

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PALLOMA DE SOUZA SANTOS

**LEVEDURAS CERVEJEIRAS: UM ESTUDO SOBRE VIABILIDADE E
VITALIDADE PARA A REUTILIZAÇÃO DO RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO EM
MICROCERVEJARIAS**

SALVADOR

2018

PALLOMA DE SOUZA SANTOS

LEVEDURAS CERVEJEIRAS: UM ESTUDO SOBRE VIABILIDADE E VITALIDADE
PARA A REUTILIZAÇÃO DO RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO EM
MICROCERVEJARIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Aláise Gil Guimarães
Coorientador: Dr. Celso Duarte Carvalho Filho

SALVADOR

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Souza Santos, Palloma
LEVEDURAS CERVEJEIRAS: UM ESTUDO SOBRE VIABILIDADE
E VITALIDADE PARA A REUTILIZAÇÃO DO RESÍDUO DA
FERMENTAÇÃO EM MICROCERVEJARIAS / Palloma de Souza
Santos. -- Salvador, 2018.
56 f. : il

Orientadora: Aláise Gil Guimarães.
Coorientador: Celso Duarte Carvalho Filho.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em
Ciência de Alimentos) -- Universidade Federal da
Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2018.

1. Cerveja. 2. Fermentação. I. Gil Guimarães,
Aláise. II. Duarte Carvalho Filho, Celso. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

PALLOMA DE SOUZA SANTOS

LEVEDURAS CERVEJEIRAS: UM ESTUDO SOBRE VIABILIDADE E VITALIDADE PARA REUTILIZAÇÃO DO RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO EM MICROCERVEJARIAS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 26 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Alaíse Gil Guimarães
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr^a. Ana Paula Trovatti Uetanabaro
Universidade Estadual de Santa Cruz

Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez
Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho a minha família que sempre
está comigo nas minhas escolhas

LISTA DE TABELA E QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1. Classificação das Cervejas no Brasil.....	18
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Valor de °Brix para cervejas inoculadas com diferentes cepas de <i>Saccharomyces</i>	42
---	----

Tabela2. Contagem total de células (cel/mL) de diferentes cepas de <i>Saccharomyces</i> sp. lavadas e conservadas sob refrigeração, congelamento (-22°C), congelamento (-22°C) com meio de cultura e glicerol e em ultracongelamento (-80°C) no período de 90 dias.....	43
--	----

Tabela3. Contagem total de células (cel/mL) de diferentes cepas de <i>Saccharomyces</i> sp. não lavadas e conservadas sob refrigeração, congelamento (-22°C), congelamento (-22°C) com meio de cultura e glicerol e ultracongelamento(-80°C) em um período de 90 dias.....	44
---	----

Tabela 4. Volume de resíduo de leveduras de fermentação necessário para produzir 10 litros de cerveja de acordo com o cálculo disponível utilizando o software Beersmith™.....	53
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Etapas do processo de fabricação de cerveja..... 22

Figura 2. Representação da estrutura interna da célula de levedura gerando um broto
..... 24

CAPÍTULO II

Figura 1. Viabilidade de diferentes cepas de *Saccharomyces* sp. com e sem tratamento de lavagem em armazenamento sob refrigeração (8-10°C), congelamento (-22°C), ultracongelamento (-80°C), congelamento (-22°C) com meio de cultura e glicerol durante período de 90 dias. **A)** Cepa M15 **B)** Cepa M54 **C)** Cepa T58 **D)** Cepa W34-70 **E)** Cepa S04 **F)** Cepa S05..... 46

Figura 2. Vitalidade de diferentes cepas de *Saccharomyces* sp. com e sem tratamento de lavagem em armazenamento sob refrigeração (8-10°C), congelamento (-22°C), ultracongelamento (-80°C), congelamento (-22°C) com meio de cultura e glicerol durante período de 90 dias . **A)** Cepa M15 **B)** Cepa M54 **C)** Cepa T58 **D)** Cepa W34-70 **E)** Cepa S04 **F)** Cepa S05..... 50

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre estar caminhando comigo nas minhas escolhas, por ser minha base.

À minha orientadora Alaíse por sempre me mostrar da melhor forma qual o caminho para a ciência, por ter me impulsionado a fazer o mestrado, e toda sua atenção e forma carinhosa de tratar seus alunos, e ter apostado em mim desde a minha iniciação científica até o mestrado.

Ao meu coorientador Celso por ter me apresentado a estudar a cerveja e a entender melhor sobre esta bebida tão apreciada pelas pessoas, por ter ido à bancada me ensinar como se produz a cerveja, por me acalmar muitas vezes em relação aos prazos do mestrado.

Aos meus pais, Margarida e Hélio, pelo estímulo e por sempre mostrarem que a dedicação ao conhecimento é sempre a melhor opção. Aos meus irmãos, Dhiogo e Manuella, por sempre me apoiarem e darem forças a continuar nos meus sonhos. Minha madrinha Cláudia, que sempre apoiou e impulsionou aos caminhos da pós-graduação.

Aos parceiros do LEMA, Rebeca (gêmea), Lucas, Johnson, Priscila, Ludimyla, por terem me dado apoio durante todo período, principalmente Cezar Miguel que esteve comigo em muitos momentos deste trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia, principalmente Mira e Tamires, que sempre me apoiaram tanto em palavras quanto no oferecimento de alguns materiais que facilitaram a execução do projeto.

Aos colegas da turma PGali de 2016.1 por tornarem este período mais leve, nos confortando em momentos de maiores atividades. Principalmente às colegas Rebeca (gêmea), por estar comigo desde o laboratório até a sala de aula, Sidione, que desde a graduação está comigo na jornada acadêmica. À colega Renata, companheira da representação estudantil, sempre dando dicas de como melhor levar o mestrado.

A CAPES pelo fomento da bolsa.

Aos professores do PGali pelos ensinamentos durante este período.

Aos meus amigos, em especial Cibele que soube me confortar em alguns passos do mestrado.

Aos Professores da Banca Avaliadora por aceitarem o convite de participação, pelas contribuições e considerações feitas a este trabalho.

Gratidão a todos vocês. Foram essenciais para cada passo da execução deste trabalho!

RESUMO

A cerveja é uma bebida muito popular no Brasil, obtida pela fermentação alcoólica de mosto oriundo de malte de cevada e água potável, com adição de lúpulo. É a terceira bebida mais popular no mundo, logo depois da água e do chá. Há evidências históricas de que a humanidade produziu cerveja por mais de 3.000 anos. As cervejas artesanais ou especiais é uma categoria que abriga as cervejas de qualidade superior e com alto valor agregado, em geral, são cervejas que utilizam receitas ou processos de fabricação diferentes das de fabricação em larga escala. O mercado está em amplo crescimento e a cada dia busca produtos diferenciados e até exclusivos para atrair mais consumidores desta modalidade de cerveja. Um dos pontos cruciais na fabricação da cerveja é a fermentação, feita pela ação de leveduras principalmente a *Saccharomyces cerevisiae* para alta fermentação e *Saccharomyces pastorianus* para baixa fermentação. As leveduras são as responsáveis a oferecer as cervejas sabor, aromas e textura. Para cada tipo de cerveja como as Belgas, Inglesas entre outras, são selecionadas determinadas cepas de leveduras. Como a maioria desse material não é produzida no Brasil, o custo de aquisição acaba sendo elevado e, portanto, a reutilização do resíduo de fermentação acaba sendo viável. A pesquisa teve como objetivo avaliar a viabilidade e vitalidade das leveduras cervejeiras que foram obtidas a partir do resíduo da fermentação. Foram elaboradas seis cervejas com diferentes cepas de *Saccharomyces*, o resíduo da fermentação de cada cerveja foi coletado e uma parte dele passou por um tratamento de lavagem, após isso o resíduo foi armazenado sob refrigeração (8-10°C), congelamento (-22°C), ultracongelamento (-80°C) e congelamento (-22°C) com adição de meio de cultura e glicerol durante período de 90 dias. O método de viabilidade utilizado foi o de coloração com azul de metileno, com contagem das células viáveis e células inviáveis. Para análise de vitalidade foi utilizado o teste de acidificação do meio, com observação do pH antes e após inserção da glicose. A cada quinze dias, foram feitas análises de viabilidade pelo método azul de metileno e vitalidade pelo método do poder de acidificação do meio. As cepas tiveram tendência de queda tanto de viabilidade quanto vitalidade durante todo período, e melhor comportamento sob refrigeração obtendo os maiores valores de viabilidade e vitalidade.

Palavras chave: *Saccharomyces*; cerveja artesanal; fermentação alcoólica.

ABSTRACT

Beer is a very popular drink in Brazil, obtained by the alcoholic fermentation of must from barley malt and drinking water, with the addition of hops. It is the third most popular drink in the world, just after the water and tea. There is historical evidence that mankind has produced beer for more than 3,000 years. Artisan or specialty beers are a category that holds high-quality beers with high added value, generally beers that use recipes or manufacturing processes other than large-scale manufacturing. The market is in great growth and every day seeks differentiated and even exclusive products to attract more consumers of this type of beer. One of the crucial points in the brewing is the fermentation, made by the action of yeasts mainly *Saccharomyces cerevisiae* for high fermentation and *Saccharomyces pastorianus* for low fermentation. Yeasts are responsible for offering the beers flavor, aroma and texture. For each type of beer such as Belgian, English and others, select certain strains of yeast. As most of this material is not produced in Brazil, the cost of acquisition ends up being high and, therefore, the reuse of the fermentation residue ends up being viable. The objective of this research was to evaluate the viability and vitality of brewer's yeast that were obtained from the fermentation residue. Six beers with different strains of *Saccharomyces* were prepared, the fermentation residue of each beer was collected and a part of it was washed, after which the residue was stored under refrigeration (8-10 ° C), freezing (-22 ° C), freezing (-80 ° C) and freezing (-22 ° C) with addition of culture medium and glycerol for a period of 90 days. The viability method used was methylene blue staining, with counting of viable cells and non-viable cells. For vitality analysis, the acidification test of the medium was used, with pH observation before and after glucose insertion. Every fifteen days, viability analyzes were carried out using the methylene blue method and vitality by means of the method of acidification of the medium. The strains tended to drop both viability and vitality throughout the period, and improved performance under refrigeration obtaining the highest values of viability and vitality.

Keywords: *Saccharomyces*; craft beer; alcoholic fermentation.

SUMÁRIO

RESUMO	9
CAPÍTULO I	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Geral.....	14
2.2. Específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. Cerveja: breve histórico	14
3.2. Compostos benéficos da cerveja	15
3.3. Produção de cerveja	16
3.4. Cervejas Artesanais	18
3.5. Processo de fabricação	20
3.5.1. <i>Fermentação Alcoólica</i>	21
3.6. Leveduras cervejeiras: características gerais	23
3.6.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
3.6.2. <i>Sacharomyces pastorianus</i>	26
3.7. Viabilidade de leveduras cervejeiras	27
3.8. Vitalidade de leveduras cervejeiras	27
4. REFERÊNCIAS	28
CAPITULO II.....	35

**VIABILIDADE E VITALIDADE DE *Saccharomyces*: UM ESTUDO SOBRE
UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO RESIDUO DA FERMENTAÇÃO DE CERVEJAS
ARTESANAIS35**

RESUMO35

1. INTRODUÇÃO35

2. MATERIAIS E MÉTODOS37

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO39

4. CONCLUSÃO51

5. REFERÊNCIAS51

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica de mosto oriundo de malte de cevada e água potável, por ação de levedura, com adição de lúpulo. Parte do malte de cevada pode ser substituída por adjuntos (arroz, trigo, centeio, milho, aveia e sorgo, todos integrais em flocos ou a sua parte amilácea) e por carboidratos de origem vegetal, transformados ou não (BRASIL, 1997).

O Brasil ocupa a terceira colocação de maior produtor de cerveja em larga escala no mundo, com um volume de cerca de 13 bilhões de litros de cerveja por ano, atrás apenas da China e Estados Unidos. O consumo da bebida no país é elevado, cerca de 12 milhões de litros por ano (SEBRAE, 2014). As cervejas produzidas em larga escala geralmente são do tipo Lager e Pilsen, que devem ser consumidas de forma gelada e rápida (HERMOGENES, 2011).

A produção da cerveja artesanal vem crescendo no país, e está relacionada com o resgate da história, da cultura e do prazer de se fazer e beber boas cervejas, associada à gastronomia de qualidade. A cerveja artesanal caracteriza-se pela qualidade superior e alto valor agregado. Em geral, são cervejas que utilizam receitas ou processos de fabricação diferentes das de fabricação em larga escala (HERMOGENES, 2011).

Um dos pontos cruciais da fabricação da cerveja é a fermentação. As leveduras dão às cervejas sabor, aromas e textura. É o agente biológico que transforma o mosto cervejeiro em produto final. Para cada tipo de cerveja como as Belgas, Inglesas entre outras, são selecionadas determinadas cepas de leveduras. Como a maioria desse material não é produzida no Brasil, o custo de aquisição acaba sendo elevado (BORTOLI, 2013).

Devido à escassez de estudos referente às leveduras cervejeiras na produção artesanal, com o crescente consumo de cerveja pela população, além do mercado abrangente para as microcervejarias artesanais, atualmente, se faz necessário este estudo a fim de trazer mais conhecimentos para os cervejeiros, de como utilizar as cepas de leveduras, até quando podem reutilizá-las, qual melhor forma de armazená-las, além de poder influenciar na melhoria da qualidade da cerveja produzida com melhor sabor e aroma. Por isso, é importante um maior desenvolvimento e inovação no que abrange as cepas de leveduras, adequadas às condições brasileiras de produção de cervejas,

visando, assim à produção de cervejas artesanais que agradem ao paladar do consumidor.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a viabilidade e vitalidade das leveduras cervejeiras em diferentes tempos e formas de armazenamento, a fim de reaproveitar o resíduo da fermentação da cerveja artesanal.

2.2. Específicos

- Fazer o acompanhamento da fermentação da cerveja produzida em laboratório através do valor de Brix;
- Fazer o tratamento de lavagem do resíduo de fermentação da cerveja;
- Utilizar quatro formas diferentes de armazenamento para o resíduo da fermentação;
- Avaliar a viabilidade de diferentes cepas de leveduras cervejeiras durante 90 dias;
- Avaliar a vitalidade de diferentes cepas de leveduras cervejeiras em durante 90 dias;
- Quantificar o volume necessário de resíduo de fermentação para produção de cerveja a partir do valor da viabilidade;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cerveja: breve histórico

A cerveja é uma bebida produzida e consumida há muito tempo. Há evidências históricas de que a humanidade produziu cerveja há mais de 3.000 anos. Alguns historiadores acreditam que a produção de cerveja possa ter começado ainda mais cedo, há mais de nove mil anos, quando os grãos de cereais foram cultivados pela primeira vez. As primeiras cervejas e a prática da cervejaria origina-se na antiga Mesopotâmia, mais precisamente da Suméria, na região conhecida como Crescente Fértil, onde havia crescimento abundante da cevada, inclusive há registros arqueológicos com inscrições

em pedra que relatam a produção de uma bebida pela utilização de cereais (COELHO-COSTA, 2015; ELTERMANN, MATOS, SILVA, 2016).

Quando surgiu, a cerveja não continha lúpulo em sua composição assim, ela se deteriorava com maior rapidez. Na Europa, por volta do ano de 1000, descobriu-se que o lúpulo possuía propriedades antissépticas, e foi então adicionado à cerveja, a fim de manter suas características de sabor por mais tempo, além de melhorar sua estabilidade. As descobertas de Louis Pasteur sobre o levedo e a conservação de alimentos trouxeram profundas mudanças na qualidade da bebida, graças à esterilização de materiais, o trabalho a vácuo e o processo de pasteurização. No fim do século XX, já se podia fabricar a cerveja com segurança microbiológica e com atributos sensoriais característicos, garantindo uma maior vida de prateleira, podendo expandir assim sua comercialização (REBELLO, 2009).

A cerveja chegou ao Brasil com os alemães no início do século XIX e era produzida de forma artesanal e regionalizada (ZANIOL, 2011). Segundo Santos (2004) não se tem uma data definida para o início da produção de cervejas no Brasil, no entanto, a partir de 1858, surgiram algumas cervejarias em São Paulo, e regiões de imigração alemã no Rio Grande do Sul. Em meados de 1870 houve um aumento da produção que continuou até a Primeira Guerra Mundial. A partir do ano de 1880 surgiram as primeiras cervejarias industrializadas do país com produção em larga escala.

Mais recentemente houve a globalização de mercado e as fusões de grandes cervejarias, a indústria da cerveja consolidou-se em grandes grupos pelo mundo. No Brasil, essa tendência de consolidação de grandes cervejarias pode ser constatada desde 1999, pelas grandes aquisições e fusões do setor (MORADO, 2009; HERMOGENES, 2011).

3.2. Compostos benéficos da cerveja

A cerveja é uma das primeiras bebidas alcoólicas elaboradas pelo homem, sendo uma das mais apreciadas no mundo contemporâneo (ARNOLD, 2005). É a terceira bebida mais popular no mundo, logo depois da água e do chá. São fonte de antioxidantes naturais, particularmente ácidos fenólicos, que são provenientes da cevada e lúpulo (NELSON, 2005; CALLEMIEN, COLLIN, 2010; PIAZZON, 2010).

Os ácidos fenólicos da cerveja foram descritos como sendo rapidamente absorvidos e amplamente metabolizados em seres humanos. O consumo de álcool foi relatado para aumentar atividades antioxidantes e anticoagulantes, e também para afetar positivamente os níveis lipídicos plasmáticos em humanos. Em modelos animais, estudos demonstraram que a cerveja diminui a susceptibilidade à oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (PIAZZON, 2010).

Pesquisas demonstraram que a cerveja contém determinados compostos benéficos, como o xanthohumol, isoxanthohumol, 8- prenilnaringenina, ácido ferúlico, folato, que auxiliam na prevenção de doenças cardíacas, osteoporose, cálculos renais e biliares, aumento da tireóide, doença de Parkinson e Alzheimer, demência, úlceras e alguns tipos de câncer (VINSON, 2003; KONDO, 2004; VELJOVIC et al., 2010).

O sabor e aroma final da cerveja é a soma resultante de vários compostos produzidos no curso de cada passo de sua fabricação, cada tipo de cerveja tem seu próprio aroma predominante desencadeado pela tensão de fermento. Álcoois, ésteres mais elevados e as dicetonas vicinais são os principais elementos produzidos pela levedura. Embora os álcoois e ésteres superiores sejam voláteis desejáveis constituintes de uma cerveja agradável, as dicetonas vicinais são frequentemente consideradas como *off-flavors*. Juntamente com estes, o metabolismo da levedura contribui com outros três grupos de compostos químicos: ácidos orgânicos, compostos de enxofre e aldeídos (PIRES, 2014).

Um dos fatores que influenciam o sabor da cerveja engarrafada é o tempo de armazenamento. O envelhecimento em cerveja é considerado um grande problema de qualidade uma vez que os sabores do envelhecimento são principalmente experimentados como desagradáveis (VANDERHAEGEN, 2006).

3.3. Produção de cerveja

Muitos tipos diferentes de cerveja são desenvolvidos em vários países do mundo. Essa diversidade é causada por grande variedade de matérias-primas e tecnologias, que são usados em sua produção (HORSNEY, 2003).

Existem muitos tipos de cerveja, algumas se diferenciam pela composição do carboidrato, algumas são feitas com trigo, outras se diferenciam pelo tipo de fermentação, e o resultado final proporciona características sensoriais diferentes entre cada uma delas. Dentro do grupo das cervejas Lager, que foram produzidas em baixa

fermentação, existem a: Pilsen, Schwarzbier, Bock; dentro do grupo das cervejas Ale, fabricadas em alta fermentação, existem as: Weienbier, Stout, Dubbel; as cervejas Alambic, que apresentam fermentação espontânea, como Kriek, Faro, Geuze (MEGA, 2011).

Em alguns locais como a Baviera, a produção da cerveja baseia-se na *Reinheitsgebot*, ou lei de pureza da cerveja, que regula comercialmente a fabricação de cerveja e foi introduzida em 1516. Segundo esta lei alemã, a bebida pode somente ser fabricada a partir de água, cevada malteada, lúpulo e levedura (VELJOVIC et al., 2015).

Em alguns países as legislações que governam a produção de cerveja permitem que cervejarias tenham mais flexibilidade, por exemplo, em seleção de fontes de carboidratos, ou adjuntos que são quaisquer fontes de carboidratos que não seja cevada maltada e que contribuam com açúcares para o mosto. Cereais (maltados ou não maltados) e xaropes de açúcar são utilizados, geralmente em conjunto com malte de cevada (VELJOVIC et al., 2015).

No Brasil, o decreto n. 2.314, de 04 de setembro de 1997 dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, incluindo a cerveja. A classificação da bebida dependerá da sua produção, quantidade de extrato primitivo, quantidade de malte de cevada, teor alcoólico, tipo de fermentação (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação das Cervejas no Brasil, segundo o Decreto n. 2.314, de 04 de setembro de 1997 que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

Extrato primitivo	Leve: apresenta extrato primitivo igual ou maior que 5,0% e menor que 10,5%, em peso;
	Comum: extrato primitivo igual ou maior que 10,5% e menor que 12,5%, em peso;
	Extra: extrato primitivo igual ou maior que 12,5% e menor que 14,0%, em peso
	Forte: extrato primitivo maior que 14,0%, em peso);
Cor	Clara: Quando possuir cor correspondente a menos de 20 unidades EBC (European Brewery Convention);
	Escura: Quando possuir cor correspondente a 20 ou mais unidades EBC;

Teor alcóolico	Cerveja sem álcool: quando seu conteúdo em álcool for inferior a 0,5%, em volume;
	Cerveja com álcool: quando seu conteúdo em álcool for igual ou superior a 0,5%, em volume;
Proporção de malte de cevada	Cerveja puro malte: possui 100% de malte de cevada;
	Cerveja: possui proporção de malte de cevada igual ou maior a 50%;
	Cerveja com o nome do vegetal predominante: possui proporção de malte de cevada maior do que 20 e menor que 50%;
Fermentação	Cerveja de alta fermentação: quando é obtida pela ação de levedura cervejeira que emerge a superfície do líquido no final do processo fermentativo;
	Cerveja de baixa fermentação: quando é obtida pela ação de levedura cervejeira que decanta no fundo do fermentador no final do processo fermentativo

3.4. Cervejas Artesanais

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida em todo o mundo, um dos fermentados mais antigos. Tanto a cerveja como o vinho são reconhecidos desde tempos antigos por seus efeitos benéficos em relação à saúde. A cerveja especial ou artesanal é uma categoria que abriga as cervejas de qualidade superior e com alto valor agregado. Em geral, são cervejas que utilizam formulações ou processos de fabricação diferentes das de fabricação em larga escala (MUDURA et al., 2016).

Microcervejaria é um termo que surgiu recentemente para designar empreendimentos que visam produzir cerveja com diferencial local, atendendo a argumentos de tradição e/ou qualidade diferenciada, não se preocupando com a questão da produção industrial. As nanocervejarias têm os mesmos objetivos das microcervejarias, mas sem as exigências tributárias e fiscais exigidas pelo governo ao microempresário. Outro importante segmento são os produtores caseiros que fazem a sua cerveja, a princípio pelo prazer da produção, posteriormente para troca de experiências e compartilhar conhecimento, associado à gastronomia e evitando a massificação (HERMOGENES, 2011). No Brasil, as microcervejarias surgiram na segunda metade da década de 1980, com dezenas de pequenos empreendimentos que se estabeleceram principalmente no Sul e Sudeste (MORADO, 2009).

A cerveja oriunda de microcervejaria caracteriza-se pela elaboração de um produto mais encorpado, com aroma e sabor mais pronunciados, uma das justificativas para o crescimento acentuado deste segmento. Um dos fatores que explicam esta diferença entre a cerveja elaborada por microcervejarias e grandes cervejarias é a utilização de variedades específicas de lúpulo (REBELLO, 2009).

No passado, cervejas especializadas eram produzidas por pequenas cervejarias e restrita aos mercados locais. No entanto, devido à globalização do mercado, volumes de produção e exportação destas cervejas estão aumentando rapidamente resultando em tempos de transporte mais longos e armazenamento variável as condições exigindo mais atenção à sua produção com estabilidade de sabor melhorada (VANDERHAEGEN, 2006).

No Brasil, de acordo com o Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja, as cervejas especiais representavam 11% do mercado nacional de bebida em 2014, com projeção de 20% em 2020, isto ocorre, principalmente por haver um aumento do consumo e a valorização cada vez maior para as cervejas artesanais (SEBRAE, 2017).

Essas bebidas são consumidas pela sua interação sensorial, social, e recentemente utilizada também em preparações culinárias. A cerveja é uma bebida com baixo teor de álcool e também apresenta propriedades nutricionais delineadas pelo seu conteúdo rico em vitaminas, minerais e antioxidantes provenientes da matéria-prima. Desejando atrair tantos nichos de consumidores, as microcervejarias tendem a produzir anualmente cervejas inovadoras (MUDURA et al., 2016).

Hoje em dia, o mercado está a cada dia buscando produtos diferenciados e até exclusivos (PINTO et al., 2015). Essa diversidade é causada por grande variedade de matérias-primas e tecnologias, que são utilizadas em sua produção e oferecem uma ótima oportunidade para os fabricantes de cervejas conquistarem novos mercados e atenderem às demandas não convencionais dos grupos de consumidores. Nos últimos anos, o mercado de cervejas especiais com função saudável melhorada e / ou com novo sabor refrescante aumentou significativamente (VELJOVIC et al., 2015).

O uso de frutas na fabricação de cerveja como fontes de extrato fermentável e como agente aromatizante é comum, muitas cervejarias antigas inocularam o mosto adicionando frutas, vinho ou mel. Existem estudos com fabricação de cerveja utilizando mosto de uva (VELJOVIC et al., 2015; MUDURA et al., 2016), formulações com cogumelos (CUKALOVIC et al., 2009), com acerola e abacaxi (PINTO et al., 2015), produção de cervejas com alto teor alcoólico 4,4% (SILVA et al., 2009).

3.5. Processo de fabricação

O processo de fabricação consiste basicamente na produção do mosto cervejeiro (extração e hidrólise dos componentes da cevada malteada, seguido de uma separação dos componentes insolúveis e posterior fervura com a adição de lúpulo); a fermentação (dividida em fermentação primária e maturação); e processamento final (filtração, estabilização, engarrafamento) (DRAGONE, 2007).

Inicialmente um cereal, passa pelo processo de germinação controlada, gerando o malte, que vai ser moído para liberação do amido. Posteriormente é adicionada água na temperatura de 64°C até 74°C. A mistura da água com o malte em temperaturas quentes favorece a conversão do amido em açúcar simples (monossacarídeos e dissacarídeos) e oligossacarídeos (PALMER, 2006).

O processo de transformação das matérias-primas cervejeiras (água, malte, adjunto e lúpulo) em mosto denomina-se mosturação (VENTURINI FILHO, 2000). Adiciona-se o adjunto amiláceo sob agitação e eleva-se a temperatura da massa até a ebulição. Durante a elevação da temperatura haverá a gomificação da fração amilácea do adjunto e, posteriormente, ocorrerá liquefação da goma. Após o período de fervura, que varia de 5 a 45 minutos, essa mistura (adjunto/malte/água) é transferida para a tina de mosturação. A velocidade de elevação da temperatura, bem como o seu valor final determinam a proporção de maltose e dextrina no mosto (CURI, 2006).

Após a elaboração do mosto ocorre a filtração, que tem por objetivo separar o mosto clarificado do bagaço de malte ou torta, que constitui o meio filtrante. Essa filtração é normalmente feita em duas etapas. Na primeira, a fração líquida simplesmente atravessa o leito filtrante, dando origem ao mosto primário. Na segunda etapa, o resíduo sólido é lavado com água a 75°C, visando à recuperação do extrato que fica retido no filtro e, conseqüentemente, elevando o rendimento do processo (VENTURINI FILHO, 2005).

Depois da filtração ocorre a fervura, que tem por objetivo conferir estabilidade biológica, bioquímica e coloidal ao mosto. Além disso, nessa etapa há o desenvolvimento de cor, aroma e sabor, bem como aumento da concentração de extrato. É nessa etapa do processo que são adicionados o lúpulo e o adjunto quando for usado, este deve passar por um tratamento com etapas de retirada do precipitado, resfriamento e aeração. Logo após terá a fermentação que será a decomposição dos açúcares

fermentescíveis do mosto em álcool e gás carbônico pela ação da levedura cervejeira, após a fermentação a cerveja passa por um processo de maturação, onde o extrato fermentável residual da cerveja continua a ser lentamente metabolizado. O processo posterior é a clarificação, que visa eliminar partículas em suspensão. A pasteurização é para conferir estabilidade biológica, e o envasamento para armazenagem do produto (CURI, 2006).

A figura 1 demonstra todo o processo de fabrico da cerveja:

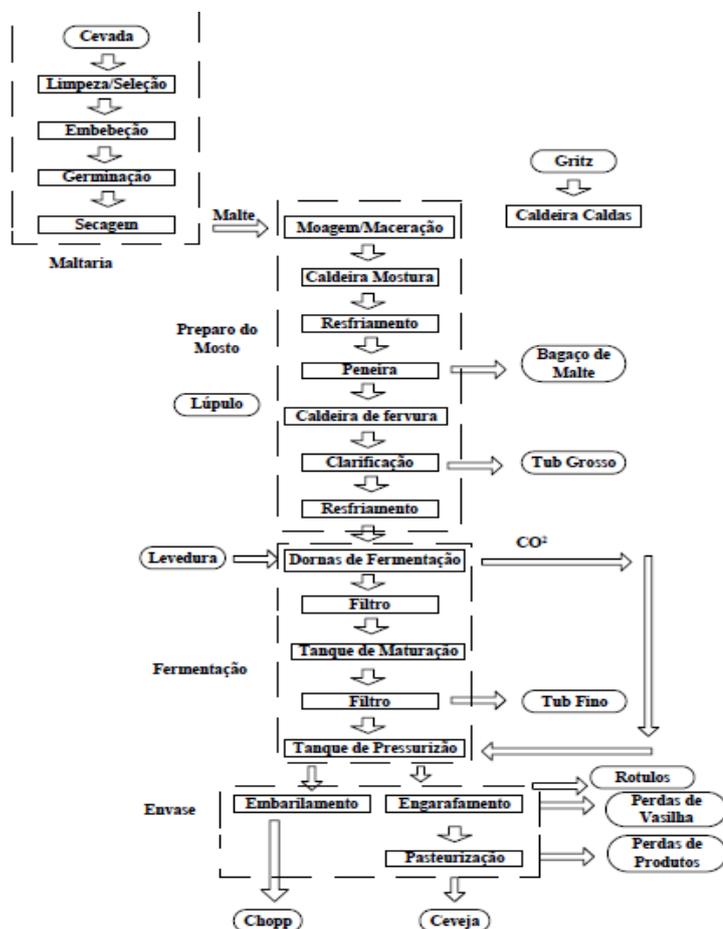


Figura 1. Etapas do processo de fabricação de cerveja

Fonte: Mega (2011)

3.5.1. Fermentação Alcoólica

O processo de fermentação alcoólica ocorre quando uma levedura utiliza uma molécula de sacarose para oxidação na ausência de oxigênio, resultando assim em etanol e gás carbônico (Figura 2) (VENTURINI FILHO et al., 2013). Além da produção de compostos de aroma e sabor da cerveja como subprodutos (CURI, 2006).

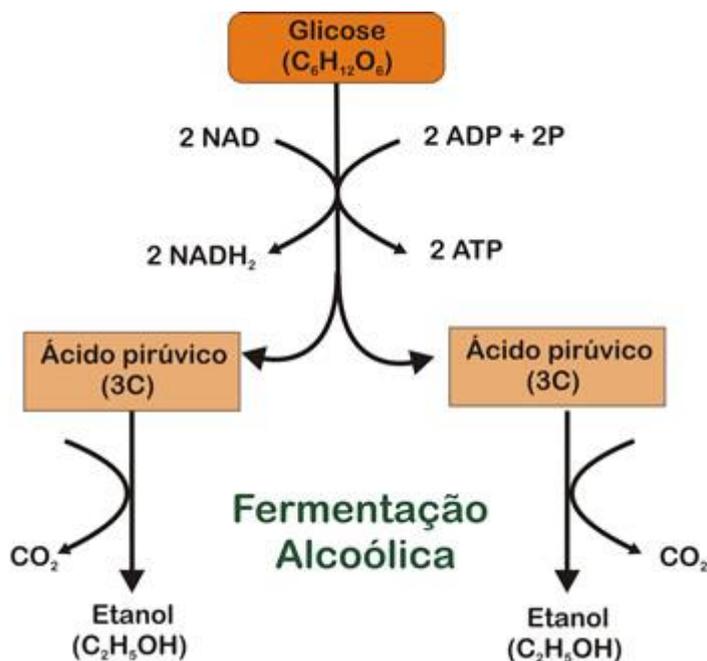


Figura 2. Reação da fermentação alcoólica

Fonte: Google

Durante a fermentação, as leveduras produzem subprodutos, como álcoois e ésteres superiores, fazendo uma excelente contribuição para o aroma e sabor da fermentação (OLMO et al., 2014).

A fermentação inicia-se logo que a levedura entra em contato com o mosto, podendo ser dividida em três fases: fase preliminar ou pré-fermentação, onde se tem a adaptação das leveduras e multiplicação celular; fase de fermentação, com desprendimento abundante de gás (CO_2) e produção de álcool; e fase de fermentação complementar ou pós-fermentação, onde se observa redução da atividade fermentativa (MORAIS, 2013).

O processo fermentativo para a produção de cerveja depende muito do processo de mitose das leveduras como também do metabolismo dos nutrientes que estão presentes no mosto cervejeiro, que vai ser influenciado por fatores externos como: pH, oxigênio dissolvido e a disponibilidade de açúcares (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006).

A fermentação da cerveja pode ser feita por processos contínuos ou descontínuos, sendo o processo descontínuo o mais utilizado (VENTURINI FILHO, 2000). No processo descontínuo, a natureza da levedura determina o tipo de fermentação: alta ou baixa. Esses termos indicam o comportamento da levedura durante

o processo fermentativo. Dessa forma, as leveduras de alta fermentação sobem à superfície do mosto e as de baixa decantam no fundo do fermentador no transcorrer da fermentação (VENTURINI FILHO, 1993).

3.6. Leveduras cervejeiras: características gerais

As leveduras são microrganismos muito utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica, desempenhando um papel importante na produção de alimentos, bebidas alcoólicas e metabólitos secundários, como antibióticos e vitaminas (HIERRO et al., 2004; MAYORAL et al., 2005).

É um microrganismo eucarioto unicelular com aproximadamente 5 a 10 μm de diâmetro, pertencente ao reino Fungi, domínio Eucária (SHERMAN, 1998). Existem mais de 600 espécies de leveduras identificadas e amplamente distribuídas nos nichos ecológicos (SICARD, LEGRAS, 2011).

Elas são capazes de sobreviver a condições mais restritas de umidade que as bactérias, porém são mais sensíveis que os bolores quanto à umidade necessária para seu desenvolvimento. Sua faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento é de 25°C a 30°C. Tem como característica, o crescimento favorecido em meio ácido, multiplicando-se melhor em aerobiose, com exceção das leveduras fermentadoras que se multiplicam melhor em anaerobiose, usam açúcar como fonte de energia (PRADO, 2014).

De acordo com Moraes (2013) em geral, as leveduras são organismos com um alto grau de organização celular, contendo núcleo celular delimitado por uma membrana nuclear e organelas como mitocôndria (responsáveis pelo metabolismo energético da célula), vacúolos (reservatório de nutrientes, enzimas e produtos tóxicos), retículo endoplasmático e Complexo de Golgi (Figura 3). A parede celular apresenta uma estrutura rígida (constituída de 25% do peso da célula), que protege a célula além de conter várias enzimas. A morfologia celular das leveduras pode ser de forma esférica, elipsoidal ou cilíndrica. O tamanho e forma das células dependem das condições ambientais como temperatura, escassez de nutrientes e competição pelo substrato, sendo variável entre 1-5 μm de largura e 5-12 μm de comprimento, apresentando-se normalmente maior que as bactérias.

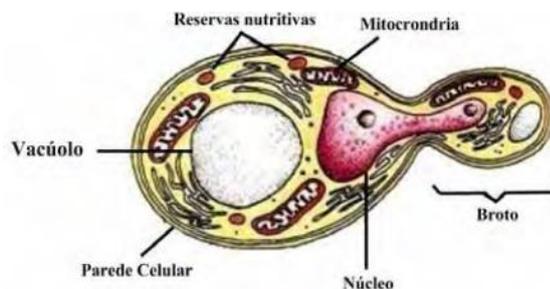


Figura 3. - Representação da estrutura interna da célula de levedura gerando um broto.

Fonte: Morais (2013)

As leveduras do gênero *Saccharomyces* se reproduzem de forma assexuada ou sexuada (WALKER, 1998). Em fermentações industriais a reprodução é assexuada, ocorrendo através da multiplicação das leveduras por brotamento ou gemulação, originando células-filhas idênticas a célula mãe. Neste processo o núcleo da célula madura se desloca para membrana celular, originando uma gêmula (broto), sendo que este núcleo se alonga atingindo o broto. Assim que o broto atinge o tamanho da célula mãe, o núcleo se divide, originando a célula filha, que pode permanecer ou não ligada a células mãe, formando cadeias de células. O brotamento pode ser em qualquer parte da célula (brotamento multilateral), apenas nos dois polos da célula (brotamento bipolar) ou ainda em um único polo das células (brotamento monopolar) (MORAIS, 2013).

As leveduras são responsáveis, na cervejaria, pela fermentação alcoólica as mais utilizadas são do gênero *Saccharomyces*, e as principais espécies utilizadas são *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* (BING et al. 2014).

3.6.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido amplamente estudada e utilizada na indústria de panificação e fabricação de cerveja (CHANG et al., 2007). Seu uso mais extenso, no Brasil, é na panificação, com 120 toneladas/ano. Também é empregada como agente de fermentação nas indústrias de cerveja, vinhos e álcool. Na forma inativada, pela ação do calor, é usada como fonte de nutrientes na alimentação animal e na alimentação humana, na forma de levedura íntegra ou de derivados de levedura (VILELA et al. ,2000).

Saccharomyces cerevisiae possui características incluindo cultivo fácil, curto período de geração e alta capacidade para a produção de compostos benéficos, como etanol e ácido cítrico (LANDRY et al., 2006).

A utilização de *S. cerevisiae* nos processos de fermentação alcoólica é muito ampla, uma vez que esta levedura suporta elevados níveis de etanol (12% a 15%), possui enzimas que hidrolisam oligossacarídeos como maltotriose e maltotrealose em glicose, para a produção e a transformação em etanol, e tolera alta concentração de açúcar. Em um processo de fermentação as leveduras são responsáveis pelo desdobramento dos açúcares presentes no substrato, convertendo-os em etanol e gás carbônico. A qualidade da bebida está fortemente relacionada à ecologia dos tipos microbianos e suas populações durante os processos de fermentação e maturação, sendo determinantes, tanto do rendimento de etanol como da formação e proporções relativas dos compostos secundários (PATARO et al., 2002; BERNARDI, 2007).

Avanços recentes em genética e bioquímica levaram ao estudo de *S. cerevisiae* como um organismo eucariótico modelo para pesquisas moleculares e celulares, da mesma forma que *Escherichia coli* é usada como modelo de procariontes. É, portanto, usado como um organismo modelo para descrever os processos biológicos básicos em muitos outros eucariotas superiores, incluindo humanos (WANG; CHEN, 2006). Nos últimos anos, tornou-se evidente que *S. cerevisiae* existe em vários habitats e, portanto, apresenta variação genética importante (CIANI et al., 2004; ZEYL, 2004; CHANG et al., 2007).

O gênero *Saccharomyces* inclui dois grupos de espécies: o grupo *Saccharomyces sensu stricto*, no qual estão as espécies estritamente associadas com a indústria da fermentação e o grupo *Saccharomyces sensu lato*, que compreende as espécies mais distantemente relacionadas a *S. cerevisiae* (RAINIERI et al., 2003).

Vários membros desse gênero que são filogeneticamente muito próximos de *S. cerevisiae* foram agrupados como o complexo de *Saccharomyces sensu stricto*; uma espécie associada à fermentação alcoólica (RAINIERI et al., 2003). Este complexo é composto por sete espécies: *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. pastorianus* e *S. kudriavzevii*. O taxon estéril *S. pastorianus*, que não representa uma espécie biológica, mas um híbrido provavelmente originado de *S. cerevisiae* x *S. bayanus* (NAUMOVA et al., 2003).

O grupo *sensu lato* inclui *S. exiguus*, *S. castellii*, *S. unisporus*, *S. dairenensis*, *S. servazzii* e *S. kuyveri* (MARINONI et al., 1999).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são micro-organismos facultativos, podem catabolizar açúcares para a produção de energia química celular (ATP) pelas vias aeróbia e anaeróbia (VENTURINI FILHO et al., 2013) que vai depender das condições da cultura e da disponibilidade do substrato e nutrientes disponíveis no meio ambiente (MORAIS, 2013).

3.6.2. *Sacharomyces pastorianus*

Louis Pasteur foi um dos primeiros a apreciar que as leveduras de alta e baixa fermentação eram dois grupos inerentemente distintos. O estilo de cerveja Lager existe pelo menos desde o século 15, quando foi produzido no estado alemão da Baviera e foi fabricado na época como uma cerveja castanho escuro. A cerveja lager ou "fermentada no fundo" é fabricada a baixas temperaturas (5-15°C) e não tem as notas florais pronunciadas típicas das cervejas. As leveduras envolvidas na fermentação da lager, além de serem criotolerantes, tendem a sedimentar após a floculação e afundar no fundo do vaso de fermentação (GIBSON et al., 2013).

O fermento para cervejas tipo Lager eram muito conhecidos como *S. carlsbergensis*, mas ultimamente foram renomeados *S. pastorianus*. Ao longo das últimas décadas, tornou-se geralmente aceito que as cepas de *S. pastorianus* são naturais, híbridos interespecíficos de *S. cerevisiae* e uma espécie *Saccharomyces* não *cerevisiae*. A publicação da primeira sequência de genoma completa de *S. pastorianus* *Weihenstephan* 34/70 (WS34/70) e a subsequente libertação de três sequências adicionais de *S. pastorianus* confirmaram que é um híbrido de *S. cerevisiae* e uma espécie intimamente relacionada com *S. bayanus*. Este resultado foi ainda refinado pela descoberta recente e análise de genoma de *S. eubayanus*, cuja sequência de genoma mostra uma identidade de 99,5% com a da parte não *cerevisiae* do genoma de *S. pastorianus* (BROEK, 2015).

A hibridação das duas espécies (presumivelmente a estirpe original de *S. cerevisiae* e o contaminante de *S. eubayanus*) resultou na criação de um híbrido com a forte capacidade fermentativa do primeiro e a tolerância ao frio destes últimos (GIBSON et al., 2013).

3.7. Viabilidade de leveduras cervejeiras

De forma rotineira, a concentração, a viabilidade e as porcentagens de brotação de *S. cerevisiae* são medidas durante a produção, o que pode auxiliar na estimativa da qualidade do produto, quantidade e tempo de fermentação do processo de fabricação (LAVERTY et al., 2013).

Existem métodos de viabilidade baseados na capacidade das células de levedura de crescer em meio sólido ou líquido. Um dos métodos mais utilizados é a análise do número de colônias UFC - unidade formadora de colônia (LONGO et al., 2012). Existem também outros métodos, como teste de detecção, medição da zona de inibição do crescimento e cultura em meio líquido. A outra categoria de métodos de medição de viabilidade inclui métodos baseados em coloração. Neste caso, tanto os corantes colorimétricos quanto os fluorescentes são usados. O mecanismo de ação desses corantes depende das propriedades da membrana celular (KLOWEK-MIREK, 2012).

Os corantes vitais tornaram-se o padrão para o teste de viabilidade. Desafios vitais de coloração de corantes a integridade da parede celular, bem como a capacidade da célula de reduzir ou extrudar o corante e permanecem coloridos. A coloração com azul de metileno tem sido o padrão para avaliação viabilidade de levedura desde a década de 1920 (WHITE et al., 2003).

O azul de metileno possui carga negativa, que é a mesma carga da membrana da levedura. Por isso, quando as células estão vivas, o corante não entra, mantendo as células incolores (SAMI et al., 1994).

A levedura ao longo do tempo pode perder sua capacidade de replicar, tornar-se incapaz de fermentar ou morrer. Alguns fatores que podem influenciar são concentração de CO₂ ou nutrição. Determinar a condição da levedura é útil em repetir um número consistente de células de fermento "ao vivo" (WHITE et al., 2003).

3.8. Vitalidade de leveduras cervejeiras

As cervejarias tentam determinar a qualidade do fermento por medida de viabilidade (a porcentagem de células vivas dentro de uma população) e / ou vitalidade (levedura metabolicamente ativa) (LAVERTY et al., 2013).

A vitalidade também é dependente de vários fatores, tais como controle de temperatura de armazenamento, taxa de inoculação no mosto e mutações deletérias que surgem espontaneamente na população de leveduras (SUHRE, 2014).

Os métodos para determinação da vitalidade celular das leveduras baseiam-se em estudos de vários aspectos do estado fisiológico das células. Esses métodos se dividem em três categorias: determinação do conteúdo de ATP celular com base na reação de luciferina (ANSEHN & NILSSON, 1984); (2) determinação do potencial de membrana mitocondrial com base na coloração com rodamina (LUDOVICO et al., 2001); e (3) determinação da atividade de enzimas, por exemplo, oxidoredutases (LEVITZ & DIAMOND, 1985).

Métodos para testar a viabilidade e a vitalidade das células das leveduras giram em torno da perda de capacidade de replicação, danos celulares e perda de atividade metabólica. O teste de potência de acidificação, que mede a capacidade de a célula de levedura para reter as concentrações de íons de hidrogênio intracelulares e extracelulares adequadas, é uma medida de vitalidade relativamente simples (WHITE et al., 2003).

Durante a fermentação, a capacidade da levedura de acidificar o meio pode ser proveniente da produção de CO₂ e extrusão de H⁺ pela proteína PMA1(H⁺ ATPase da membrana de *S.cerevisiae*). Assim, uma forma eficiente e rápida de estimar a vitalidade é o uso de métodos capazes de medir extrusão de H⁺ pelas leveduras (KARA et al., 2008).

Quando após a fermentação há alta vitalidade significa que houve um processo rápido com o mínimo de subprodutos indesejados, enquanto que a baixa vitalidade resulta em fermentação lenta. Por isso, tanto a viabilidade quanto a vitalidade são métodos importantes para controlar a qualidade do fermento (WEIGERT, 2009).

4. REFERÊNCIAS

ANSEHN S & NILSSON L; Direct membrane-damaging effect of ketoconazole and tioconazole on *Candida albicans* demonstrated by bioluminescent assay of ATP. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 26, p.22–25, 1984.

ARNOLD, J. P; **Origin and History of Beer and Brewing**: From Prehistoric Times to the Beginning of Brewing Science and Technology. Cleveland, Ohio, 2005.

BERNARDI, T.L. **Técnicas moleculares para a caracterização de *Saccharomyces cerevisiae* associadas à produção de cachaça**. Universidade Federal de Lavras, 2007.

BING, J; HAN, P; LIU, W; et al., Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. **Current biology**, v. 24, p380-381, 2014.

BOKULICH, N. A., BAMFORTH, C. W. The microbiology of malting and brewing, **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 77, n.2, p. 157–172, 2013.

BORTOLI, D A. S. et al. Leveduras e produção de cervejas Revisão. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 3, n. 1, p. 45-58, 2013.

BRASIL. Decreto n. 2.314, de 04 de setembro de 1997. 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. **Boletim IOB**, n. 38, p. 11-30, 1997.

BROEK, M. V. D, et al. Chromosomal copy number variation in *Saccharomyces pastorianus* is evidence for extensive genome dynamics in industrial lager brewing strains, **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, n.18, 2015.

CALLEMIEN, D; COLLIN, S. Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer - a review. **Food Reviews International**, v.26, p.81– 84, 2010.

CARVALHO, B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte—as leveduras. **Revista Analytica**, n. 25, p. 46-54, 2006.

CIANI, M., MANNAZZU, I. MARINANGELI, P., CLEMENTI, F., MARTINI, A. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.85, p.159–164, 2004.

CHANG, H.W et al. Quantitative real time PCR assays for the enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* and the *Saccharomyces sensu stricto* complex in human feces, **Journal of Microbiological Methods** , v. 71, p. 191–201, 2007.

COELHO-COSTA, E. R; A bebida de Ninkasi em terras tupiniquins: O mercado da cerveja e o Turismo Cervejeiro no Brasil. **Revista Iberoamericana de Turismo**, v. 5, n. 1, p. 22-41, 2015.

CUKALOVIC, I. J.L, et al. Medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* in the production of special beer types. **Zbornik Matice srpske za prirodne nauke**,v.107, p.111-117, 2009.

CURI, R. A. **Produção de cerveja utilizando cevada como adjunto de malte**. 2006. Tese de Doutorado: Faculdade de Ciências Econômicas. Universidade Estadual Paulista.

DRAGONE, G; MUSSATTO, S. I; SILVA, J. B.A; Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 37-40, 2007.

ELTERMANN, E.E.; MATOS, A.M.; SILVA, D.A. Microcervejarias catarinenses e o turismo: da formação de tipologias do produto às aproximações com a atividade. **Applied Tourism**, v.1, n.2, p. 73-95, 2016.

GIBSON B.R, STORGÅRDS E; KROGERUS K; VIDGREN V; Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Frohberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. **Yeast**, v.30, p.255–266, 2013.

HERMOGENES, R; VASCONCELOS, R. L; MARTINS, V. M; Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 16, n. 4, p. 171-191, 2011.

HIERRO, N.; GONZÁLEZ, A.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. New PCR based methods for yeast identification. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p. 792-801, 2004.

HORNSEY, I.S.; **A history of beer and brewing**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 10, 2003.

KARA, B. V.; SIMPSON, W. J.; HAMMOND, J. R. M. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 94, n. 3, p. 153-158, 1988.

KOIVULA, T.T; JUVONEN, R; HAIKARA, A; SUIHKO, M.L; Characterization of the brewery spoilage bacterium *Obesumbacterium proteus* by automated ribotyping and development of PCR methods for its biotype 1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 398–406, 2006.

KOOB, J; JACOB, F; GRAMMER, M., RIEDL, R., HUTZLER, M. PCR Analysen | 254 bierschädlicher Bakterien 2012 und 2013. **Brauwelt**, v.10, e.1, p. 288–290, 2014.

KONDO, K; Beer and health: Preventive effects of beer componentes on lifestyle-related diseases. **Biofactors**, 2004, v.22, p. 303-310, 2004.

Kwolek-Mirek, M; Zadrag-Tecza, R; Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells **FEMS Yeast Research**, v.14, p.1068–1079, 2014.

LANDRY, C.R., TOWNSEND, J.P., HARTL, D.L., CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**, v.15, p.575–591, 2006.

LAVERTY, D.J; KURY, A.L; KUKSIN, D; PIRANI, A; FLANAGAN, K; CHAN, L.L.Y; Automated quantification of budding *Saccharomyces cerevisiae* using a novel image cytometry method. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology** v.40, p.581–588, 2013.

LEVITZ SM & DIAMOND RD; A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. **J Infect Dis** v. 152, p. 938–945, 1985.

LIMURI, T; et al. Construction of a novel beer proteome map and its use in beer quality control. **Food Chemistry**, v. 118, p. 566–574, 2010.

LONGO,VD, SHADEL, GS, KAEBERLEIN M & KENNEDY ,B; Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Metab**, v. 16, p. 18–31, 2012.

LUDOVICO P, SANSONETTY F & CORTE-REAL M; Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. **Microbiology**, v.147, p.3335–3343, 2001.

MAYORAL, M.B.; MARTÍN, R.; SANZ, A.; HERNÁNDEZ, P.E; GONZÁLEZ, I; GARCÍA, T. Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.27-34, 2005.

MARINONI, G.; MANUEL, M.; PETERSEN, R.F.; HVIDTFELDT, J.; SULO, P.; PISKUR, J. Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeasts. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.20, p.6488-6496, 1999.

MEGA, J. F; NEVES, E; ANDRADE, C. J. A produção de cerveja no Brasil. **Revista Hestia Ciência, Tecnologia, Inovação e Oportunidade**, v. 1, n. 1, p. 21-29, 2011.

MORADO, R; **Larousse da cerveja**. São Paulo. Larousse do Brasil, 2009.

MORAIS, M.R. **Estudo sobre interações entre leveduras *Saccharomyces cerevisiae* nas fermentações em batelada alimentada em altas temperaturas**. Tese de Doutorado (Programa de pós-graduação em Biotecnologia). 2013. Universidade Estadual Paulista.

MUDURA E; COLDEA, T.E; PLEȘCA, V; FĂRCAS, A; Special beer obtained by synchronous alcoholic fermentation of two different origin substrates.**Bulletin UASVM Food Science and Technology**, v.73, e.2, 2016.

NAUMOVA, E.S.; KORSHUNOVA, I.V.; JESPERSEN, L.; NAUMOV, G. Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. **FEMS Yeast Research**, v.3, p.177-184, 2003.

NGUYEN, H.V; GAILLARDIN, C. Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* as a distinct species. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 4-5, p. 471-483, 2005.

NELSON, Max. **The barbarian's beverage: A history of beer in ancient Europe**. Routledge, 2005.

NOBRE, T.P; HORII, J; ALCARDE, A. R; Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007.

OLMO, A.D; BLANCO, C.A; PALACIO,L; PRÁDANOS, P; HERNÁNDEZ, A; Pervaporation methodology for improving alcohol-free beer quality through aroma recovery. **Journal of Food Engineering**, v.133, p.1-8, 2014.

PALMER, J. **How to brew: Everything You Need to Know to Brew Great Beer Every Time**. EUA: Brewers Publications, 2006.

PATARO, C.; GOMES, F.C.O.; ARAÚJO, R.A.C.; ROSA, C.A.; SCHWAN, R.F.; CAMPOS, C.R.; CLARET, A.S.; CASTRO, H.A. de. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.217, p.37-43, 2002.

PIAZZON, A.; FORTE, M; NARDINI, M; Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p. 10677–10683, 2010.

PINTO, L. I. F; ZAMBELLI, R. A ; SANTOS JUNIOR, E. C; PONTES, D. F; Desenvolvimento de Cerveja Artesanal com Acerola (*Malpighia emarginata*) e Abacaxi (*Ananas comosus*), **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.10, n.4, p.67-71, 2015.

PIRES, E.J; TEIXEIRA, A.J; BRÁNYIK, T; VICENTE, A.A. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast, **Applied Microbiology Biotechnology**, v.98, p.1937–1949, 2014.

PRADO, J. L.. **Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica**. Dissertação de Mestrado. 2014. Universidade Estadual Paulista.

PERST, A.G., HAMMOND, J.R.M. AND STEWART, G.S.A.B. Biochemical and molecular characterization of *Obesumbacterium proteus*, a common contaminant of brewing yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1635–1640, 1994.

RAINIERI, S.; ZAMBONELLI, C.; KANEKO, Y. *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, genetic diversity and evolution. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 1, p.1-9, 2003.

RAINIERI, S; KODAMA, Y.; KANEKO, Y.; MITAKA, K; NAKAO, Y.; Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3968-3974, 2006.

REBELLO, F.F.P. Produção de cerveja. **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n. 3, 2009.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SAMI, M; IKEDA, M; YABUUCHI, S; Evaluation of the Alkaline Methylene Blue staining method for yeast activity determination. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.78, e. 3, p. 212-216, 1994.

SANTOS, S.P. **Os primórdios da cerveja no Brasil**. 2.ed. - Cotia: Ateliê Editorial, 2004.

SEBRAE. **Potencial de consumo de cervejas no Brasil**. Agronegócio - Resposta Técnica. 2014. Disponível em:<
http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/sebrae%202014/Estudos%20e%20Pesquisas/2014_07_08_RT_Agroneg%C3%B3cio_Potencial_de_consumo_de_cervejas_no_Brasil.pdf>. Acesso em: 27/08/2017.

SHERMAN, F. **An Introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, v.6, p302-325, 1998.

SICARD, D; LEGRAS, J. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Comptes Rendus Biologies**,v.334, 2011.

SILVA, A. E. et al. Elaboração de cerveja com diferentes teores alcoólicos através de processo artesanal. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 3, p. 369-374, 2009.

SUHRE, T.. **Controle de qualidade em microcervejarias: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Bacharelado de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

TURVEY, M.E; WEILAND, F; KELLER, E.J; HOFFMANN, P; The changing face of microbial quality control practices in the brewing industry: Introducing mass spectrometry proteomic fingerprinting for microbial identification. **The Institute of Brewing**, v.123, p.373–387, 2017.

VAN VUUREN, H.J.J; PRIEST, F.G. Gram-negative brewery bacteria. **In Brewing Microbiology**, p. 119–245, 2003.

VANDERHAEGEN, B; DELVAUX, F; DAENEN, L; VERACHTERT, H; DELVAUX, F.D. Aging characteristics of different beer types. **Food Chemistry**, v.103, p. 404-412; 2007.

VELJOVIC, M; DJORDJEVIC, R; CUKALOVIC, I.L; LAKIC, N; DESPOTOVIC, S; PECIC, S; NEDOVIC, N; The possibility of producing a special type of beer made from wort with the addition of grape must. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 116, n. 4, 2010.

VELJOVIC, M; DESPOTOVIC, M; STOJANOVIC; PECIC, S; VUKOSAVLJEVIC, P; BELOVIC, M; CUKALOVIC, I.L; The fermentation kinetics and physicochemical properties of special beer with addition of prokupac grape variety. **Chemical Industry Chemical Engineering**, v.21 n.3, p. 391-397, 2015.

VENTURINI FILHO, W. G, BRUNELLI, L.T; TONIATO, J.; NOJIMOTO, T; NOVAES, F.V; Método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de

levedura alcoólica. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 2, 2013.

VENTURINI FILHO, W. G. **Fécula de mandioca como adjunto de malte na fabricação de cerveja**. Botucatu, 1993. 233p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

VENTURINI FILHO, W.G. **Tecnologia de bebidas**: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. São Paulo: Edgard Blücher, cap. 15, p. 347-382, 2005.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de cerveja**. Jaboticabal: Funep, 83 p, 2000.

VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D; Determinação do valor proteico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). **Revista de Nutrição**, v.13, n.3, p.185-192, set./dez. 2000.

VINSON, A. J; MANDARANO, M.; HIRST, M; TREVITHICK, R. J; BOSE, P; Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.51, n.18, p. 5528-5533, 2003.

WALKER, M. W. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1998.

WANG, J, CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Biotechnology**. v. 24, 427–451, 2006.

WEIGERT, C; STEFFLER,F; KURZ,T; SHELLHAMMER, T.H; METHNER, F.J; Application of a short intracellular ph method to flow cytometry for determining *Saccharomyces cerevisiae* vitality. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n.17, p. 5615–5620, 2009.

WHITE, L.R; RICHARDSON, K.E; SCHIEWE, A.J; WHITE, C.E; **Comparison of yeast viability/vitality methods and their relationship to fermentation performance**. *Brewing Yeast Fermentation Performance*, v. 2, 2003.

ZEYL, C. Capturing the adaptive mutation in yeast. **Research in Microbiology**, v.155, p.217–223, 2004.

ZANIOL, G. Z. **Análise da concentração na indústria cervejeira brasileira no período entre 1989 e 2011**. Trabalho de Conclusão de Curso: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.

ZHANG, Y, et al. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. **Letters in Applied Microbiology**, v.51, 2010.

CAPITULO II

VIABILIDADE E VITALIDADE DE *Saccharomyces*: UM ESTUDO SOBRE UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO DE CERVEJAS ARTESANAIS

Palloma de Souza Santos¹, Celso Duarte Carvalho Filho¹, Alaíse Gil Guimarães¹

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

RESUMO

A cerveja é uma das bebidas mais populares do mundo, as do tipo artesanal se diferenciam das produzidas em alta escala por serem produtos com base na qualidade e diversidade, por estas razões, se tornam um produto de preço mais elevado. A levedura utilizada na fermentação geralmente é um produto importado, então a reutilização do resíduo da fermentação pode trazer benefícios e redução de custos aos microcervejeiros. Com isso, este estudo teve o objetivo de avaliar a viabilidade e vitalidade das leveduras cervejeiras provenientes do resíduo da fermentação da cerveja artesanal em diferentes tempos e diferentes formas de armazenamento. Foram elaboradas seis cervejas com diferentes cepas de *Saccharomyces* dos tipos ale e lager, o resíduo da fermentação de cada cerveja foi coletado e uma parte dele passou por um tratamento de lavagem. Em seguida, o resíduo foi armazenado sob refrigeração (8-10°C), congelamento (-22°C), congelamento em ultrafreezer (-80°C) e congelamento (-22°C) com adição de meio de cultura e glicerol por um período de 90 dias. A cada quinze dias foram realizadas análises de viabilidade das leveduras utilizando-se o método de coloração pelo azul de metileno e vitalidade pelo método do poder de acidificação do meio. Todas as cepas tiveram tendência de queda tanto de viabilidade quanto vitalidade durante todo período de armazenamento. Contudo, quando mantidas sob refrigeração (8-10°C), foram obtidos os maiores valores nas contagens da viabilidade e vitalidade celular.

Palavras-chave: leveduras cervejeiras; resíduo cervejeiro; fermentação alcoólica.

1. INTRODUÇÃO

No processo moderno de fabricação de cerveja muitos estilos se desenvolveram ao longo do tempo e as microcervejarias são uma das grandes responsáveis por este acontecimento, pois, representam uma atitude alternativa e uma abordagem para a criação, flexibilidade, adaptabilidade, oferecendo um produto mais encorpado, com aroma e sabor diferenciados, devido ao desenvolvimento de um produto com ingredientes especiais, com maior quantidade de malte. A produção de cerveja artesanal

utiliza estratégia de *marketing* diferente das grandes cervejarias, oferecendo produtos que competem com base na qualidade e diversidade, em vez de baixo preço e publicidade (LODOLO et al. 2008; BOTTARI; CAMPARI; GATTI, 2014; SEBRAE, 2017).

As cervejas podem ser obtidas pelo processo de alta e baixa fermentação. *Saccharomyces cerevisiae*, é a levedura mais frequentemente utilizada para fabricação de cerveja na alta fermentação (REVERON; BARREIRO; SANDOVAL, 2003). Possui características como cultivo fácil, curto período de geração e alta capacidade para a produção de compostos benéficos, como etanol (LANDRY et al. 2006). Esta levedura suporta elevados níveis de etanol (12% a 15%), metaboliza oligossacarídeos como maltotriose e maltotrealose em glicose, para a produção e a transformação em etanol, e tolera alta concentração de açúcar (PATARO et al. 2002).

Tradicionalmente, as cervejas de baixa fermentação são fabricadas com *Saccharomyces pastorianus*, um híbrido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces eubayanus*. O seu papel central na indústria de fabricação de cerveja é devido suas propriedades biológicas, como a capacidade de fermentar eficientemente açúcares de mosto, obtido da *S. cerevisiae* e tolerância ao frio, obtida da *S. eubayanus* (GIBSON, LITI, 2015; NIKULIN, KROGERUS, GIBSON, 2018).

Experimentos laboratoriais demonstraram que existe influência significativa da quantidade de levedura inoculada como também da vitalidade de sua biomassa para apresentar um melhor produto final. A redução do número de brotação da levedura é suscetível a alguns fatores como: mudanças no pH, oxigênio, CO₂, etanol (WHITE et al. 2003; VERBELEN et al. 2009; KUCHARCZYK; TUSZYŃSKI, 2015).

As cervejarias determinam a qualidade do fermento por medida de viabilidade (a percentagem de células vivas dentro de uma população) e vitalidade (levedura metabolicamente ativa). Estas análises estão relacionadas à avaliação da perda de capacidade de replicação, perda de atividade metabólica, como também a presença de danos celulares nas leveduras (WHITE et al. 2003). Rotineiramente, concentração, viabilidade, e as porcentagens de brotação de *S. cerevisiae* são avaliadas durante a produção, o que pode auxiliar na estimativa da qualidade do produto, quantidade e o tempo de fermentação do processo de manufatura da cerveja (LAVERTY et al. 2013).

De acordo com Ginorvat (2011), a fermentação para produzir cerveja é a única dentro da indústria de bebidas alcoólicas que a levedura não é descartada após o uso, e sim reutilizada para fabricação de novas cervejas, processo denominado "repetição em

série". Este processo é comum na produção de cerveja, inclusive das artesanais, e favorece a redução dos custos de produção. Pois, o custo de aquisição do fermento acaba sendo elevado, visto que é um produto importado (BORTOLI, 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade e vitalidade das leveduras cervejeiras em diferentes tempos e formas de armazenamento, a fim de reaproveitar o resíduo da fermentação da cerveja artesanal e trazer conhecimentos de qual a melhor maneira de reaproveitar este resíduo e também auxiliar na redução de custos do produto final.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente foram elaboradas seis cervejas, cada uma com uma cepa *Saccharomyces* diferente, quatro cepas para alta fermentação (S04, S05, T58-Fermentis, M15-Mangrove Jack's) e duas cepas para baixa fermentação (W34-70-Fermentis, M54-Mangrove Jack's). As cepas liofilizadas foram adquiridas no comércio. O mosto foi elaborado por uma microcervejaria em Salvador utilizando 100% de malte Pilsen (Globomalte) adicionado de lúpulo de amargor (Warrior 15% alfa ácido) e lúpulo de aroma (Saaz 4% alfa ácido), apresentando no final 13 de IBU e 15°Brix. O mesmo foi transportado até o laboratório em seis recipientes de 10 litros cada, sob refrigeração. No laboratório, antes da inoculação, cada cepa foi reidratada com água mineral a 30°C por 20 minutos, segundo as recomendações dos fabricantes. Após este processo ocorreu à inoculação de seis gramas de cada levedura reidratada nos respectivos recipientes e deixadas em fermentação por sete dias em temperatura de 18°C para as cepas de alta fermentação e 12°C para as de baixa fermentação. Após o período da fermentação, houve a maturação por mais sete dias à temperatura de 2°C. Para controle da fermentação foi aferido o °Brix inicial, por meio de refratômetro REF 103, e após sete dias e ao final do processo, com 15 dias.

Realizada a coleta, cada resíduo da fermentação, volume aproximado de de 400 mL, foi dividido em duas partes, metade dela passou pelo tratamento de lavagem que consistiu na adição de água mineral e descarte da água em três tempos de três horas (Martin et al., 2003) no intuito de eliminar substâncias que poderiam interferir na viabilidade e vitalidade das leveduras.

Alíquotas de 200 mL de cada amostra foram armazenadas em tubos do tipo Falcon e levadas para acondicionamento sob refrigeração (8-10°C), congelamento (-

22°C), congelamento em ultrafreezer (-80°C) e por último, em congelamento (-22°C) com adição de 20% por volume de caldo YPD [extrato de levedura (1%); peptona (2%); glicose (2%)] e glicerol (20% p.v). As amostras foram analisadas em sete tempos (T0= 0 dia; T1=15 dias; T2=30 dias; T3=45 dias; T4=60 dias; T5=75 dias; T6=90 dias) e em triplicata para a contagem total do número de leveduras, vitalidade e viabilidade.

A contagem total das células foi obtida por meio de hemocitômetro (NERO, 1964). Inicialmente foi feita uma suspensão celular obtida por meio da diluição de 1:10 do resíduo da fermentação. Uma alíquota de 10 µL desta suspensão celular foi colocada em câmara Neubauer e levada ao microscópio óptico (OLYMPUS), no qual foi realizada a contagem total das células (aumento 40x), posteriormente foi feito o cálculo de multiplicação do total de células com o fator de diluição da suspensão celular como também do volume da câmara.

O método de coloração por azul de metileno (SAMI et al., 1994) foi utilizado para análise de viabilidade das leveduras. A suspensão celular obtida por meio da diluição de 1:10 do resíduo da fermentação foi misturada em mesma quantidade com volume igual da solução aquosa de azul de metileno a 0,1%. Posteriormente uma alíquota de 10 µL foi aplicada em câmara Neubauer e levada a microscópio óptico (OLYMPUS) para a contagem (aumento 40x).

Foi considerada viável a célula que não apresentou coloração, e a corada de azul, inviável.

Para o cálculo da viabilidade da amostra, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\mathbf{Viabilidade(\%)} = \frac{\Sigma v}{\Sigma total} \times 100 \quad (1)$$

Onde $\Sigma total$ é o somatório total das células da amostra e Σv é o somatório total das células viáveis.

O teste de acidificação do meio (KARA et al., 1998) foi utilizado para a verificação da vitalidade das leveduras. Inicialmente, o pH da água deionizada foi ajustado para 6,5 pH ($\pm 0,3$). A água deionizada (15 mL) foi colocada em tubo do tipo Falcon e o pH da água foi monitorizado durante 5 min. Ao final de 5 min, foi registrada a leitura de pH (AP0) e 5 mL de levedura concentrada (em pasta) foram adicionados ao tubo e, em seguida, centrifugados a 3000 g, durante 10 minutos, 25°C, (Eppendorf 5702R). Após este período foi medido o valor de pH (AP10). Em seguida, foram

adicionados 5 mL de uma solução de glicose a 20% à suspensão de levedura e após 10 min foi realizada a leitura final do pH (AP20).

O cálculo da vitalidade foi obtido pela equação:

$$\text{Vitalidade} = (AP0 - AP20)$$

Sendo: AP0= pH inicial

AP20= pH no final de 10 min após adição da glicose.

Após obter os valores de viabilidade nos determinados tempos foi calculada a quantidade de resíduo de fermentação necessária para produção de 10 litros de cerveja por meio do software Berrsmith™, que auxilia os microcervejeiros na fabricação de cerveja.

A estatística descritiva foi utilizada para interpretar o conjunto de resultados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O °Brix no tempo inicial (T0) foi o mesmo para todos os ensaios (15° Brix) correspondentes a um teor de açúcar de aproximadamente 150 g/L. Após a primeira semana de fermentação houve queda para os ensaios que utilizaram as cepas de alta fermentação S05, T58, S04 e M15, com média $6,5^{\circ} \pm 0,2$. Para os outros onde as cepas de baixa fermentação W34/70 e M54 foram utilizadas, a média foi de $11,35^{\circ} \pm 0,15$ (Tabela 1).

Ao final da fermentação, com 15 dias, a média do ° Brix para as cervejas foi de $5,6^{\circ} \pm 0,93$. Observa-se menor valor de °Brix para as cervejas que utilizaram as cepas T58, M15 e S04 conseqüentemente estas cervejas tiveram melhores atuações das suas respectivas leveduras inoculadas, reduzindo assim os compostos solúveis presentes no extrato de malte (Tabela 1). Valores próximos foram encontrados no estudo de Grassi e colaboradores (2014) $5,19 \pm 0,04^{\circ}$ Brix após 250 horas de fermentação, como também nos estudos de Almonacid e colaboradores (2012) que obtiveram o valor aproximado de 6°Brix ao final da fermentação. De acordo com Castritius (2012) a atenuação da cerveja é um importante critério para qualidade da bebida e é determinada na indústria de cerveja como uma análise diária de rotina de acordo com o método da European Brewery Convention (EBC). O extrato dissolvido tem um impacto significativo no sabor da cerveja.

Tabela 1. Valores de °Brix (°Bx) dos mostos cervejeiros inoculados com diferentes cepas de *Saccharomyces*

Fermentação	Cepas	Inicial (°Bx)	1ª semana de	2ª semana de
			fermentação (°Bx)	fermentação (°Bx)
Alta (18°C)	S05	15	6,5	5,9
	T58	15	6,2	4,5
	S04	15	6,9	5,2
	M15	15	6,4	4,3
Baixa (12°C)	W34/70	15	11,5	6,2
	M54	15	11,2	7,5

O número de células de leveduras ficou na ordem de 10^6 cel/mL para as cepas T58, M54, S04, S05 e W34-70 em todas as formas de armazenamento e que passaram pelo tratamento de lavagem, se mantiveram nesta contagem por todo o período analisado de 90 dias (Tabela 2). Apenas a levedura M15 no tempo zero obteve uma contagem de 10^7 cel/mL. No período 15 dias a cepa se manteve em 10^7 cel/mL tanto para o armazenamento em congelamento (-22°C) quanto para congelamento em meio de cultura (-22°C). A partir da análise com 30 dias houve decréscimo para 10^6 cel/mL para estas formas de armazenamento, se igualando às outras técnicas testadas (refrigeração e ultracongelamento).

Tabela 2. Contagem total de células (cel/mL) de diferentes cepas de *Saccharomyces* sp. lavadas e conservadas sob refrigeração, congelamento (-22°C), congelamento (-22°C) com meio de cultura e glicerol e em ultracongelamento (-80°C) no período de 90 dias.

Cepas	TEMPO (DIAS)							
	0	15	30	45	60	75	90	
M15	R	$1,26 \times 10^7$	$7,15 \times 10^6$	$3,31 \times 10^6$	$1,39 \times 10^6$	$3,16 \times 10^6$	$3,31 \times 10^6$	$5,20 \times 10^6$
	M	$1,26 \times 10^7$	$1,23 \times 10^7$	$9,18 \times 10^6$	$7,31 \times 10^6$	$4,05 \times 10^6$	$3,61 \times 10^6$	$3,38 \times 10^6$
	C2	$1,26 \times 10^7$	$2,13 \times 10^7$	$6,28 \times 10^6$	$4,91 \times 10^6$	$4,71 \times 10^6$	$3,56 \times 10^6$	$2,43 \times 10^6$
	C8	$1,26 \times 10^7$	$6,25 \times 10^6$	$8,55 \times 10^6$	$7,66 \times 10^6$	$5,95 \times 10^6$	$6,65 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$

T58	R	7,11x10 ⁶	3,61x10 ⁶	1,60x10 ⁶	6,25x10 ⁶	4,92x10 ⁶	2,16x10 ⁶	3,08x10 ⁶
	M	7,11x10 ⁶	2,83x10 ⁶	1,48x10 ⁶	2,16x10 ⁶	1,90x10 ⁶	1,70x10 ⁶	3,65x10 ⁶
	C2	7,11x10 ⁶	9,16x10 ⁶	5,21x10 ⁶	3,80x10 ⁶	4,58x10 ⁶	3,66x10 ⁶	3,75x10 ⁶
	C8	7,11x10 ⁶	3,43x10 ⁶	3,38x10 ⁶	4,10x10 ⁶	4,36x10 ⁶	2,25x10 ⁶	3,78x10 ⁶
M54	R	5,95x10 ⁶	7,15x10 ⁶	4,52x10 ⁶	2,0x10 ⁶	3,48x10 ⁶	2,25x10 ⁶	1,82x10 ⁶
	M	5,95x10 ⁶	3,97x10 ⁶	4,42x10 ⁶	3,30x10 ⁶	3,48x10 ⁶	2,18x10 ⁶	2,50x10 ⁶
	C2	5,95x10 ⁶	6,93x10 ⁶	4,05x10 ⁶	3,63x10 ⁶	2,43x10 ⁶	3,20x10 ⁶	3,70x10 ⁶
	C8	5,95x10 ⁶	4,85x10 ⁶	4,13x10 ⁶	4,27x10 ⁶	4,80x10 ⁶	3,80x10 ⁶	2,83x10 ⁶
S04	R	7,43x10 ⁶	3,0x10 ⁶	4,21x10 ⁶	5,41x10 ⁶	6,90x10 ⁶	5,76x10 ⁶	5,78x10 ⁶
	M	7,43x10 ⁶	3,47x10 ⁶	1,53x10 ⁶	2,25x10 ⁶	1,60x10 ⁶	1,43x10 ⁶	1,85x10 ⁶
	C2	7,43x10 ⁶	9,25x10 ⁶	1,98x10 ⁶	4,28x10 ⁶	4,40x10 ⁶	3,20x10 ⁶	4,41x10 ⁶
	C8	7,43x10 ⁶	8,25x10 ⁶	9,08x10 ⁶	6,50x10 ⁶	5,88x10 ⁶	4,31x10 ⁶	3,85x10 ⁶
W34/70	R	7,01x10 ⁶	4,95x10 ⁶	6,22x10 ⁶	4,51x10 ⁶	3,76x10 ⁶	8,45x10 ⁶	7,71x10 ⁶
	M	7,01x10 ⁶	4,66x10 ⁶	4,08x10 ⁶	2,85x10 ⁶	2,26x10 ⁶	3,68x10 ⁶	3,31x10 ⁶
	C2	7,01x10 ⁶	9,25x10 ⁶	1,88x10 ⁶	1,14x10 ⁷	4,35x10 ⁶	4,16x10 ⁶	4,21x10 ⁶
	C8	7,01x10 ⁶	3,08x10 ⁶	4,30x10 ⁶	4,18x10 ⁶	2,44x10 ⁶	2,75x10 ⁶	3,76x10 ⁶
S05	R	4,06x10 ⁶	1,03x10 ⁶	1,51x10 ⁶	2,66x10 ⁶	2,50x10 ⁶	1,96x10 ⁶	2,05x10 ⁶
	M	4,06x10 ⁶	2,80x10 ⁶	2,30x10 ⁶	1,58x10 ⁶	1,36x10 ⁶	1,88x10 ⁶	1,90x10 ⁶
	C2	4,06x10 ⁶	6,21x10 ⁶	3,41x10 ⁶	2,15x10 ⁶	2,30x10 ⁶	1,61x10 ⁶	2,78x10 ⁶
	C8	4,06x10 ⁶	6,45x10 ⁶	2,76x10 ⁶	2,83x10 ⁶	3,48x10 ⁶	3,26x10 ⁶	2,73x10 ⁶

R = refrigeração (8-10°C), **C2** = congelamento (-22°C), **C8** = ultracongelamento (-80°C), **M** = congelamento(-22°C) com meio de cultura e glicerol.

Para o tratamento das leveduras não lavadas a contagem total de células ficou também ao redor de 10⁶ cel/mL para as cepas M54, T58, S04, S05, W34-70. Apenas a M15 iniciou com contagem de 10⁷ cel/mL e se manteve constante até 30 dias após o processo de fermentação nos armazenamentos sob refrigeração e congelamento (-22°C; -80°C). Após esse período, a contagem reduziu para a ordem de 10⁶ cel/mL (Tabela 3).

Tabela 3. Contagem total de células (cel/mL) de diferentes cepas de *Saccharomyces* sp. não lavadas e conservadas sob refrigeração, congelamento (-22°C), congelamento (-22°C) com meio de cultura e glicerol e ultracongelamento (-80°C) em um período de 90 dias.

Cepas	TEMPO (DIAS)							
	0	15	30	45	60	75	90	
M15	R	1,34x10 ⁷	2,35x10 ⁷	1,39x10 ⁷	5,78x10 ⁶	7,9x10 ⁶	6,50x10 ⁶	5,65x10 ⁶
	M	1,34x10 ⁷	1,07x10 ⁷	8,66x10 ⁶	6,87x10 ⁶	3,66x10 ⁶	4,23x10 ⁶	3,24x10 ⁶
	C2	1,34x10 ⁷	1,7x10 ⁷	1,05x10 ⁷	8,78x10 ⁶	7,05x10 ⁶	4,51x10 ⁶	4,84x10 ⁶
	C8	1,34x10 ⁷	9,86x10 ⁶	1,15x10 ⁷	9,00x10 ⁶	7,65x10 ⁶	6,75x10 ⁶	5,23x10 ⁶
T58	R	6,21x10 ⁶	2,13x10 ⁶	1,43x10 ⁶	7,03x10 ⁶	4,10x10 ⁶	3,63x10 ⁶	2,38x10 ⁶
	M	6,21x10 ⁶	2,55x10 ⁶	4,15x10 ⁶	2,80x10 ⁶	2,45x10 ⁶	1,48x10 ⁶	4,02x10 ⁶
	C2	6,21x10 ⁶	1,30x10 ⁷	5,01x10 ⁶	6,60x10 ⁶	3,51x10 ⁶	3,55x10 ⁶	3,61x10 ⁶
	C8	6,21x10 ⁶	4,46x10 ⁶	1,04x10 ⁷	4,98x10 ⁶	4,15x10 ⁶	2,38x10 ⁶	4,35x10 ⁶
M54	R	5,3x10 ⁶	1,74x10 ⁶	1,50x10 ⁶	2,24x10 ⁶	2,22x10 ⁶	1,72x10 ⁶	1,97x10 ⁶
	M	5,3x10 ⁶	9,5x10 ⁶	3,73x10 ⁶	3,15x10 ⁶	1,58x10 ⁶	2,13x10 ⁶	2,13x10 ⁶
	C2	5,3x10 ⁶	1,04x10 ⁶	3,77x10 ⁶	4,08x10 ⁶	4,40x10 ⁶	4,60x10 ⁶	4,05x10 ⁶
	C8	5,3x10 ⁶	4,15x10 ⁶	3,9x10 ⁶	3,89x10 ⁶	3,73x10 ⁶	2,85x10 ⁶	4,27x10 ⁶
S04	R	8,05x10 ⁶	8,30x10 ⁶	7,25x10 ⁶	7,13x10 ⁶	3,06x10 ⁶	4,96x10 ⁶	5,55x10 ⁶
	M	8,05x10 ⁶	5,46x10 ⁶	1,55x10 ⁶	2,38x10 ⁶	1,11x10 ⁶	1,33x10 ⁶	4,71x10 ⁶
	C2	8,05x10 ⁶	8,86x10 ⁶	4,45x10 ⁶	4,40x10 ⁶	2,30x10 ⁶	1,75x10 ⁶	4,66x10 ⁶
	C8	8,05x10 ⁶	5,11x10 ⁶	4,43x10 ⁶	5,86x10 ⁶	5,26x10 ⁶	3,35x10 ⁶	4,10x10 ⁶
W34/70	R	9,53x10 ⁶	6,56x10 ⁶	2,97x10 ⁶	6,51x10 ⁶	3,93x10 ⁶	1,42x10 ⁷	9,00x10 ⁶
	M	9,53x10 ⁶	3,63x10 ⁶	2,56x10 ⁶	3,18x10 ⁶	2,98x10 ⁶	3,40x10 ⁶	3,68x10 ⁶
	C2	9,53x10 ⁶	9,38x10 ⁶	9,83x10 ⁵	6,01x10 ⁶	5,46x10 ⁶	5,48x10 ⁶	5,48x10 ⁶
	C8	9,53x10 ⁶	5,37x10 ⁶	3,43x10 ⁶	3,95x10 ⁶	3,46x10 ⁶	3,15x10 ⁶	3,85x10 ⁶
S05	R	4,91x10 ⁶	3,65x10 ⁶	2,16x10 ⁶	4,21x10 ⁶	2,68x10 ⁶	1,98x10 ⁶	2,13x10 ⁶
	M	4,91x10 ⁶	2,61x10 ⁶	2,61x10 ⁶	1,05x10 ⁶	1,97x10 ⁶	1,33x10 ⁶	1,88x10 ⁶
	C2	4,91x10 ⁶	5,78x10 ⁶	1,85x10 ⁶	4,45x10 ⁶	4,23x10 ⁶	2,65x10 ⁶	1,86x10 ⁶

C8	4,91x10 ⁶	5,65x10 ⁶	2,61x10 ⁶	3,72x10 ⁶	2,81x10 ⁶	4,40x10 ⁶	3,38x10 ⁶
-----------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

R = refrigeração (8-10°C) **C2** = congelamento (-22°C) **C8** = ultracongelamento (-80°C) **M** = congelamento (-22°C) com meio de cultura e glicerol.

Observa-se que houve o mesmo efeito entre a contagem total das células das cepas submetidas ao tratamento de lavagem e das cepas sem o tratamento, o que sugere que a lavagem não interferiu no comportamento da levedura em relação à sua replicação, assim traz benefícios para a produção, como a economia de tempo e menor manuseio da bebida.

Nos estudos de Laverty (2013) a média da contagem inicial das células de *Saccharomyces cerevisiae* ficou em torno de 10⁷ cel/mL, valores próximos encontrados neste estudo no T0 para todas as cepas.

De acordo com Laverty e colaboradores (2013) normalmente, a taxa de reprodução de leveduras está correlacionada positivamente com o metabolismo da produção de polissacarídeos e bioetanol, e pode ser monitorada para maximizar a produção de bioetanol durante a fermentação. Portanto, a capacidade de quantificar porcentagens de brotamento de uma população de fermento pode ser utilizada para melhorar a produção de cerveja e bioetanol em um processo de fermentação padrão.

O gerenciamento da cultura de fermento no processo de fermentação é uma parte crítica do processo de fabricação de cerveja. É importante proteger a qualidade da levedura cultivada porque poderá ser utilizada como inóculo em fermentação subsequente de mosto e, portanto, terá efeito sobre a qualidade da cerveja resultante (STEWART, 2016).

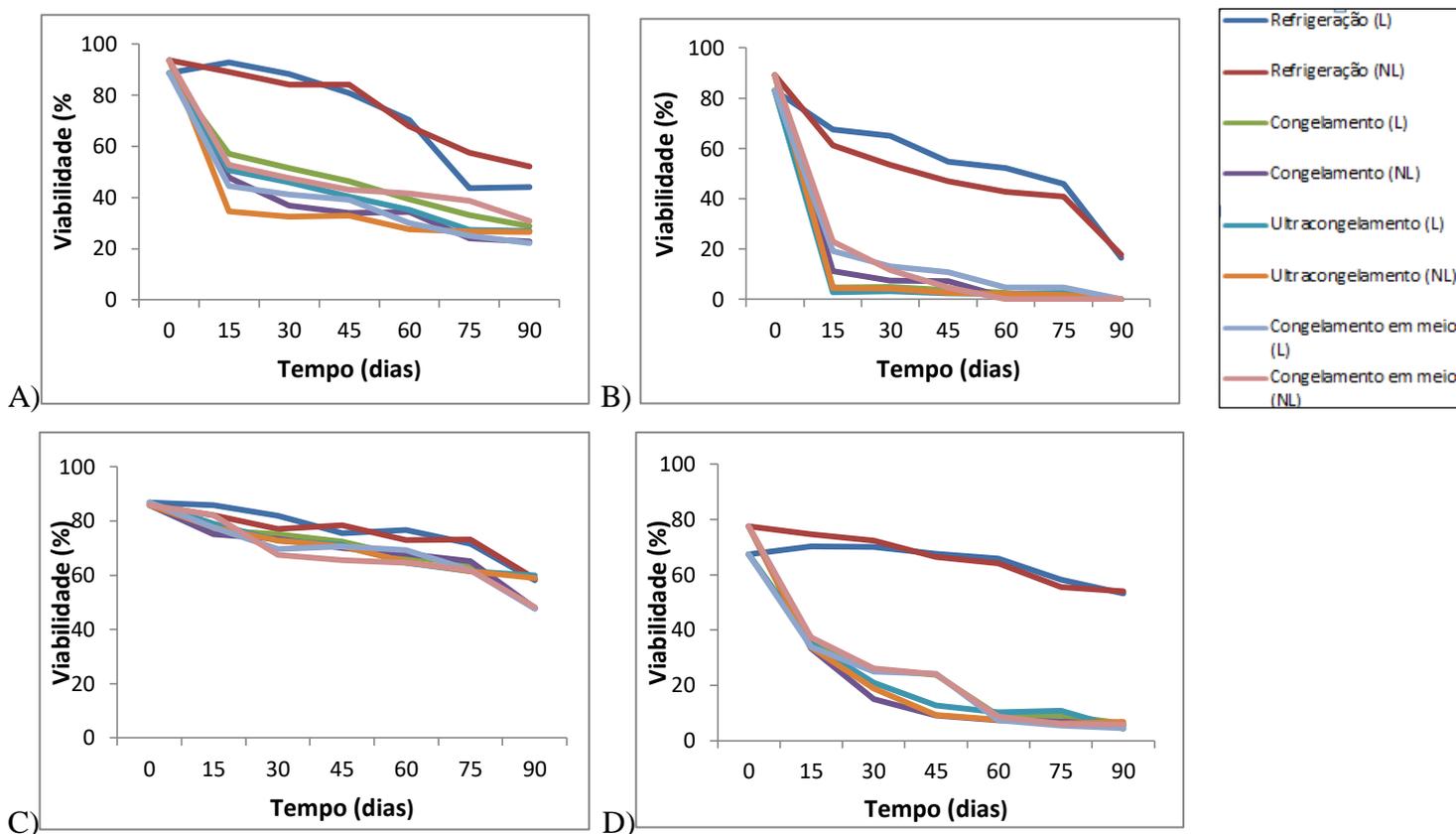
A viabilidade das leveduras no tempo zero variou de 63,7% até 93,74% para cepas sem tratamento e 59,7% até 94,26% para cepas com tratamento de lavagem. Foram obtidos resultados de viabilidade superiores a 70% das cepas M15, M54, S04, e T58 tanto com o tratamento de lavagem quanto sem (Figura 1).

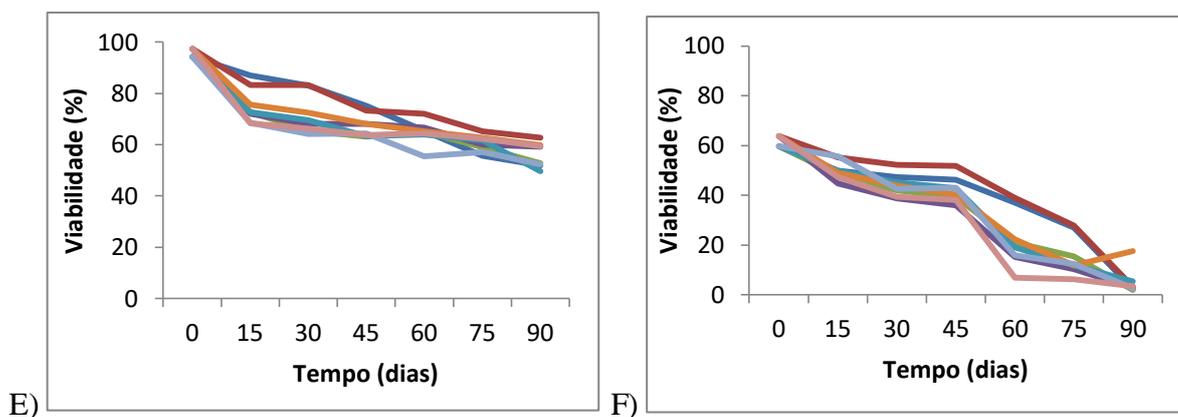
As cepas W34-70 e S05 não mostraram bons resultados de viabilidade. Alguns inferiores a 70%, o que sugere que não houve uma boa replicação destas cepas na produção da cerveja, devido a algum interferente como, por exemplo, temperatura, pH ou não adaptação ao mosto utilizado, pode-se também observar o mau desenvolvimento das cepas por meio da leitura do grau do °Brix (Tabela 1), no qual as cepas W34-70 e S05 tiveram valores mais altos, ou seja, as cepas utilizaram menos açúcar para fermentação. Nos estudos de Pires e colaboradores (2014) onde elaboraram cerveja em

processo contínuo de fermentação, a viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* ficou entre 91% a 98%.

O fermento *Saccharomyces cerevisiae* tem uma replicação limitada, isto é, cada célula dentro de uma população é capaz de apenas um número finito de divisões antes de senescência e morte. A replicação depende do número de brotamentos experimentados pelas células, e pode ser determinado por contar o número de cicatrizes de brotos na parede da célula mãe. Como consequência da senescência, as células de fermento estão sujeitas a alterações morfológicas, metabólicas e modificações genéticas (GINOVART et al., 2011).

Nos testes de viabilidade a cepa M15 mostrou resultados superiores para o armazenamento sob refrigeração tanto para o tratamento utilizando a lavagem quanto sem a lavagem (Figura 2A). Desde o T1, as formas de armazenamento em congelamento já apresentaram resultados inferiores. Para a cepa M15 sem tratamento de lavagem o congelamento utilizando meio de cultura obteve melhores resultados (52,7%), em comparação ao ultracongelamento (34,6%).





L= lavada NL=não lavada

Figura 1. Viabilidade de diferentes cepas de *Saccharomyces* SP. com e sem tratamento de lavagem em armazenamento sob refrigeração (8-10°C), congelamento (-22°C), ultracongelamento (-80°C), congelamento (-22°C) com meio de cultura e glicerol durante período de 90 dias. **A)** Cepa M15 **B)** Cepa M54 **C)** Cepa T58 **D)** Cepa W34-70 **E)** Cepa S04 **F)** Cepa S05

A cepa M54 também mostrou melhores resultados para o armazenamento em refrigeração tanto para com o tratamento como o sem lavagem (Figura 1B). Porém esta cepa não obteve boa adaptação ao congelamento alcançando valores de 20% de viabilidade e finalizando os 90 dias com viabilidade de 0%.

A cepa T58 teve uma tendência de queda de viabilidade celular menor que as outras cepas. Iniciou com boa viabilidade para todos os tipos de armazenamento, principalmente aquelas sob refrigeração (8-10°C) e com tratamento (Figura 1C). Já, para as cepas sem tratamento as armazenadas sob refrigeração quanto as congeladas em meio de cultura obtiveram inicialmente valores de viabilidade semelhantes nos primeiros 15 dias. No entanto com 30 dias, as células sob congelamento em meio de cultura (-22°C) apresentaram queda de 15% enquanto o armazenamento sob refrigeração (8-10°C) teve queda de 5%.

A cepa W34-70 mostrou valores de viabilidade superiores para o armazenamento em refrigeração (8-10°C), tanto para as cepas com tratamento (70,2%) quanto para aquelas sem tratamento (74,6%) (Figura 1D). Porém, para todas as formas de acondicionamento em congelamento, a cepa demonstrou uma baixa de viabilidade, em torno de 70% (T0) para 30% (T1), e no final do armazenamento apresentou valores de viabilidade inferiores a 10%.

Com a cepa S04 os melhores resultados foram observados quando armazenadas em refrigeração até os 60 dias iniciais, no entanto, para a cepa lavada houve decréscimo de 36% do T1 até T6, valor considerado alto quando comparado com os outros tipos de armazenamentos, que ficaram com redução de 17% até 23% (Figura 1E). Em geral, esta cepa se manteve com níveis elevados de viabilidade até o final do experimento, com valores próximos a 60% para todos os tipos de armazenamento.

A cepa S05 apresentou baixa viabilidade, desde o início do experimento, com tendência de queda maior que as outras cepas. No 45º dia do experimento ocorreu uma queda brusca principalmente para as cepas armazenadas sob congelamento (-22°C) com e sem meio de cultura e no ultracongelamento (-80°C), isso tanto para as cepas que tiveram tratamento como para aquelas que não o obtiveram (Figura 1F). No final dos 90 dias do experimento todas as cepas em todos os armazenamentos estavam com valor de viabilidade inferior a 10%. A redução da viabilidade pode estar associada a fatores, como falta de nutrientes, temperatura e tipo de armazenamento visto que estes podem estar relacionados com condições de crescimento celular, e influenciarem a sobrevivência das leveduras (POLO et al. 2017).

Embora o congelamento não tenha nenhum efeito letal para as células, ele pode induzir o estresse físico a uma parte das células das leveduras e assim, reduzir a proporção de células viáveis (PEHKONEN et al., 2008).

Se o congelamento é lento, a água intracelular pode fluir para o ambiente externo por osmose e criar cristais extracelulares, o que provoca remoção de água extracelular e uma concentração de soluto aumentada que, por sua vez, leva ao desequilíbrio osmótico. Por outro lado, se o congelamento for muito rápido, as células não perdem água com rapidez suficiente para manter o equilíbrio e os cristais de gelo intracelulares podem aparecer e podem causar danos ou mesmo efeitos letais (SEKI et al. 2009). Por estas razões, nem todos os microrganismos podem ser preservados com êxito por este método (POLO et al., 2017).

Úbeda e colaboradores (2013) armazenaram sob refrigeração a biomassa coletada da fermentação de vinho e observaram a viabilidade celular em 0, 15 e 30 dias. Após 15 dias de armazenamento, as contagens foram ligeiramente mais baixas ou semelhantes àqueles registrados antes do armazenamento.

Polo e colaboradores (2017) verificaram a sobrevivência de *Saccharomyces* sob congelamento (-20°C; -80°C; -126°C) e notaram que a levedura teve melhor viabilidade quando armazenada a -20°C em comparação ao armazenamento a -126°C. Isso ocorre

porque a taxa de arrefecimento é muito rápida para permitir que a água interna migre para fora da célula, e a água congelada dentro da célula resulta em dano letal. Este fato diferencial pode estar atrelado também à relação superfície / volume, que determina o fluxo térmico e da água durante o congelamento. As células de levedura são maiores que as bactérias. Assim, a cristalização intracelular ocorrerá mais facilmente, o que resulta em menores taxas de viabilidade a esta temperatura.

O glicerol também é conhecido como crioprotetor, é amplamente utilizado para a preservação de microrganismos, sob congelamento, em laboratório. A atividade decrescente da enzima glicerol desidrogenase (GCV1) dependente de NADP⁺, em células de levedura, provoca um aumento nos níveis de glicerol intracelular e aumento da tolerância ao congelamento. Assim, células de levedura enriquecidas com glicerol adquirem mais tolerância ao congelamento (SHI et al., 2014). No entanto, neste estudo as células de leveduras armazenadas em temperaturas de congelamento utilizando glicerol e meio de cultura tiveram respostas semelhantes às aquelas em congelamento (-22°C e -80°C). Somente para a cepa T58 no tratamento não lavado observou-se melhores resultados com valor de 82,1% no T1.

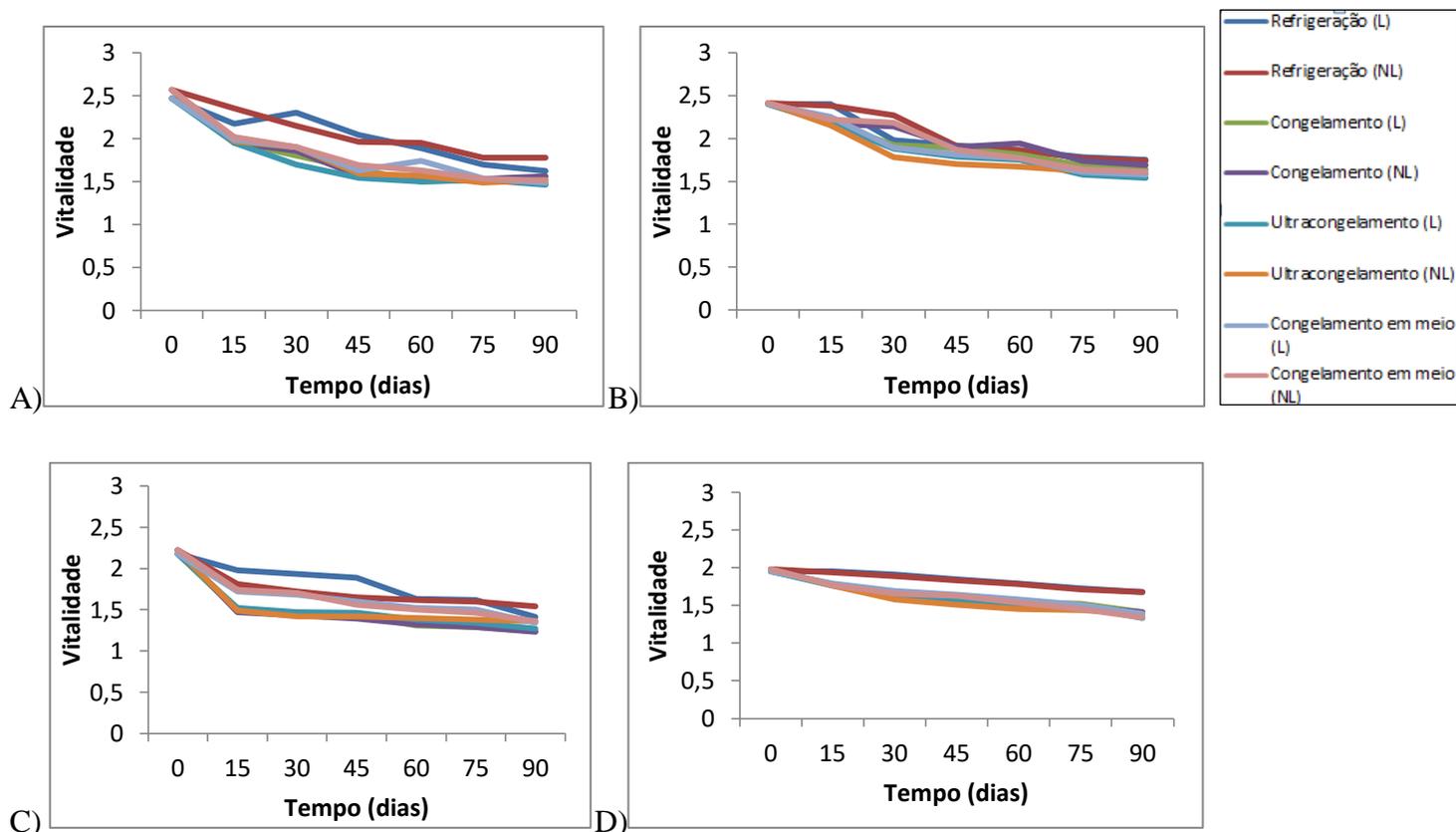
O estado fisiológico da biomassa de levedura influencia o desempenho da fermentação e, portanto, a qualidade do produto resultante. Fermentações consistentes exigem um método para medir a condição fisiológica do fermento durante o crescimento da levedura, isto é, a sua vitalidade. A alta vitalidade resulta em uma fermentação rápida com o mínimo de subprodutos indesejados, enquanto que a baixa vitalidade resulta em fermentação lenta ou mal atenuante (WEIBERT, 2009).

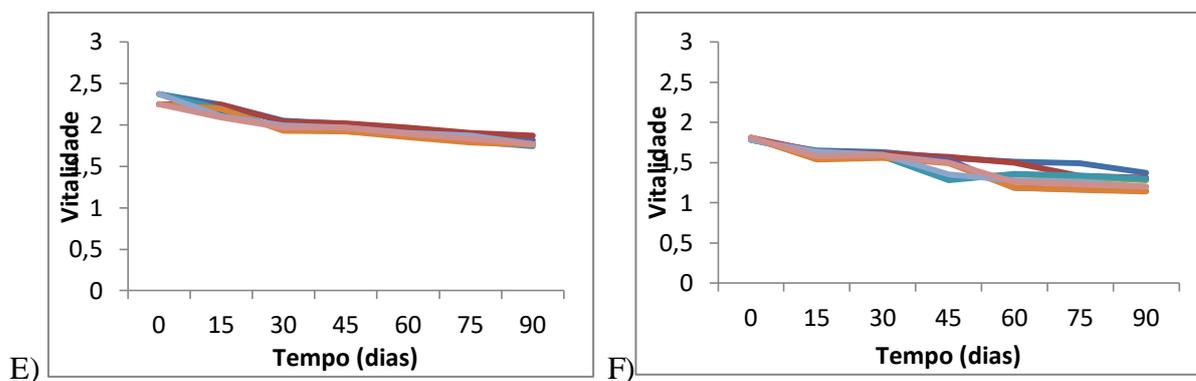
A vitalidade das células no tempo zero ficou na faixa de 1,81 até 2,57 para as cepas não lavadas, já para cepas com tratamento foi de 1,78 até 2,47. As cepas M15, M54, S04 e T58 tiveram melhores valores de vitalidade tanto com tratamento quanto sem. As cepas S05 e W34-70 mostraram resultados inferiores de vitalidade ficando em uma faixa abaixo de dois, esses valores podem estar relacionados com o valor do °Brix mais elevado ao final da fermentação como também com a baixa viabilidade no tempo zero.

Após o armazenamento, percebeu-se que a vitalidade também teve uma tendência de queda, no entanto, menor que a viabilidade. De uma forma geral, pode-se observar que para algumas cepas armazenadas em temperatura de refrigeração obtiveram melhores respostas também para a vitalidade.

A cepa M15 apresentou redução da vitalidade em todo período de análise para todas as formas de armazenamento ficando em torno de 20 a 25%. No entanto, a faixa inicial para as células refrigeradas ficou em 2,17 para as que sofreram lavagem e 2,35 para as que não foram lavadas nos primeiros quinze dias, enquanto que as leveduras que foram armazenadas sob congelamento apresentaram os valores de vitalidade na faixa de 1,95 (Figura 2A). Por isso, esta cepa apresentou melhor vitalidade para as células armazenadas refrigeradas, ou seja, teve função metabólica melhor.

T58 apresentou ótimos valores de vitalidade o que corrobora com os valores de viabilidade apresentados por esta cepa, provavelmente por ter se adaptado ao mosto e se desenvolvido bem na fermentação. Houve redução de 25% de vitalidade para as cepas refrigeradas, enquanto as cepas em ultracongelamento e congelamento em meio tiveram redução de 30%. Para as células que tiveram o tratamento de lavagem houve uma queda da vitalidade a partir do 30º dia de armazenagem já para as células que não tiveram tratamento observaram-se resultados menores para o ultracongelamento a partir do 30º dia (Figura 2B).





L=lavada NL= não lavada

Figura 2. Vitalidade de diferentes cepas de *Saccharomyces* sp com e sem tratamento de lavagem em armazenamento sob refrigeração (8-10°C), congelamento (-22°C), ultracongelamento (-80°C), congelamento (-22°C) com meio de cultura e glicerol durante período de 90 dias . **A)** Cepa M15. **B)** Cepa T58 **C)** Cepa M54 **D)** Cepa W34-70 **E)** Cepa S04 **F)** Cepa S05

A cepa M54 apresentou os melhores valores de vitalidade para as células armazenadas em refrigeração (Figura 2C). A cepa lavada em refrigeração teve uma queda brusca do 45º dia para 60º dia, tendo decaimento no final da análise de 28%, enquanto a cepa refrigerada não lavada teve queda de apenas 15%. Para as cepas congeladas houve decaimento em média de 18 até 22%. A cepa W34-70 mostrou melhores resultados para as células armazenadas sob refrigeração (Figura 2D). Houve decaimento de apenas 13% de vitalidade do T1 até T6 para as cepas em refrigeração, para as cepas em congelamento (-22°C) houve redução de 20%, todavia para ultracongelamento (-80°C) e congelamento em meio (-22°C) em média 24%.

A cepa S04 mostrou valores bem próximos para todos os tipos de armazenamento, tanto para cepas com tratamento como para as sem tratamento (Figura 2E). Do T1 até o T6 houve redução de vitalidade entre 15% até 19%.

A cepa S05 apresentou respostas iniciais para vitalidade semelhantes para todos os tipos de armazenamentos (Figura 2F). Em todo o período de análise de vitalidade houve redução de 17% e 20% para cepas lavadas e não lavadas em refrigeração, respectivamente. Para as cepas em congelamento a redução de vitalidade ficou em torno de 24%.

Nos estudos de Úbeda (2013), no qual armazenou em refrigeração a biomassa da fermentação de vinho por 30 dias, foi observada que a vitalidade após 15 dias de

armazenamento foi semelhante aos valores iniciais de pré-armazenamento, enquanto após 30 dias ocorreu um declínio de menos de 30%. Em contrapartida, algumas amostras caíram bruscamente (mais de 70%) durante os primeiros 15 dias.

Redón (2012) afirma que membranas de levedura são compostas por uma bicamada de fosfolípidos principalmente a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilserina (PS). Em situações de estresse, como exemplo, mudança de temperatura, as leveduras precisam se adaptar a estas mudanças, pois caso não ocorra à adaptação pode haver alteração da composição das membranas. É uma característica comum de *Saccharomyces cerevisiae* que tinham baixa vitalidade era uma menor concentração de fosfatidilcolina e / ou fosfatidiletanolamina nas membranas.

Fatores tais como controle de temperatura de armazenamento, taxa de inoculação no mosto e mutações deletérias que surgem espontaneamente na população de leveduras também irão interferir na vitalidade das leveduras (SUHRE, 2014).

Por meio do software Beersmith™ pode-se calcular a quantidade de biomassa de levedura necessária para fabricar novas cervejas utilizando o valor de viabilidade.

Tabela 4. Volume de resíduo de fermentação armazenado em refrigeração que será necessário para produzir 10 litros de cerveja de acordo com o cálculo disponível utilizando o software Beersmith™

CEPA	30 DIAS (mL)	90 DIAS (mL)
M15LR	49,4	98,7
S04NLR	52,4	69,5
S05NLR	83,3	1393,4
T58NLR	53,3	74,2
W34-70NLR	60,2	80,6
M54LR	67,1	264,2

NLR= não lavada em refrigeração LR= lavada em refrigeração

Para tanto, foi escolhida a forma de armazenamento de cada cepa, de acordo com melhor valor de viabilidade após 30 dias de estocagem. Assim, o armazenamento escolhido foi a refrigeração (8-10°C) para todas as cepas. Nos primeiros 30 dias a quantidade variou de 49,4 mL para a cepa M15L e de 83,3 mL para a cepa S05NL de resíduo de biomassa de levedura para a produção de 10 L de cerveja conforme pode-se

observar na Tabela 4. Após 90 dias de acondicionamento os valores variaram de 69,5 mL para a cepa S04NL e de 1393,4 mL para a cepa S05NL, a mesma que necessitava de uma quantidade maior nos 30 dias iniciais de armazenamento, o que não é uma quantidade considerada ideal para utilização na fabricação porque além de conter um maior número de células inviáveis e de substâncias liberadas pela lise celular, o que podem levar a sabores e aromas indesejáveis na produção da nova cerveja.

4. CONCLUSÃO

As células mantidas sob refrigeração (8-10°C) obtiveram melhor resposta tanto para viabilidade quanto para vitalidade durante o período de armazenamento, que é considerado um ponto positivo, visto que a refrigeração, comparada a outros métodos de armazenamento, é um método simples, de fácil acessibilidade e de menor custo. As cepas T58 e S04 tiveram menor tendência de queda de viabilidade e vitalidade durante período de análise, com melhor adaptação ao armazenamento, principalmente a refrigeração. Não houve diferença entre as cepas que tiveram tratamento de lavagem e as que não tiveram. No entanto, observa-se que é necessário fazer o controle de todo processo de fermentação para que as *Saccharomyces* se repliquem de forma que posteriormente o resíduo tenha valores de viabilidade e vitalidade satisfatórios para seu reaproveitamento.

5. REFERÊNCIAS

ALMONACID, S.F.; SÁJERA, A.L.; YOUNG, M.E.; SIMPSON, R.J.; ACEVEDO, C.A.; A comparative study of stout beer batch fermentation using free and microencapsulated yeasts, **Food Bioprocess Technol**, v. 5, p. 750–758, 2012.

BRASIL. Decreto n. 6.781, 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. Boletim IOB, n. 38, p. 11-30, 2009.

BORTOLI, D. A. S. et al. Leveduras e produção de cervejas-Revisão. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 3, n. 1, p. 45-58, 2013.

BOTTARI, B.; CAMPARI, G.; GATTI, M. Live/dead yeast viability staining as a tool for improving artisanal pilsner beer production, **J Microbiol Biotech Food Sci**, v. 4, e. 2, p. 174-178, 2014.

- BOUCHEZ, J.C; CORNU,M; DANZART,M; LEVEAU,J.Y; DUCHIRON,F; BOUIX,M; Physiological significance of the cytometric distribution of fluorescent yeasts after viability staining, **Biotechnology and bioengineering**, v. 86, n. 5, 2004.
- CALLEMIEN, D; COLLIN, S. Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer - a review. **Food Rev. Int.** v.26, p.1–84, 2010.
- CASTRITIUS, S; GEIER, M.;JOCHIMS,G.; STAHL, U.;HARMS, D; Rapid Determination of the Attenuation Limit of Beer Using Middle- Infrared (MIR) Spectroscopy and a Multivariate Model, **J. Agric. Food Chem** , p. 6341–6348, v. 60, 2012.
- GRASSI, S; AMIGO, J. M; LYNDGAARD, C. B; FOSCHINO, R; CASIRAGHI, E; Beer fermentation: Monitoring of process parameters by FT-NIR and multivariate data analysis **Food Chemistry**, v.155, p.279-286, 2014.
- GIBSON B; LITI G; *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. **Yeast**, v.32, p.17–27, 2015.
- GINOVRT, M.; PRATS, C; • PORTELL, X; SILBERT, M; Analysis of the effect of inoculum characteristics on the first stages of a growing yeast population in beer fermentations by means of an individual-based model, **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.38, p.153–165, 2011.
- KARA, B.B. V; SIMPSON, W.J; HAMMOND, J.R. M; Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test, **Journal of the Institute of Brewing**, v. 94, p. 153-158, 1998.
- KUCHARCZYK K; TUSZYŃSKI T.; The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavour compounds of beer produced on an industrial scale, **Journal of the Institute of Brewing** , v.121, e.3, 349-355, 2015.
- LAVERTY, D.J; KURY, A.L; KUKSIN, D; PIRANI, A;FLANAGAN, K; CHAN, L.L.Y; Automated quantification of budding *Saccharomyces cerevisiae* using a novel image cytometry method,**J Ind Microbiol Biotechnol** v.40, p.581–588, 2013
- LODOLO, E.J., KOCK, J.L.F., AXCELL, B.C., BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*- the main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.1018-1036, 2008.
- LANDRY, C.R., TOWNSEND, J.P., HARTL, D.L., CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*.**Mol. Ecol.** v.15, p.575–591, 2006.
- MARTIN, V; QUAIN D.E, SMART K.A; **Brewing Yeast Oxidative Stress Responses: Impact of Brewery Handling**; *Brewing Yeast Fermentation Performance*: Second edition, 2003.

NERO, L. C.; TARVER, M. G.; HEDRICK, L. R.; Growth of *acanthamoeba castellani* with the yeast *torulopsis famata*, **The Journal of Bacteriology**, v. 87, e.1, 1964.

NIKULIN, J; KROGERUS, K; GIBSON, B; Alternative *Saccharomyces* interspecies hybrid combinations and their potential for low-temperature wort fermentation **Yeast**, v.35, e. 1, p.113-127, 2018.

PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.CA. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.24-31, 2000.

PEHKONEN, K.S., ROOS, Y.H., MIAO, S., ROSS, R.P. AND STANTON, C. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1732–1743, 2008

PIAZZON, A.; FORTE, M; NARDINI, M; Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types. **J. Agric. Food Chem.**, v.58,p. 10677–10683,2010.

PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; BRANYICK, T.; VICENTE, A.A. Yeast: The soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, e 5, 1937–1949, 2014.

PIRES, E.J; TEIXEIRA, J.A; BRANYIK, T; REAL, M.C; VICENTE, A.A; Maintaining yeast viability in continuous primary beer fermentation, **Journal of the Institute of Brewing**; v.120, p. 52–59, 2014.

POLO, L; MANES-LAZARO, R; OLMEDA, I; CRUZ-PIO, L.E; MEDINA, A; FERRER, S; PARDO, I; Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine, **Journal of Applied Microbiology**, v.122, p.1603-1614, 2017.

REDÓN, M; BORRULL, A; LÓPEZ,M; SALVADÓ, Z; CORDERO, R; MAS, A; GUILLAMÓN, J.M; ROZÈS, N; Effect of low temperature upon vitality of *Saccharomyces cerevisiae* phospholipid mutants, **Yeast**, v.29, p.443–452, 2012.

REVERON, I.M; BARREIRO, J.A.; SANDOVAL, A.J.; Thermal resistance of *Saccharomyces cerevisiae* in pilsen beer, **Journal of the Institute of Brewing** , v. 109, e. 2, p.120–122, 2003.

SAMI, M; IKEDA, M; YABUUCHI, S; Evaluation of the Alkaline Methylene Blue staining method for yeast activity determination, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.78, e. 3, p. 212-216, 1994.

SEKI, S., KLEINHANS, F.W. AND MAZUR, P. Intracellular ice formation in yeast cells vs. cooling rate: predictions from modeling vs. experimental observations by differential scanning calorimetry. **Cryobiology**, v.58, p.157–165, 2009.

SHI, X; MIAO, Y; CHEN, J.Y; CHEN, J; LI,W; HE, X; WANG,J; The Relationship of Freeze Tolerance with Intracellular Compounds in Baker's Yeasts, **Appl Biochem Biotechnol**, v.172, p. 3042–3053, 2014.

SEBRAE. **Microcervejarias**. Agronegócio - Resposta Técnica. 2017. Disponível em:<[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/\\$File/7503.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/$File/7503.pdf)> Acesso em: 27/11/2017

STEWART, G.G; Saccharomyces species in the Production of Beer, **Beverages**, v. 2, e. 34; 2016.

TITICA, M., LANDAUD, S., TRELEA, I., LATRILLE, E., CORRIEU, G., AND CHERUY, A. Modeling of the kinetics of higher alcohols and ester production on CO₂ emission with a view to control of beer flavor by temperature and top pressure. **J. Am. Soc. Brew. Chem**, v.58, p.167–174, 2000.

ÚBEDA, J; BARRAJÓN, N;BRIONES, A; Optimizing small-scale production of fresh wine yeast biomass, **Journal of Food Process Engineering**,v.36, p.686–693, 2013.

WEIGERT, C; STEFFLER,F; KURZ,T; SHELLHAMMER, T.H; METHNER, F.J; Application of a Short Intracellular pH Method to Flow Cytometry for Determining Saccharomyces cerevisiae Vitality, **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n.17, p. 5615–5620, 2009.

WHITE, L.R; RICHARDSON, K.E; SCHIEWE, A.J; WHITE, C.E; **Comparison of Yeast Viability/Vitality Methods and Their Relationship to Fermentation Performance**, Brewing Yeast Fermentation Performance, e. 2, 2003.

VERBELEN, P., DEKONINCK, T., SAERENS, S., MULDER, S., THEVELEIN, J., DELVAUX, F. Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 82, p. 155–167, 2009.