
Ao meio de cultivo WL se adiciona um composto químico e antifúngico denominado cicloheximida, que impede o crescimento de leveduras Saccharomyces, tornando o meio WLD seletivo para leveduras selvagens e bactérias.

4.3.3.1 Plaqueamento da lama

Após coleta estéril do fermento, a amostra foi diluída em quantidades definidas, onde 0,1 mL da lama é diluída em 0,9mL de água destilada autoclavada, conforme esquema da Figura 22 a seguir, e plaqueada em meios de cultivo próprios para desenvolvimento de bactérias e leveduras selvagens.

O meio de cultivo WLD (Wallerstein Differential agar) é do tipo médio aeróbio, podendo ser utilizado também anaerobicamente. O organismo cultivado nesse meio pode ser levedura selvagem, bactérias, fungos e os organismos cervejeiros mais comuns de desenvolvimento são *Brettanomyces, Candida,* levedura selvagem tipo *Saccharomyces, Lactobacillus* e *Acetobacter* (WHITE, 2010).

Figura 22: Esquema de diluição e plaqueamento de lama

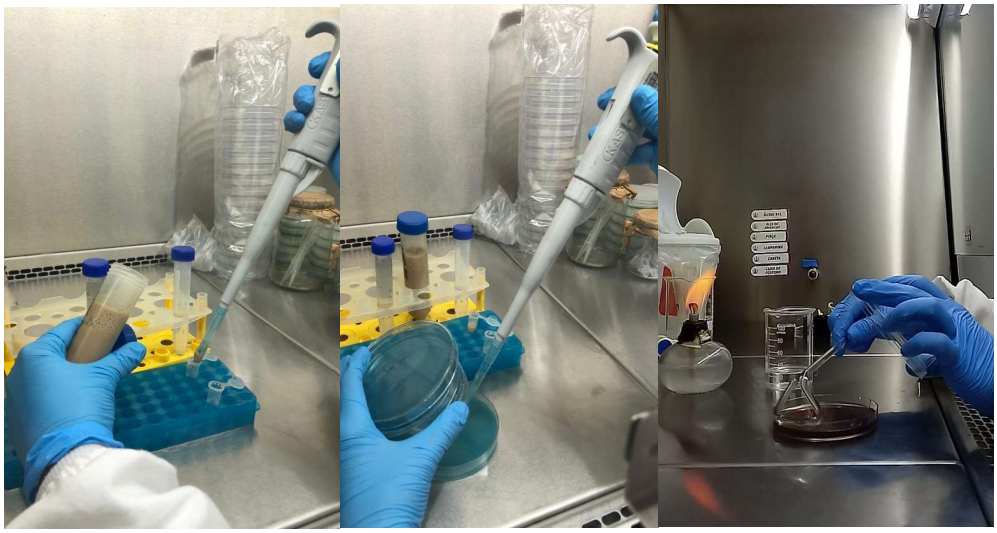


Fonte: Autora, 2022.

Foi realizado o método de semeadura em placa Spread-Plate, representado pela Figura 23, que consiste em adicionar o inóculo sob o meio já solidificado na placa estéril e realizar o espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalski, para obtenção de colônias isoladas após diluição, fazendo a semeadura por toda a superfície da placa de Petri WLD aeróbica, WLD anaeróbia e Levteck.

A placa WLD em aerobiose e a placa Levteck de crescimento de levedura selvagem foram incubadas por três dias a 30°C, e a placa WLD em anaerobiose foi incubada por 5 dias a 30°C.

Figura 23: Plaqueamento da lama



Fonte: Autora, 2022.

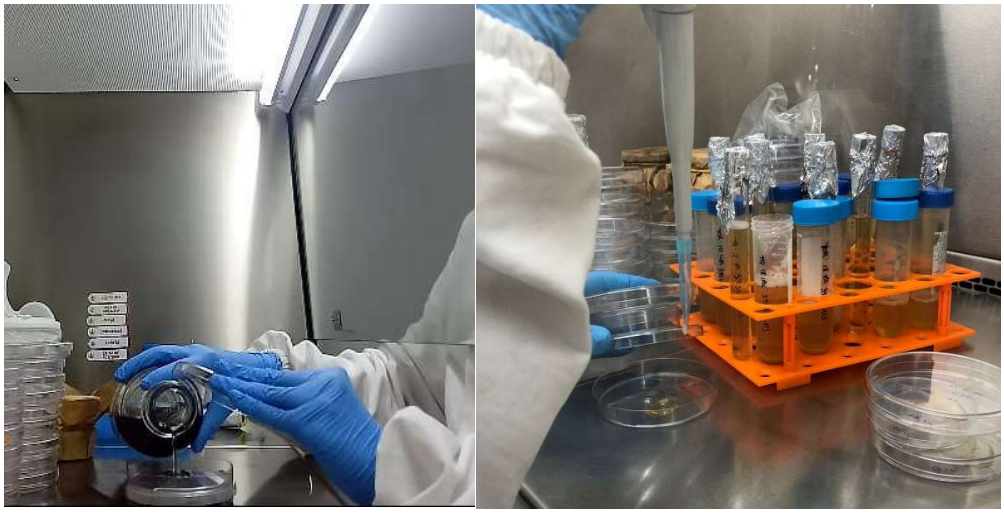
4.3.3.1 Plaqueamento do mosto

Foi realizado o plaqueamento da amostra de mosto coletada de forma estéril, sendo plaqueados 1 ml de amostra em meio de cultivo seletivo WL em placa aeróbica, 1 ml em meio de cultivo WL em placa anaeróbia, ambos para crescimento de bactérias e leveduras, e 1 ml de amostra em meio seletivo Macconkey para crescimento de enterobactérias.

O plaqueamento é realizado por Pour-Plate (Figura 24), que consiste na inoculação da amostra em profundidade, onde o inóculo é adicionado ao fundo da placa estéril, e em seguida o meio de cultura é vertido sobre a amostra. Por fim

realiza-se movimentos rotacionais para favorecer a difusão e a homogeneização da amostra.

Figura 24: Plaqueamento do mosto



Fonte: Autora, 2022.

Os meios de cultivo WL (Wallerstein Laboratory) seguem a fórmula descrita por Green e Gray para a análise microbiológica de amostras utilizadas na fabricação de cerveja e para fermentações industriais contendo flora mista de leveduras e bactérias (MERCK, 2022).

O meio de cultivo Macconkey é um meio diferencial que seleciona bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli, e inibe* o crescimento de bactérias gram-positivas devido ao cristal violeta e aos sais biliares. Esse meio contém dois aditivos que o diferenciam: vermelho neutro, sendo um indicador de pH e o dissacarídeo lactose (WHITE, 2010).

As placas Macconkey e WL em aerobiose foram incubadas a 30°C por 3 dias, e a placa WL em anaerobiose foi incubada por 5 dias a 30°C.

Para complementar a análise microbiológica do mosto, foi realizado o teste em tubo Durhan invertido em tubo de ensaio (Figura 25), ambos com amostra de mosto cervejeiro, para verificação de possíveis contaminantes que sejam capazes de fermentar o mosto antes mesmo da etapa de fermentação, como bactérias fermentativas e leveduras selvagens.

Os tubos foram incubados a 30°C por 5 dias e o resultado positivo pode ser visualizado com a formação de gás no tubo Durhan, além do turvamento do tubo de ensaio (FONTES, 2013).

Figura 25: Mosto em tubo duran

Fonte: Autora, 2022.

4.3.4 Monitoramento do tanque fermentador

O mosto, ao ser inserido no tanque fermentador, recebe também a quantidade ideal de levedura para fermentá-lo. O processo de fermentação alcoólica é monitorado desde o primeiro dia de atividade da levedura sobre o mosto até o fim dessa atividade.

O mosto da cerveja estilo Pilsen possui 11°P de extrato no início da fermentação, e o decaimento do extrato ocorre durante cerca de 7 dias. O que define se a fermentação terminou ou não, é a atenuação do mosto e sua estabilização.

Foram realizadas coleta e leitura de extrato de amostra do tanque uma vez ao dia, durante toda a fermentação de cada tanque. A coleta foi realizada em Erlenmeyer com leitura de temperatura e pressão do tanque durante a coleta. Foi realizada a desgaseificação da amostra por três minutos em banho ultrassom e filtração da amostra com auxílio de terra diatomácea em filtro duplo.

Por fim foi realizada a leitura de extrato aparente da amostra com o equipamento Alex 500, específico para leitura de extrato e álcool de cerveja ao longo da fermentação, para verificação do decaimento do extrato. Quando o tanque atinge seu valor ideal de atenuação de extrato, de 2 °P ± 0,3 ºP, a fermentação é finalizada, com a queda de temperatura, onde o tanque passa de fermentando para maturando.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros de atividade fermentativa da levedura

A Tabela 2 a seguir mostra a variação entre os 4 parâmetros testados no acompanhamento da atividade fermentativa da levedura *Saccharomyces pastorius* entre os ciclos de reutilização de zero a 10.

Tabela 2: Parâmetros testados para a levedura

Ciclo de reutilização	Viabilidade (%)	Atenuação do extrato na fermentação forçada (°P) em 24h	Controle microbiológico levedura*	Controle microbiológico mosto*
0	93,69	2	-	Zero
1	98,89	2,1	Zero	Zero
2	98,95	2	-	+
3	99,19	2,1	Zero	Zero
4	98,9	2,3	-	-
5	99,14	2,1	Zero	+
6	98,79	2,2	Zero	Zero
7	99,35	2,1	+	+
8	99,47	2,09	Zero	Zero
9	99,08	1,99	Zero	Zero
10	99,1	1,7	Zero	Zero

*Para a contaminação microbiológica utilizou-se a especificação de 10 UFC/mL, o Zero significando nenhuma contaminação microbiológica, o sinal positivo (+) significando contaminação acima da especificação e o sinal negativo (-) significando contaminação abaixo da especificação.

Fonte: Autora, 2022.

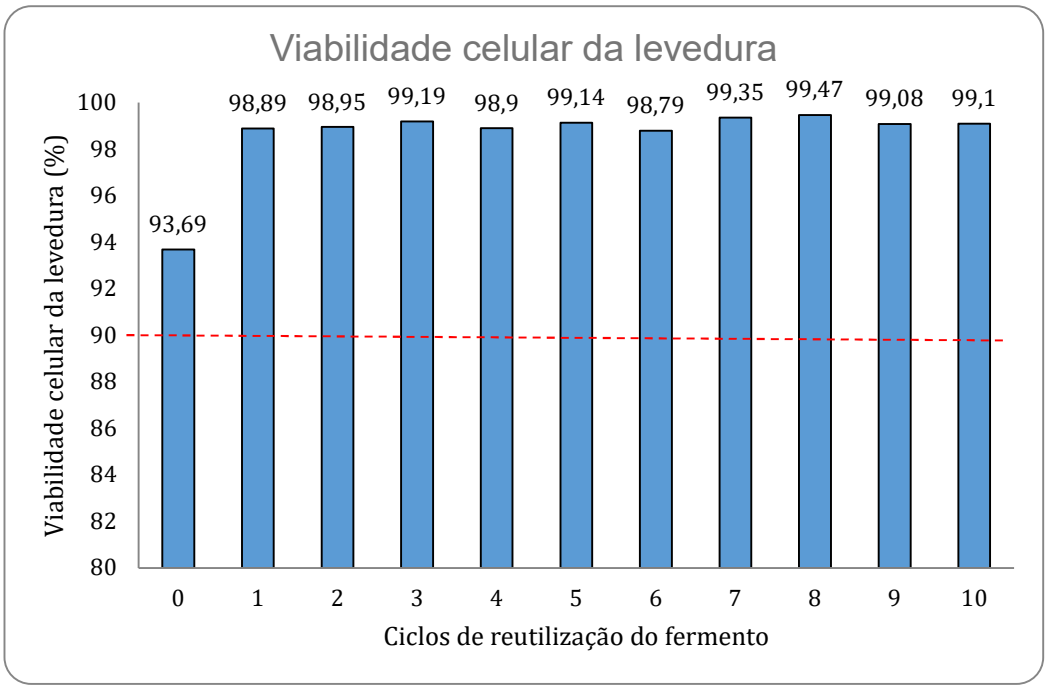
5.1.1 Viabilidade Celular

A viabilidade celular da levedura após sucessivas fermentações, demonstrou pequena variação entre os ciclos, conforme mostra a Figura 26. Tendo em vista a especificação de levedura em boas condições de reutilização se atingir acima de 90% de viabilidade, a quantidade de células viáveis variou de 93,69% na propagação a 99,47% no oitavo ciclo. Houve certa estabilidade na viabilidade da levedura, visto que não houve decréscimo e nem aumento extremo nos valores encontrados.

A viabilidade encontrada para a levedura na geração zero foi menor em relação aos ciclos de reutilização devido ao fato de que na propagação utilizou-se um volume

considerável de mosto como o meio de cultivo para a levedura, para auxiliá-la na sua multiplicação. Como a levedura encontrou-se em meio mais diluído, a contagem celular para 1 mL de amostra apresentou-se inferior, além do fato de se poder ter ocasionado uma maior presença de células mortas na amostra.

Figura 26: Viabilidade celular da levedura S. pastorius em relação aos ciclos de reutilização do fermento.



Fonte: Autora, 2022.

5.1.2 Fermentação forçada

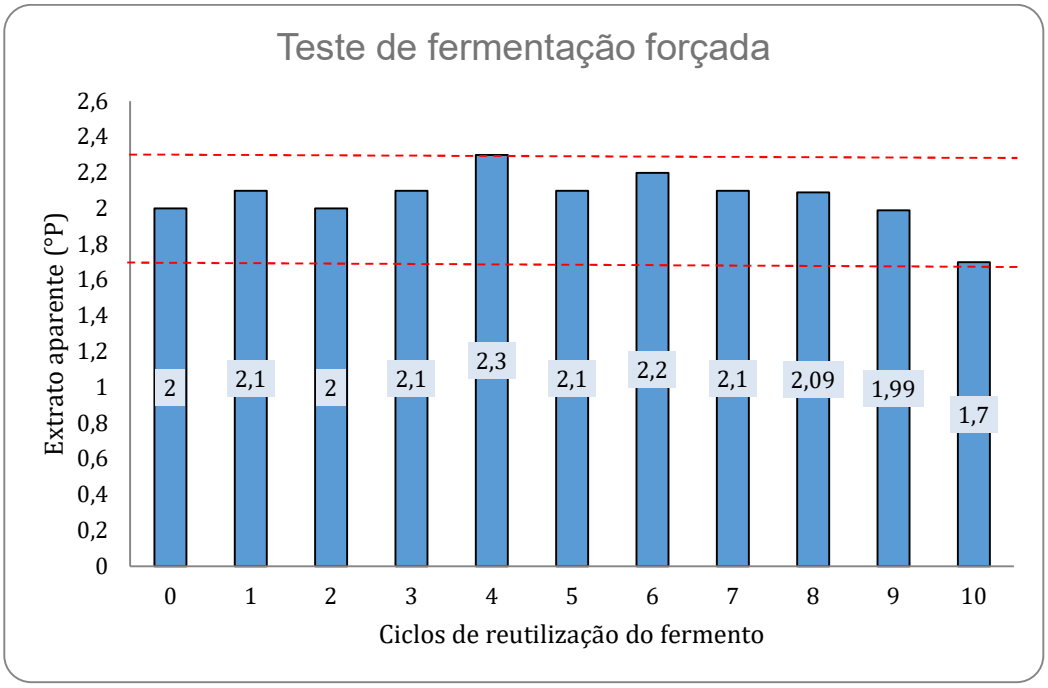
As condições para o teste de fermentação forçada foram 24 horas sob constante agitação em temperatura ambiente e ausência de oxigênio. Além disso, o volume de fermento e de mosto foram fixados, de acordo com a viabilidade da levedura, calculado em média 1 ml do fermento para 300 mL de mosto.

Essas quantidades foram padronizadas e utilizadas em todos os testes de fermentação forçada desde a geração zero até o décimo ciclo de reutilização da levedura.

O extrato aparente da cerveja estilo Pilsen é de 2 °P ± 0,3 ºP. Ao atenuar até esse valor de extrato, a fermentação é cessada com a queda de temperatura do tanque, que fermenta a 14°C e sofre a queda de temperatura para -1°C.

É destacável que todas as fermentações forçadas obtiveram extrato aparente dentro da faixa de especificação para o estilo, como mostra a Figura 27, onde houve variação durante as gerações e um leve decaimento nas últimas gerações do fermento, demonstrando uma maior atenuação de extrato para as últimas reutilizações da levedura.

Figura 27: Extrato aparente da fermentação forçada, em relação aos ciclos de reutilização do fermento.



Fonte: Autora, 2022

5.1.3 Controle microbiológico

O controle microbiológico realizado na levedura de reúso apresentou inocuidade na maioria das reutilizações do fermento. A levedura apresentou contaminação acima da especificada de 10 UFC/mL apenas no ciclo 7 de reutilização e nos demais ciclos manteve-se inócua, ou com contaminação abaixo da especificada de 10 UFC/mL.

As contaminações presentes na levedura podem ser *Lactobacillus* e *Bacillus* que competem com a levedura para consumo de nutrientes, podendo acarretar na perda de rendimento do fermento e seu poder atenuante. Porém pode ser visto que esse fator não ocasionou em grandes preocupações aos ciclos de reutilização subsequentes da levedura, não afetando sua viabilidade celular nem seu poder atenuante na fermentação forçada. O controle microbiológico realizado no mosto cervejeiro também se manteve inócuo em grande parte das produções, visto que apresentou contaminação acima do especificada de 10 UFC/mL nos ciclos 2, 5 e 7. As contaminações presentes no mosto podem ser preocupantes quanto a qualidade dos nutrientes fornecidos à levedura, como também podem ser contaminações

fermentescíveis para os açúcares presentes no mosto, afetando o desempenho da fermentação. Porém esse fator não comprometeu a ação da levedura, visto que os extratos do teste de fermentação forçada de todos os ciclos mantiveram-se dentro da sua especificação de 2 °P ± 0,3 ºP.

5.2 Parâmetros acompanhados no período de fermentação

A Tabela 3 a seguir mostra a variação entre os 4 parâmetros testados no acompanhamento do período de fermentação da cerveja estilo pilsen com a utilização da levedura *Saccharomyces pastorius* reutilizada entre a geração zero e a décima geração.

As condições de fermentação foram utilizações variadas de volume dos tanques fermentadores, visto que ao longo das gerações foram produzidas cervejas de diferentes volumes, variando de 7600 L até 55800 L de cerveja.

Porém, como todos os padrões ideais mantiveram-se coerentes do início ao fim das 11 fermentações. Ambos os tanques iniciaram sua fermentação a 11°C com pressões de 0 a 1 KgF e ausência de oxigênio, em tanques de inox higienizados e controlados. A quantidade de fermento reutilizável enviado para um novo tanque fermentador variou com a viabilidade da levedura e também o volume de mosto presente no tanque.

Tabela 3: Parâmetros testados durante a fermentação

Ciclo	Viabilidade (%)	Atenuação (°P)	Tempo (dias)	Quantidade reutilizada (L)	Quantidade de mosto fermentador (L)	Pressão máxima e temperatura	Controle microbiológico*
0	93,69	2,4	8	277	7600	0,5 KgF 12°C ± 2,1°C	-
1	98,89	2,2	7	160	18000	1,4 KgF 12,5°C ± 1,6°C	Zero
2	98,95	2,4	7	204	55800	1,2 KgF 12,5°C ± 2°C	Zero
3	99,19	2,3	6	261	55800	1 KgF 13,2°C ± 1,7°C	Zero
4	98,9	2,2	7	214	55800	1,4 KgF 12,9°C ± 1,9°C	Zero
5	99,14	2,18	8	124	18600	1,4 KgF 12,5°C ± 1,6°C	Zero
6	98,79	2,22	7	197	55800	1 KgF 12,5°C ± 2°C	Zero
7	99,35	2,15	6	209	55800	1,4 Kg 12,8°C ± 1,3°C	-
8	99,47	2,11	9	170	55800	1,2 KgF 12,8°C ± 2,3°C	-
9	99,08	2,1	7	223	55800	1 KgF 10°C a 14,4°C	Zero
10	99,1	2,1	8	78	18600	1 KgF 10 °C a 14,5°C	Zero

*Para a contaminação microbiológica utilizou-se a especificação de 10 UFC/mL, o Zero significando nenhuma contaminação microbiológica e o sinal negativo (-) significando contaminação abaixo da especificação.

Fonte: Autora, 2022.

5.2.1 Condições de fermentação

Durante a reutilização em 10 ciclos do fermento *S. pastorius*, ambos os tanques possuíram o mesmo tipo de mosto Lager, com as mesmas condições ideais de faixa de temperatura (de 10 °C a 15 °C) e pressão (0 a 2 KgF). Porém para cada reutilização foram inseridas diferentes quantidades de mosto, e diferentes quantidades de fermento.

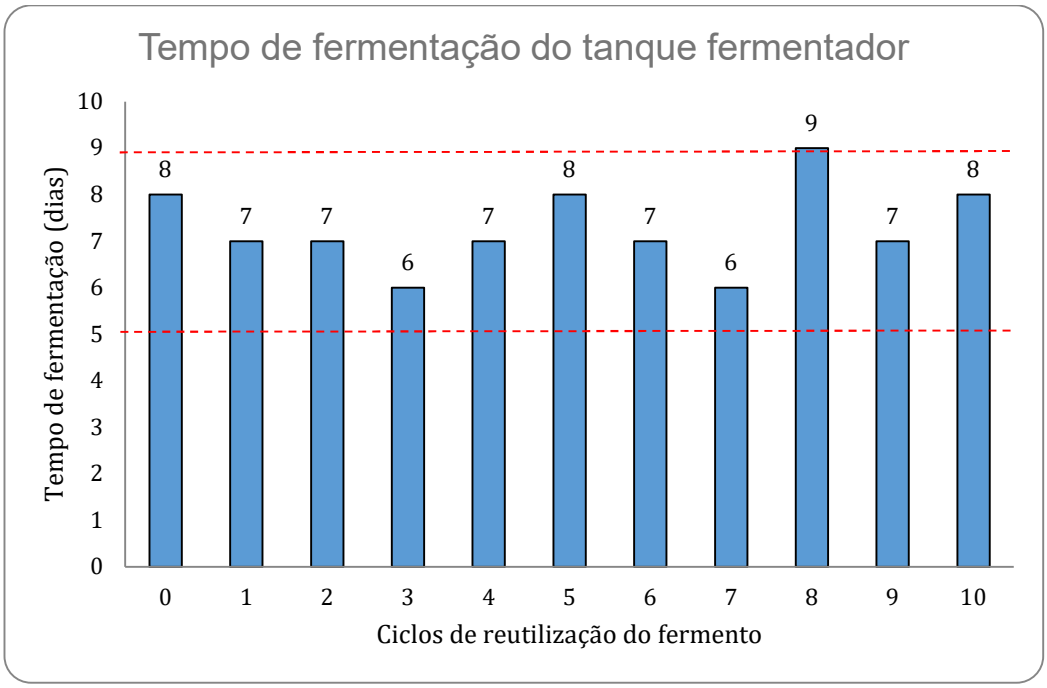
A quantidade de mosto foi determinada a partir da demanda de produção da cerveja Pilsen, variando a cada semana. A partir da quantidade de mosto e da viabilidade celular da levedura determinou-se a quantidade de fermento a ser reutilizado para a fermentação.

5.2.2 Tempo de fermentação

Na Figura 28 é possível verificar a variação no número de dias necessários para a fermentação completa de cada tanque, visto que as cervejas Lager possuem fermentação baixa e podem levar, em média, 7 dias.

Nas gerações 3 e 7 o tanque necessitou de menos tempo para a levedura atenuar o extrato aparente e realizar o repouso do diacetil, porém na geração 8 a cerveja precisou fermentar por mais tempo para tal atenuação e repouso.

Figura 28: Tempo de fermentação em relação aos ciclos de reutilização do fermento.

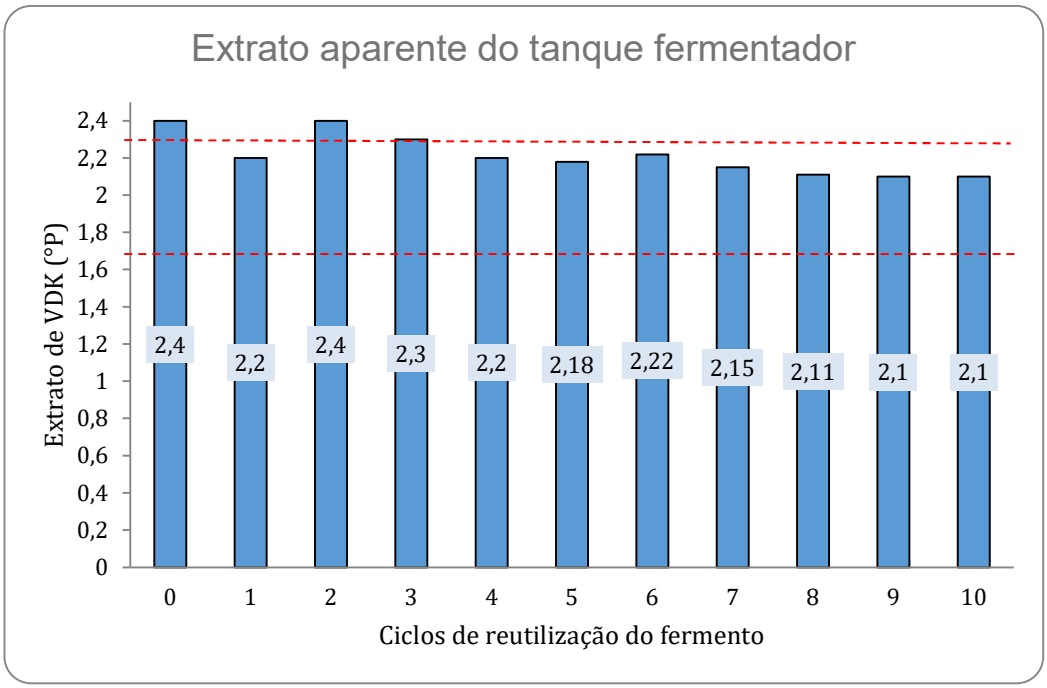


Fonte: Autora, 2022.

5.2.3 Atenuação do extrato aparente

O extrato aparente para as gerações zero e dois ficou acima da especificação para o estilo, como mostra a Figura 29, mesmo fermentando em condições ideais e quantidades adequadas de fermento, além de não ter sido encontrado qualquer contaminação na fermentação. Porém, nas últimas gerações foi possível notar melhor atenuação de extrato.

Figura 29: Atenuação do extrato aparente em relação aos ciclos de reutilização do fermento.



Fonte: Autora, 2022.

Para o controle microbiológico na fermentação de todos os tanques pode-se perceber, com mostra a Tabela 2, que a fermentação de todas as gerações se manteve controlada em relação à contaminação microbiológica.

Foram analisados sensorialmente o produto final de cada batelada sob reutilização das leveduras testadas, onde nenhum produto apresentou *off-flavor* gerado por ação de levedura ou do processo que a envolve.

5.3 Análise comparativa de resultados

De acordo com o trabalho desenvolvido por Suhre (2014) ao analisar apenas quatro gerações da levedura, foi perceptível uma diminuição seguida de um aumento no parâmetro estudado, visto que nos quatro ciclos a viabilidade celular manteve-se acima de 97%. Durante o reaproveitamento de leveduras, além da viabilidade celular da levedura foram analisados também a vitalidade e as características de floculação particulares de cada cepa. Os resultados encontrados na pesquisa de Suhre foram satisfatórios em comparação aos resultados encontrados na presente pesquisa, visto que ambos mantiveram suas viabilidades acima do limite mínimo considerado para que a levedura esteja apta à reutilização, de 90%. Como perspectivas tem-se a necessidade de estudo de mais gerações de reutilização, visto que a presente pesquisa apresenta duas vezes mais reutilizações para a mesma cepa.

De acordo com o trabalho desenvolvido por Luarasei, Troja e Pinguli (2017) com objetivo de monitorar a viabilidade celular de uma cepa de levedura S. *pastorius*, ao longo das reutilizações das leveduras na cervejaria, foi representada a variação da viabilidade celular no decorrer de nove gerações.

A pesquisa mostrou diferentes níveis de viabilidade entre as diferentes gerações de levedura. Nas primeiras quatro gerações a viabilidade permanece aproximadamente constante em 85%. As gerações sucessivas apresentaram uma ligeira diminuição do valor médio de viabilidade, sendo próximo de 81%, porém nas últimas gerações a viabilidade celular foi de 87% em média. Os resultados da pesquisa realizada por Luarasei, Troja e Pinguli não foram satisfatórios comparados aos da presente pesquisa, visto que todas as gerações da levedura mantiveram-se abaixo do limite mínimo de 90% para ser apta a reutilização, porém pode ser concluído que apesar da viabilidade ser considerada inferior à ideal, os resultados não foram significativos, visto que em todas as reutilizações, a fermentação ocorreu de forma eficiente.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista a contribuição do reaproveitamento da biomassa na atividade de fabricação de cerveja e também para diminuição de custos e impactos ambientais, o presente projeto mostrou a possibilidade de produzir cerveja a partir da utilização subsequente de levedura de fermentações antecedentes. Apesar dos métodos utilizados para avaliar os parâmetros que comportam a levedura serem adaptados às condições industriais, sem a possibilidade de acompanhamentos mais específicos, tais como, como testes duplicatas/triplicatas e análises mais sofisticadas de cada etapa do processo de reaproveitamento do fermento cervejeiro, ainda assim são os métodos mais utilizados nas cervejarias.

Os objetivos estipulados no projeto foram alcançados, visto que foram acompanhados os 10 ciclos de reutilização da levedura, podendo concluir que a levedura se manteve apta a reutilização até o último ciclo de reaproveitamento.

Entretanto, é possível verificar a necessidade de aprofundamento dos dados obtidos, além do desenvolvimento de demais análises fundamentais que envolvam a levedura como um todo. Buscando assim, desenvolver técnicas de análise de vitalidade e possíveis tratamentos para levedura que será reaproveitada para aplicação nas condições industriais de fermentação/produção de cerveja. As perspectivas para o projeto incluem a avaliação de novas bateladas de levedura propagada e suas reutilizações, a fim de possuir um maior número de resultados, a partir do aprimoramento de demais metodologias utilizadas.

7 REFERÊNCIAS

ALVARAES, Dafne Varanda; FERREIRA, Paula Isis Batista Lebre. **Avaliação e aplicabilidade do enxágue e lavagem ácida para reutilização de leveduras em cervejarias.** Disponível em https://app.uff.br/riuff/handle/1/7101 Acesso em 18 Nov 2022.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação.** São Paulo: Edgard Blucher, 1983. 227p. Acesso em 31 Ago 2022.

ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. **Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23, n.2, p.121-128, 2003.

BARBOSA, Marina. **Produção brasileira de cerveja sobe 2,9 pontos em 2020 e retoma patamar de 2014.** Disponível em: .https://www.poder360.com.br/economia/producao-brasileira-de-cerveja-sobe-29-pontos-em-2020-e-retoma-patamar-de-2014/#:~:text=A%20expectativa%20do%20setor%20%C3%A9,China%20e%20dos%20Estados%20Unidos. Acesso em 14 Jul 2022.

BODAS, Álvaro. **Cerveja artesanal tem mercado quente para empreender e carreiras em alta.** Disponível em:

https://vocesa.abril.com.br/empreendedorismo/mercado-de-cervejas-artesanais/ Acesso em: 14 Jul 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Anuário da Cerveja 2021**. Brasília: MAPA/DAS, 2022. 36p. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/arquivos/anuario-da-cerveja-2021.pdf. Acesso em: 24 Nov 2022

BRIGGS, Dennis E.; BOULTON, Chris A.; BROOKES, Peter A.; STEVENS, Roger. **Brewing**: science and practice. Abington: Woodhead Publishing Limited, 2004. 881 p. Acesso em 12 Out 2022.

BSI. **Yeast Stress & Viability.** Disponível em: https://brewingscience.com/yeast-stress-viability/ Acesso em 13 Jul 2022.

CARVALHO, GBM; DRAGONE, G; BENTO, CV; SANTOS, DT; SARROUH, BF; FELIPE, MGA; ALMEIDA E SILVA, JB. **Utilização da banana como adjunto na obtenção de mosto cervejeiro de alta densidade: um estudo para fim biotecnológico clássico inédito.** Disponível em: Congresso Mineiro de Propriedade Intelectual, Agosto 9-11, UFJF, Juiz de Fora - MG, 2006. Acesso em: 05 Jun 2022.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. **Elementos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1ª parte- As leveduras.** Revista Analítica. São Paulo, 2006. Acesso em 21 Mai 2022.

CENTRAL BREW. **O tipo da água influencia no processo de produção da cerveja?** Disponível em: https://centralbrew.com.br/blog/o-tipo-da-agua-influencia-no-processo-de-producao-da-cerveja/ Acesso em 12 Out 2022.

CERVBRASIL. Anuário da Cerveja 2020. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/http-www-cervbrasil-org-br-novo_site-wp-content-uploads-2021-04-anuariocerveja2-pdf/ Acesso em 28 Mai 2022.

CERVBRASIL**. Dados do Setor.** Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/paginas/index.php?page=dados-do-setor. Acesso em: 05 Abr 2022.

DAVIS, Kory. Yeast Stress & Viability. The Brewing Science Institute. Disponível em: https://brewingscience.com/yeast-stress-viability/ Acesso em 19 Mai 2022.

DE FUSCO, Deborah Oliveira et al. Development of low-alcohol isotonic beer by interrupted fermentation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 7, p. 2416-2424, 2019.

DE OLIVEIRA, A. M. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja.**

2011. 45 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Ambiental e Industrial) - Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade

Federal de Minas Gerais. 2011. Disponível em: http://microbiologia.icb.ufmg.br/monografias/195.PDF Acesso em: 11 Out 2022.

DE OLIVEIRA, Nayara Aline Muniz. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja.** Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-99VHHA Acesso em 17 set 2022.

DRAGONE, G. ALMEIDA e SILVA, J.B. In: VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas Alcoólicas: Ciências e tecnologia.** V.1. São Paulo: Edgard Blücher, 2010.

DRAGONE, G; SILVA, DP; ALMEIDA E SILVA, JB. I**nfluência da Concentração do Mosto na Produção em Escala Piloto de Cervejas pelo Processo "High Gravity".** Engarrafador Moderno. p. 30-35, 2003.

ECB Analytica 3.1.1.1 **HAEMOCYTOMETRY**– 2011 e 3.2.1.1 **METHYLENE BLUE/VIOLET STAIN**– 2011 Acesso em 13 Jul 2022.

EISENBAHN. **A importância da água na cerveja.** Disponível em: http://mestrecervejeiro9.globo.com/faca-sua-cerveja/importancia-da-agua-na-cerveja.html Acesso em 12 Out 2022.

ENCICLOPÉDIA Barsa. Rio de Janeiro. **Encyclopaedia Britannica, c1974.** 15v Acesso em 21 Out 2022.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. **Beer in Brazil.** Disponível em: https://www.euromonitor.com/beer-in-brazil/report Acesso em 04 Set 2022.

FILHO, José Alves R.; VITOLO, Michele. **Guia para aulas práticas de biotecnologia de enzimas e fermentação**. Editora Blucher, 2017. 9788521211693. Disponível em: https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521211693/. Acesso em: 22 abr. 2022.

FONTES, Luiz. **Bancada Pronta.** Disponível em: https://bancadapronta.wordpress.com/2013/09/03/analises-de-coliformes-por-tubos-multiplos/ Acesso em 07 Set 2022.

HARDWICK, W. A. **The properties of beer.** In: HARDWICK, W. A.(Ed.). Handbook of brewing. New York: Marcel Dekker, 1995. Cap.19, p.551-585.

HELD, P. **Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of Saccharomyces Cerevisiae.** 2010. Disponível em: <http://www.biotek.com/resources/articles/beer-brewing-synergyh1-yeast-growth.html> Acesso em: 11 Abr 2022.

JUNIOR, Amaro AD, Antonia G. Vieira, and Taciano P. Ferreira. **"Processo de produção de cerveja."** *Revista Processos Químicos* 3.6 (2009): 61-71. Acesso em 12 Jul 2022.

KLEIN, Bruna. **Biotecnologia - Processos Fermentativos.** Curso de Formação Inicial e Continuada (FIC) EaD Cervejeiro. Instituto Federal Farroupilha – Campus Júlio de Castilhos

KLEY, André. **Leveduras: o que é e qual a importância do fermento cervejeiro na sua produção.** Disponível em: https://www.comofazercerveja.com.br/post/leveduras-o-que-e-qual-a-importancia-do-fermento-cervejeiro Acesso em 12 Jul 2022.

KUNZE, W. (1999). **Technology Brewing and Malting** (2.ª ed.). Berlim (Alemanha): VLB Berlin. Acesso em 12 Out 2022.

LALLEMAND BREWING. **FOLHA DE DADOS TÉCNICOS - DIAMOND LEVEDURA DE CERVEJA TIPO LAGER.** Disponível em: file:///C:/Users/Carolaine/Downloads/lallemand-tds-diamond-por.pdf Acesso em 16 Jul 2022.

LEI Nº 8.918, DE 14 DE JULHO DE 1994 - Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8918.htm#:~:text=LEI%20N%C2%BA%208.918%2C%20DE%2014%20DE%20JULHO%20DE%201994.&text=Disp%C3%B5e%20sobre%20a%20padroniza%C3%A7%C3%A3o%2C%20a,Bebidas%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%AAncias. Acesso em 12 Mai 2022.

LEGISLAÇÃO INFORMATIZADA - **DECRETO Nº 2.314, DE 4 DE SETEMBRO DE 1997** - PUBLICAÇÃO ORIGINAL https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1997/decreto-2314-4-setembro-1997-437216-publicacaooriginal-1-pe.html ACESSO EM 12 MAI 2022.

MARCONDES, Lígia. **Moagem do Malte.** Disponível em: https://www.agraria.com.br/extranet_2016/uploads/AgromalteArquivo/01_moagem_jornada_8h_1601583349089.pdf Acesso em 12 Out 2022.

MENEZES, Maria Carolina Rafael Carneiro de. **Controle de qualidade em uma cervejaria artesanal: análise de contaminantes do processo de fabricação e eficácia do sistema.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Brasil. Acesso em 21 Jun 2022.

MERCK, KGaA. **WL Nutrient Agar.** Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/17222?gclid=Cj0KCQjwguGYBhD

RARIsAHgRm49dTtMh-M7bG2_qikz4VudD-L3nIwDu5jCEGmSKiNDST2LZK9QKaq8aAtCIEALw_wcB Acesso em 07 Set 2022.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: **Anuário da cerveja 2020**. MAPA/SDA. Acesso em 21 Jun 2022.

OLIVER, Garret. **A Mesa do Mestre Cervejeiro.** 1ª edição. Editora SENAC São Paulo, 2012.

OLIVER, Garrett. **O Guia Oxford da Cerveja**. Editora Blucher, 2020. E-book. ISBN 9786555060010. Disponível em: https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786555060010/. Acesso em: 29 set. 2022.

OLIVEIRA, Vanessa da G. **Processos Biotecnológicos Industriais - Produção de Bens de Consumo com o uso de Fungos e Bactérias**. Editora Saraiva, 2015. 9788536520025. Disponível em: https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536520025/. Acesso em: 20 mai. 2022.

OSHIO, Raquel. **Fermentação: o que é, tipos e como ocorre nos organismos anaeróbicos.** Disponível em: https://vestibulares.estrategia.com/portal/materias/biologia/fermentacao/ Acesso em 13 Jul 2022.

PALMER, J. J. **How To Brew.** 3 ed. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2006. Acesso em 20 Mai 2022.

PANTANERO. **Alfa e beta amilase.** Disponível em: http://destiladoresbrasil.blogspot.com/2018/07/ Acesso em 16 Jul 2022.

PEREIRA, et. Al. **FACTORS AFFECTING ALCOHOLIC FERMENTATION.** Disponível em**:**

https://citec.fatecjab.edu.br › article › download Acesso em: 16 Jul 2022.

PICCINI, Ana Rita; MORESCO, Cristiano e MUNHOS, Larissa. **A FEIRA - CERVEJA.** Disponível em: https://www.ufrgs.br/alimentus1/feira/prcerea/cerveja/defini.htm Acesso em 12 Jul 2022.

PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; BRÁNYIK,T.; et al. **Yeast: the soul of beer'saroma - a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast.** Applied microbiology and biotechnology, 2014, v. 98, p. 1937-1949. Acesso em 20 Mai 2022.

REBELLO, F. D. F. P. (2009). **Produção de cerveja.** *Revista Agrogeoambiental*, *1*(3). https://doi.org/10.18406/2316-1817v1n32009224

SAITO, Fabiana Heloisa Sanches Ferrato. **Utilização de fermento de descarte de cervejaria na produção de aguardente de Licor de laranja.** 2007. Disponível em https://repositorio.unesp.br/handle/11449/88577 Acesso em 31 Ago 2022.

SANTOS, M. S. dos. **Produção de cerveja. Cervejas e refrigerantes.** 21 ed. São Paulo: CETESB, 2005. p. 16. Cap 3. Acesso em 12 Jul 2022.

SANTOS, A.M. **Estudo das influências da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada.** 2008. 77f. Tese (Doutorado em química e biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2008. Acesso em 19 Mai 2022.

SCHLENK, F. **Early research on fermentation – a story of missed opportunities.** Trends Biochem Sciences, 1985, v. 10, p. 252-254. Acesso em 19 Mai 2022.

SMART, KA, Chambers, KM, Lambert, I., Jenkins, C., & Smart, CA (1999). **Uso de procedimentos de coloração com violeta de metileno para determinar a viabilidade e vitalidade da levedura.** Jornal da Sociedade Americana de Químicos de Cerveja, 57(1), 18-23. doi:10.1094/asbcj-57-0018 Acesso em 19 Mai 2022.

SILVA, Álvaro. **MERCADO DE CERVEJA ARTESANAL ACOMPANHA A EVOLUÇÃO DO SHOPPER PARA INOVAR E CRESCER.** Disponível em: https://clubedotrade.com.br/blog/mercado-de-cerveja-artesanal/#:~:text=O%20mercado%20de%20cerveja%20artesanal%20%C3%A9%20um%20dos%20mais%20tradicionais,log%C3%ADstica%2C%20maquin%C3%A1rio%20e%20constru%C3%A7%C3%A3o%20civil. Acesso em 14 Jul 2022.

SILVA, Nicoly Souza Remor. **ANÁLISE DO REUSO DE LEVEDURAS NO PROCESSO PRODUTIVO DE CERVEJAS ARTESANAIS.** Disponível em:

https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/4137 Acesso em: 05 Jun 2022.

SIMPSON, W. J.; HAMMOND, J. R. M. **The Response of Brewing Yeasts to Acid Washing**. Journal of The Institute of Brewing, [s.l.], v. 95, n. 5, p.347-354, 10 set. 1989. Wiley-Blackwell. Acesso em 19 Mai 2022.

SINDICERV, Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. **Anuário da Cerveja 2021.** Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/arquivos/anuario-da-cerveja-2021.pdf/ Acesso em 04 Set 2022.

SINDICERV, Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. **Brasil chega a 1.549 cervejarias registradas no Mapa.** Disponível em https://www.sindicerv.com.br/noticias/brasil-chega-a-1-549-cervejarias-registradas-no-mapa/ Acesso em 31 Ago 2022.

SINDICERV, Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. **O Setor em Números.** Disponível em: https://www.sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros/# Acesso em: 21 Mai 2022.

STEWART, G. G.; RUSSEL, I. **An introduction to brewing Science & Technology: series III: brewer´s yeast**. London: The Institute of brewing, 108p. 1998.

SILVA, Nicoly Souza Remor. **ANÁLISE DO REUSO DE LEVEDURAS NO PROCESSO PRODUTIVO DE CERVEJAS ARTESANAIS.** Disponível em: https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/4137 Acesso em: 05 Jun 2022.

SUHRE, T. **Controle de Qualidade em Microcervejarias: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras**. 2014. 48 f. Monografia (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. Acesso em 05 Jun 2022.

TELEGINSKI, Fábio. **MOAGEM: RENDIMENTO DO MALTE E RESULTADOS INDUSTRIAIS.** Disponível em: https://www.agraria.com.br/extranet_2016/uploads/AgromalteArquivo/palestra_3___moagem_de_malte_1596198622627.pdf Acesso em: 12 Out 2022.

TELINI, Bianca; MENONCIN, Marcelo. **Curso online: Levedura.** KRATER - Livro sobre cerveja. Acesso em 12 Out 2022.

TORRES, Larissa. **Cervejas Artesanais: Mercado Pós-Pandemia.** Disponível em: https://gepea.com.br/cervejas-artesanais/ Acesso em 14 Jul 2022.

TOSETTO, G.M. **Comportamento de linhagens industriais de Saccharomyces frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. 2008, 258f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008. Acesso em 19 Mai 2022.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas**. Espanha: Acribia, 1997. 487p. Acesso em 19 Mai 2022

VENTURINI FILHO, W. G. (coord.). **Bebidas alcoólicas**: ciência e tecnologia. São Paulo: Blucher, 2010. Acesso em 19 Mai 2022.

VENTURINI, W. G. F.; CEREDA, M. P. W. Cerveja. In: **Biotecnologia Industrial - Biotecnologia na produção de alimentos.** V. 4, São Paulo: Edgard Blucher, 2008. Cap. 4, p. 91-144. Acesso em 19 Mai 2022.

WEYERMANN Maltes Especiais. **Craft Bier Trend Cervejas Sour** - Agrária Workshop Brasil 2017. Disponível em: https://docplayer.com.br/66951372-Weyermann-maltes-especiais.html Acesso em 12 Out 2022.

WHITE, C.; ZAINSHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2010. Acesso em 13 Jul 2022.