

## Avaliação do desempenho celular da levedura *Saccharomyces pastorianus* no reaproveitamento do fermento cervejeiro<sup>1</sup>

### *Evaluation of the cellular performance of the yeast *Saccharomyces pastorianus* in the reuso of the brewing yeast*

Carolaine da Silva Gomes<sup>2</sup>

#### Resumo

A produção mundial de cerveja tem aumentado nos últimos anos, e cerveja artesanal tem ganhado, cada vez mais, espaço nesse cenário. A levedura cervejeira, além de converter açúcar em etanol e gás carbônico em anaerobiose, também possui a capacidade de multiplicar sua biomassa, através da via aeróbia. Dessa forma, ela pode ser mantida e reutilizada, se estiver em condições ideais, em diversos ciclos de fermentação da cerveja; fator importante, porque as empresas se preocupam com questões ambientais e custo de produção. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade fermentativa de uma levedura no processo de reutilização do fermento cervejeiro, por meio da avaliação de viabilidade celular e suas condições de reuso em escala industrial de uma cervejaria artesanal que utiliza seu fermento por até dez (10) ciclos de utilização/fermentação. A partir dos resultados, tem-se que os objetivos foram alcançados, concluindo-se que a levedura se manteve apta a reutilização até o último 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 beer has increased in recent years, and craft beer has been gaining more and more space in this scenario. The brewing yeast, in addition to converting sugar into ethanol and carbon dioxide in anaerobiosis, also has the ability to multiply its biomass, through the aerobic via. Thus, it can be maintained and reused, if it is in ideal conditions, in several cycles of beer fermentation; an important factor, because companies are concerned about environmental issues and production cost. The present work aimed to evaluate the fermentative activity of a yeast in the process of reuse of the brewing yeast, through the evaluation of cell viability and its reuse conditions in an industrial scale of a craft brewery that uses its yeast for up to ten (10) cycles of use/fermentation. From the results, the objectives were achieved, concluding that the yeast remained suitable for reuse until the last cycle, however, there is the need for development and deepening of new methods of yeast analysis for complete verification of yeast quality.*

**Keywords:** beer; fermentation; yeast.

<sup>1</sup> Resumo do trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Departamento de Nutrição da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil, para a obtenção do grau de Tecnólogo em Alimentos, sob a orientação do Prof. Dr. Juliano Garavaglia, em 19.12.2022.

<sup>2</sup> Tecnóloga em Alimentos pela UFCSPA e técnica em Química pela Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha (FETLSVC), Novo Hamburgo, RS. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3880-7894>. E-mail: carolaine.gomes@ufcspa.edu.br

Artigo recebido em 06.03.2023 e aceito em 02.05.2023.



## 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 (BRASIL, 2020) e, em relação à essa porcentagem, houve um aumento de 12% no ano de 2021 (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2022).

A participação das cervejarias nesse 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).

O processo produtivo da cerveja Pilsen inicia na brassagem, onde passa pelas seguintes etapas: malteação da cevada, processo no qual o grão é germinado com ação de enzimas; moagem do malte que tem por finalidade reduzir o grão de cevada, através da quebra do amido; mosturação, onde os açúcares menores, provenientes da moagem, são convertidos do amido, por meio de reações enzimáticas que ocorrem na mistura de grãos com a água; clarificação e filtração, tendo por objetivo a separação do bagaço de malte do mosto líquido, evitando o arraste desses sólidos para as próximas etapas; fervura e tratamento do mosto, onde ocorre a inativação de enzimas e a volatilização de substâncias indesejáveis; *whirlpool*, que atua como um filtro e precipita o *trub*, ou seja, são os sedimentos separados do mosto; resfriamento e aeração do mosto. Após a brassagem do mosto, o mesmo é enviado para a etapa de fermentação e maturação, seguindo para ajustes finais e envase (OLIVER, 2012, p. 28).

Na etapa de fermentação, 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; BENTO; SILVA, 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; MORESCO; MUNHOZ, 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, que se refere a quantidades de células viáveis (vivas), presentes na cepa, quando comparada à quantidade de células mortas, quanto o número de reutilizações no processo. Recomenda-se que a reutilização de fermento não ultrapasse cinco (5) ciclos de reutilização, com viabilidade acima de 90%, 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 cinco (5) a nove (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. Esses 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 desse 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 dez (10) ciclos de utilização/fermentação.

## 2 Desenvolvimento

Foi realizado o método de viabilidade celular e o teste de fermentação forçada em amostras de fermento reutilizados, em até dez (10) 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 dez (10) gerações subsequentes, utilizou-se, a cada geração, o mosto estéril do estilo Pilsen, coletado durante a transferência do mosto resfriado e aerado para o tanque fermentador. A levedura em teste foi utilizada por dez (10) gerações, visto que nas condições industriais, estabelecidas o limite de reutilização se dá por até dez (10) vezes, não prolongando seu uso e propagando um novo lote do fermento para um novo ciclo de reutilização por batelada.

### 2.1 Coleta de amostra estéril

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 cilíndricos. Essa perda de viabilidade pode ser muito rápida, então o melhor momento para coletar a levedura do fundo do tanque é de um (1) a dois (2) 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, representada na figura 1, 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* que são micropartículas sedimentadas do processo fermentativo. 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 (2) frascos estéreis de 50 mL, o primeiro frasco, para a contagem celular e cálculo de viabilidade, utilizou-se cerca de (um) 1 mL de amostra, enquanto a amostra do segundo frasco foi utilizada para o plaqueamento em fluxo laminar e controle microbiológico, com cerca de 0,1 mL de amostra.

Figura 1 – Coleta estéril de lama

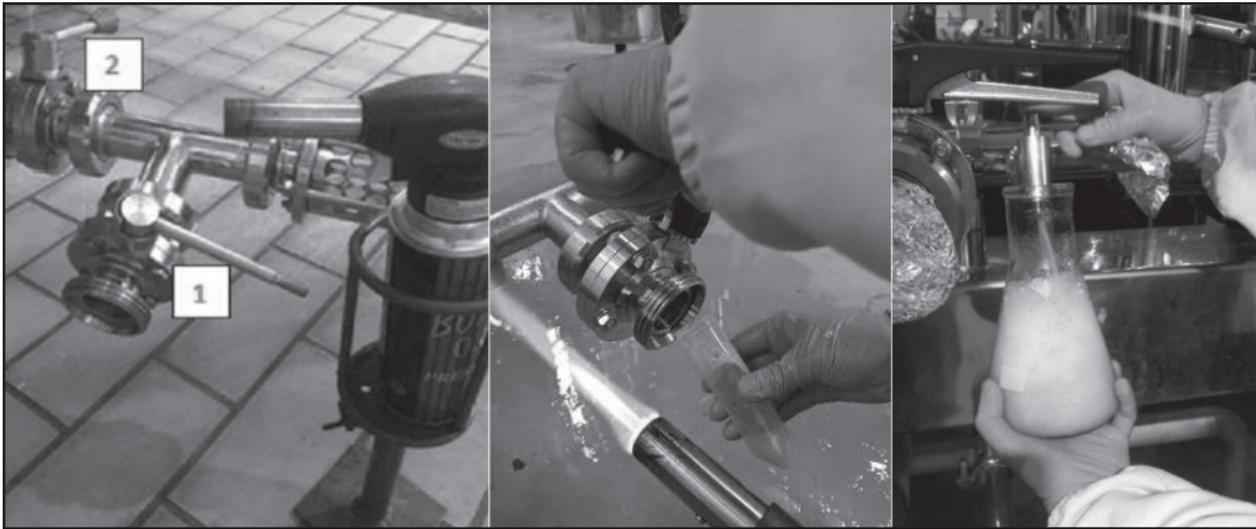


Fonte: A autora (2022).

A coleta de mosto estéril foi realizada, logo após a brassagem do mesmo, no qual foi transferido por tubulação até o tanque fermentador. A amostra foi coletada na válvula inferior do tanque fermentador, durante a transferência do mosto para o tanque. Como mostra a figura 2, 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 2 – Coleta estéril do mosto



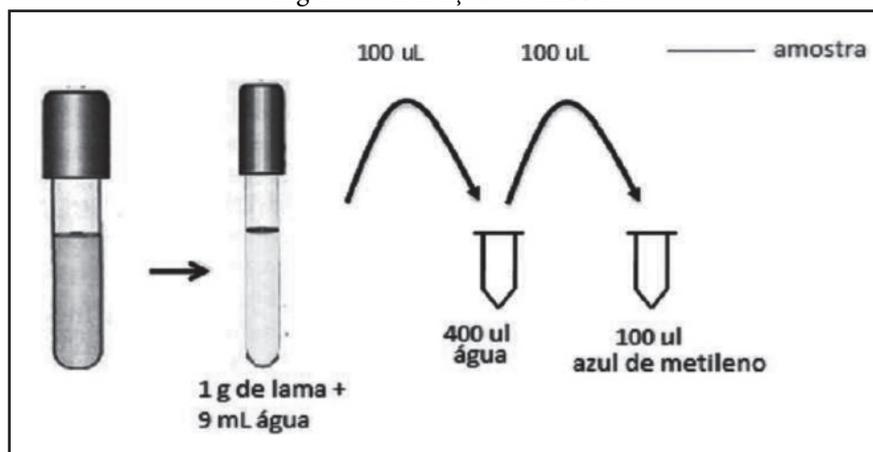
Fonte: A autora (2022).

## 2.2 Análise de 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 viáveis convertem o azul de metileno em uma solução incolor via desidrogenase celular. Por esse 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 (EUROPEAN BREWERS CONVENTION, 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 3, sendo diluída dez (10) vezes, com 1 mL de amostra e 9 mL de água destilada, prosseguindo a uma nova diluição de cinco (5) vezes, com 0,1 mL da amostra previamente diluída em 0,4 mL de água destilada.

Figura 3 – Diluição da amostra



Fonte: A autora (2022).

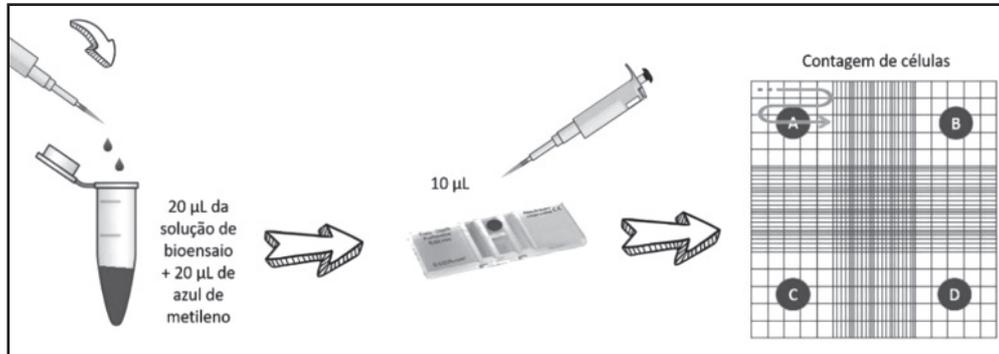
Após diluições em água destilada, a amostra foi novamente diluída, com 0,1 mL de amostra em 0,1 mL de solução de azul de metileno, para sua

homogeneização ao corante. Após o término da diluição e coloração da amostra, a mesma foi homogeneizada e transferida para o hemocitômetro,

e realizou-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 4.

Figura 4 – Coloração e contagem da amostra



Fonte: Vitorino *et al.* (2021).

Após contagem de células vivas e mortas dos quatro (4) 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 5 ao lado, onde o resultado se dá em porcentagem, a partir da quantidade de células por grama de fermento.

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:

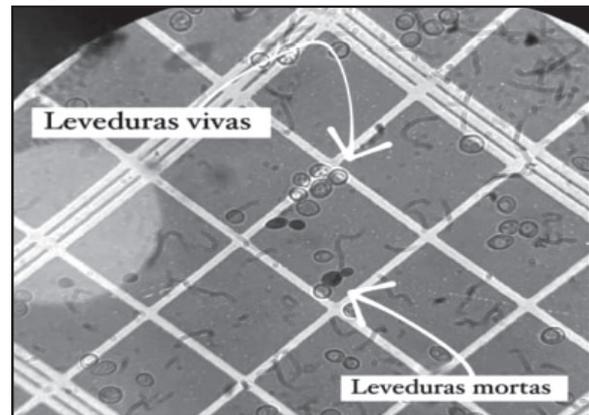
$$\% \text{ de viabilidade} = (\text{células vivas} \times 100) / (\text{células vivas} + \text{células mortas}) \quad (1)$$

### 2.3 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 esse 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

Figura 5 – Contagem de células pelo microscópio



Fonte: A autora (2022).

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 6). 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 (3) 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 6 – Teste de fermentação forçada



Fonte: A autora (2022).

#### 2.4 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

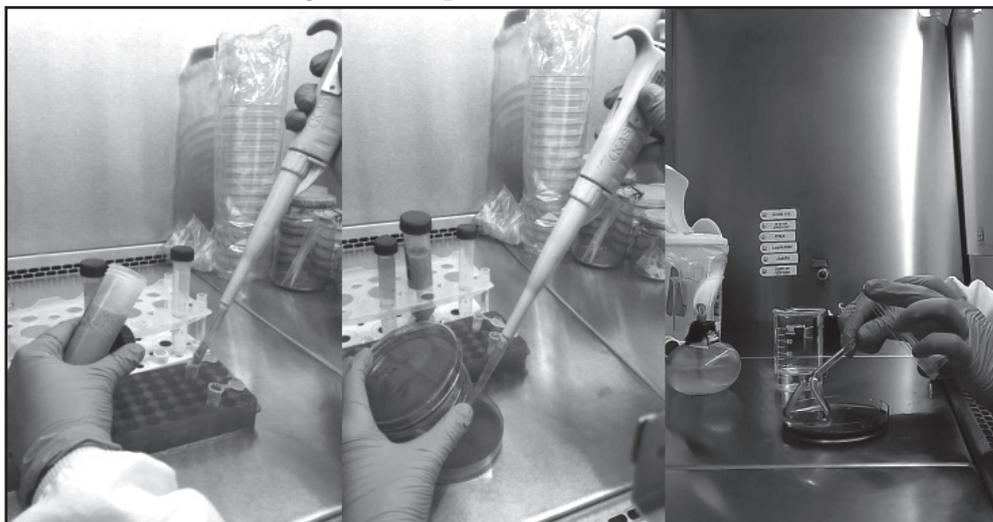
meio e, conforme o bromocresol é metabolizado, o meio se torna amarelado, apresentando contaminação na amostra. Ao meio de cultivo WL, adiciona-se um composto químico e antifúngico, denominado cicloheximida, que impede o crescimento de leveduras *Saccharomyces*, tornando o meio WLD seletivo para leveduras selvagens e bactérias.

##### 2.4.1 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 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; ZAINSHEFF, 2010).

Foi realizado o método de semeadura em placa Spread-Plate, representado pela figura 7, 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 (3) dias a 30°C, e a placa WLD em anaerobiose foi incubada por 5 dias a 30°C.

Figura 7 – Plaqueamento da lama



Fonte: A autora (2022).

#### 2.4.2 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 anaeróbica, 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 8), 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. 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).

Figura 8 – Plaqueamento do mosto



Fonte: A autora (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 (2) aditivos que o diferenciam: vermelho neutro, sendo um indicador de pH e o dissacarídeo lactose (WHITE; ZAINSCHEFF, 2010). As placas Macconkey e WL, em aerobiose, foram incubadas a 30°C por três (3) dias, e a placa WL, em anaerobiose, foi incubada por (cinco) 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 9), 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 (cinco) 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).

#### 2.4.3 Monitoramento do tanque fermentador

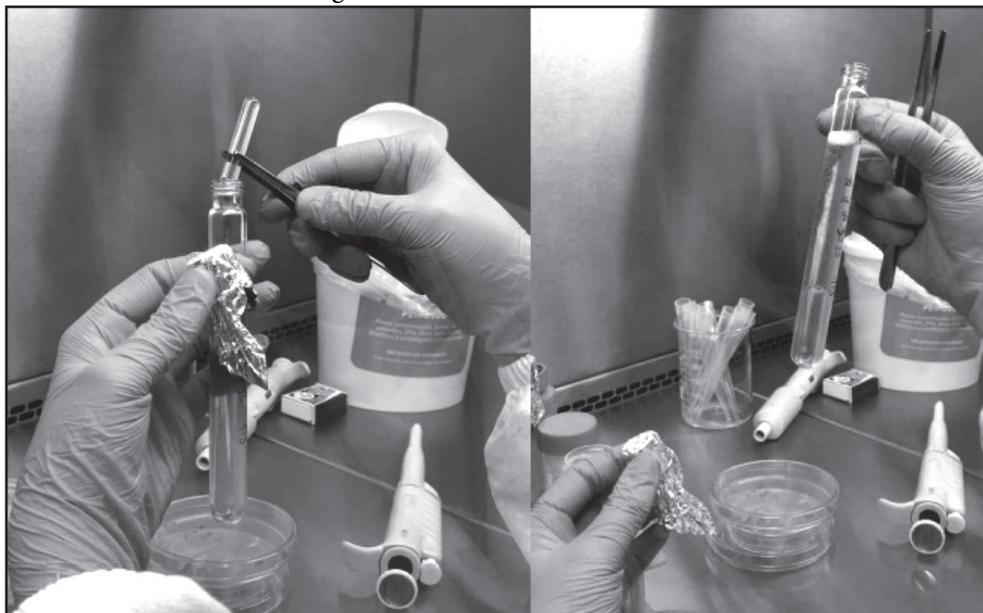
O mosto, ao ser inserido no tanque fermentador, recebe também a quantidade ideal de levedura para fermentá-lo. O processo de fermentação alcoólica é monitorado, desde o primeiro dia de atividade da levedura sobre o mosto até o fim dessa atividade. O mosto da cerveja estilo Pilsen possui 11°P de extrato no início da fermentação, e o decaimento do extrato ocorre, durante cerca de sete (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 (3) 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  $2^{\circ}\text{P} \pm 0,3$  oP, a fermentação é finalizada, com a queda de temperatura, onde o tanque passa de fermentando para maturando.

Figura 9 – Mosto em tubo durhan



Fonte: A autora (2022).

Durante a reutilização em dez (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  $10^{\circ}\text{C}$  a  $15^{\circ}\text{C}$ ) e pressão ( $0$  a  $2\text{ kgf/cm}^2$ ). 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.

### 3 Resultados

#### 3.1 Parâmetros de atividade fermentativa da levedura

A tabela 1 mostra a variação entre os quatro (4) parâmetros testados no acompanhamento da atividade fermentativa da levedura *Saccharomyces pastorius* entre os ciclos de reutilização de zero (0) a dez (10).

A viabilidade celular da levedura, após sucessivas fermentações, demonstrou pequena variação entre os ciclos. Tendo em vista a especificação de levedura, em boas condições de reutilização, ser

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 (0) 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.

O extrato aparente da cerveja estilo Pilsen é de  $2^{\circ}\text{P} \pm 0,3^{\circ}\text{P}$ . Ao atenuar até esse valor de extrato, a fermentação é cessada com a queda de temperatura do tanque que fermenta a  $14^{\circ}\text{C}$  e sofre a queda de temperatura para  $-1^{\circ}\text{C}$ . É destacável que todas as fermentações forçadas obtiveram extrato aparente, dentro da faixa de especificação para o estilo, 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.

Tabela 1 – 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

Fonte: A autora (2022).

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 sete (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 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 inócua em grande parte das produções, visto que apresentou contaminação acima da especificada de 10 UFC/mL nos ciclos 2, 5 e 7.

As contaminações presentes no mosto podem ser preocupantes quanto à 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  $2\text{ }^{\circ}\text{P} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{P}$ .

### 3.1.1 Parâmetros acompanhados no período de fermentação

A tabela 2 mostra a variação entre os quatro (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 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 zero (0) a um 1 kgf/cm<sup>2</sup> 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.

Na tabela 2, 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, sete (7) dias. Nas gerações três (3) e sete (7), o tanque necessitou de menos tempo para a levedura atenuar o extrato aparente e realizar o repouso do diacetil, porém na geração oito (8), a cerveja precisou fermentar por mais tempo para tal atenuação e repouso.

Tabela 2 – 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/cm <sup>2</sup> 12°C ± 2,1°C	-
1	98,89	2,2	7	160	18000	1,4 kgf/cm <sup>2</sup> 12,5°C ± 1,6°C	Zero
2	98,95	2,4	7	204	55800	1,2 kgf/cm <sup>2</sup> 12,5°C ± 2°C	Zero
3	99,19	2,3	6	261	55800	1 kgf/cm <sup>2</sup> 13,2°C ± 1,7°C	Zero
4	98,9	2,2	7	214	55800	1,4 kgf/cm <sup>2</sup> 12,9°C ± 1,9°C	Zero
5	99,14	2,18	8	124	18600	1,4 kgf/cm <sup>2</sup> 12,5°C ± 1,6°C	Zero
6	98,79	2,22	7	197	55800	1 kgf/cm <sup>2</sup> 12,5°C ± 2°C	Zero
7	99,35	2,15	6	209	55800	1,4 kgf/cm <sup>2</sup> 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/cm <sup>2</sup> 10°C a 14,4°C	Zero
10	99,1	2,1	8	78	18600	1 kgf/cm <sup>2</sup> 10 °C a 14,5°C	Zero

Fonte: A autora (2022).

O extrato aparente, para as gerações zero (0) e dois (2), ficou acima da especificação para o estilo, 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.

### 3.2 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 (4) 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, já que a presente pesquisa apresenta duas vezes mais reutilizações para a mesma cepa.

De acordo com o trabalho desenvolvido por Luarasi, 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 (9) gerações. A pesquisa mostrou diferentes níveis de

viabilidade entre as diferentes gerações de levedura. Nas primeiras quatro (4) 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 Luarasi, Troja e Pinguli (2017), 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.

#### 4 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 dez (10) ciclos de reutilização da levedura, podendo concluir que a levedura se manteve apta à 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.

#### Referências

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário da cerveja 2020**. Brasília: MAPA/SDA, 2021. 24 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/com-crescimento-de-14-4-em-2020-numero-de-cervejarias-registradas-no-brasil-passa-de-1-3-mil/anuariocerveja2.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2022.
- CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte- as leveduras. **Revista Analytica**, n. 25, 2006. Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4075236/mod\\_resource/content/1/Carvalho2006%20Artigo\\_Analitica\\_1\\_As\\_Leveduras.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4075236/mod_resource/content/1/Carvalho2006%20Artigo_Analitica_1_As_Leveduras.pdf). Acesso em: 21 maio 2022.
- CERVBRASIL. **Dados do setor**. 2018. Disponível em: [http://www.cervbrasil.org.br/novo\\_site/dados-do-setor/](http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/). Acesso em: 05 abr. 2022.
- DE FUSCO, D. O. *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. DOI: 10.1111/ijfs.14156.
- EUROPEAN BREWERS CONVENTION. **3.2.1.1 Methylene Blue/Violet Stain**. 2011. Disponível em: <https://brewup.eu/ebc-analytica/yeast-analysis/methylene-blue-violet-stain/3.2.1.1>. Acesso em: 13 jul. 2022.
- FONTES, L. Análises de coliformes por métodos alternativos. 10 set. 2013. *In: Bancada Pronta*. Disponível em: <https://bancadapronta.wordpress.com/2013/09/10/analises-de-coliformes-por-metodos-alternativos/>. Acesso em: 07 set. 2022.
- KLEY, A. **Leveduras: o que é e qual a importância do fermento cervejeiro na sua produção**. 2022. Disponível em: <https://www.comofazercerveja.com.br/post/leveduras-o-que-e-qual-a-importanciado-fermento-cervejeiro>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- LUARASI, L.; TROJA, R.; PINGULI, L. Yeast vitality monitoring during the fermentation process of beer production. **Hygienic Engineering and Design**, v. 19, p. 78-81, 2017.
- MERCK. **WL Nutrient Agar**. 2022. Disponível em: [https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/17222?gclid=Cj0KCQjwguGYBhDRARIsAHgRm49dTtMh-M7bG2\\_qikz4VudDL3nIw](https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/17222?gclid=Cj0KCQjwguGYBhDRARIsAHgRm49dTtMh-M7bG2_qikz4VudDL3nIw)

- Du5jCEGmSKiNDST2LZK9QKaç8aAtCLEALw\_wcB. Acesso em: 07 set. 2022.
- OLIVER, G. **A mesa do mestre cervejeiro**. São Paulo: SENAC/SP, 2012.
- PICCINI, A. R.; MORESCO, C.; MUNHOS, L. **Cerveja**. 2002. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/alimentus1/feira/prcerea/cerveja/defini.htm>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- SAITO, F. H. S. F. **Utilização de fermento de descarte de cervejaria na produção de aguardente de licor de laranja**. 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/88577>. Acesso em: 31 ago. 2022.
- SILVA, N. S. R. **Análise do reuso de leveduras no processo produtivo de cervejas artesanais**. 2020. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2020. Disponível em: <https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/4137>. Acesso em: 05 jun. 2022.
- SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA. **Brasil chega a 1.549 cervejarias registradas no Mapa**. 2022. Disponível em: <https://www.sindicerv.com.br/noticias/brasil-chega-a-1-549-cervejarias-registradasno-mapa/>. Acesso em: 31 ago. 2022.
- SUHRE, T. **Controle de qualidade em microcervejarias: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras**. 2014. 48 f. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- VITORINO, L. C. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de ensino de toxicologia à estudantes do ensino médio. **Scientia Plena**, v. 17, n. 1, 2021. DOI: 10.14808/sci.plena.2021.012702.
- WHITE, C.; ZAINSCHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Boulder: Brewers, 2010.