

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG**  
**CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**YAN HENRIQUE MARTINS ROSA**

**Estudo comparativo de viabilidade por contagem de células em diferentes meios de  
propagação da levedura**

**FORMIGA - MG**  
**2019**

YAN HENRIQUE MARTINS ROSA

Estudo comparativo de viabilidade por contagem de células em diferentes meios de propagação da levedura

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Engenharia Química do UNIFOR-MG, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.  
Orientadora: Christiane Pereira Rocha Sousa

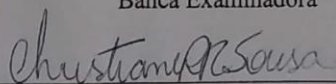
FORMIGA – MG  
2019

YAN HENRIQUE MARTINS ROSA

Estudo comparativo de viabilidade por contagem de células em diferentes meios de propagação da levedura

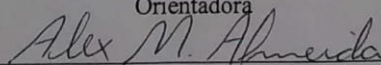
Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao  
Curso de Engenharia Química do  
UNIFOR-MG, como requisito parcial  
para obtenção do título de bacharel em  
Engenharia Química

Banca Examinadora



---

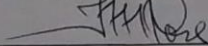
Prof<sup>Ms.</sup> Christiane Pereira Rocha Sousa  
Orientadora



---

Prof. Dr Alex Magalhães de Almeida

UNIFOR-MG



---

Prof<sup>a.</sup> Dra Ivani Pose Martins

UNIFOR-MG

Formiga, 5 de novembro de 2019.

## RESUMO

Sabe-se que a cerveja é uma bebida proveniente de um procedimento de fermentação, mediante a adição de levedura cervejeira, do mosto açucarado oriundo do malte de cevada, sujeito a um processo produtivo, adicionado de lúpulo.

A levedura comumente empregada para tal processo é conhecida como *Saccharomyces cerevisiae*, são organismos unicelulares com a capacidade de consumir os açúcares presente no mosto cervejeiro, convertendo-os em álcool, gás carbônico e outros compostos de sabores típicos da cerveja, sendo esta uma das espécies de levedura mais importantes e utilizadas industrialmente. É este o micro-organismo encarregado pelo processo biológico que dá origem a um produto afamado - a cerveja, este processo biológico é denominado fermentação alcoólica.

Diante da influência deste micro-organismo e sua importância no processo de produção de cerveja, o estudo comparativo de sua espécie de forma rápida e eficaz é a finalidade principal deste trabalho, além de adquirir conhecimento do procedimento no qual se insere de forma a se avaliar a integridade da levedura através da contagem do número de células viáveis, e seu tempo de fermentação.

Obtiveram-se resultados comparativos, usando em um processo de fermentação o fermento liofilizado, hidratado e reaproveitado, com valores de viabilidade em 82,56%, 90,98% e 87,26% respectivamente. Também analisou-se o tempo de fermentação, com 12,10 e 5 dias na devida ordem.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisa*. Processo cervejeiro. Levedura cervejeira. Viabilidade da levedura. Contagem de células de levedura.

## ABSTRACT

It is known that beer is a beverage coming from a fermentation process, by na addition of brewery yeast, the sugar made from barley malt, subject to a production process, added to lupulus.

The yeast commonly aplied for such process is known as *Saccharomyces cerevisae*, they are unicelular organismo with the ability to consume the sugars presente in the brewer wort, converting them in to alcohol, carbono dioxide and others typical beer flavor compounds, so this is one of the most importante and industrially used yeast species. This is the microorganism in charge of the biological process that gives rises to a famous product – the beer, this biological process is called as alcoholic fermentation.

Considering the influence of this microorganism and its importance in the beer production process, the comparative study of its species in a fast and effective way is the main purpose of this work, besides acquiring knowledge of the procedure in which it is inserted, in order to evaluate the integrity of the yeast by counting the number of viable cells and its fermentation time.

Comparative results were obtaind, using in a fermentation process the lyophilized, hydrated and reused yeast, with viability values of 82,56%, 90,98% and 87,26% respectively. The fermentation time were analyzed with 12, 10 and 5 days in the same order.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisae*. Brewing process. Brewer's yeast. Viability of yeast. Counting of yeast cells.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Malte ingrediente principal da cerveja.....	14
Figura 2 – Influência do malte na cerveja.....	15
Figura 3 – Flor de lúpulo, responsável pelo sabor e aroma da cerveja,.....	17
Figura 4 – Lúpulo na forma de pellets,.....	18
Figura 5 – Micro-organismos ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ), em escala microscópica..	19
Figura 6 – Fluxograma do Processo de Fabricação da Cerveja Artesanal.....	21
Figura 7 – Malte moído.....	22
Figura 8 – Movimento do <i>Whirpool</i> .....	24
Figura 9 – <i>Trub</i> depositado no fundo da tina após <i>whirlpool</i> .....	24
Figura 10 - Esquema da diluição seriada e plaqueamento.....	29
Figura 11 – Tanque fermentador onde foi colhida a amostra de levedura.....	31
Figura 12 - Equipamento de coleta e recipiente coletor.....	32
Figura 13A e 13B – Câmara de contagem de Neubauer/Observação ao microscópio da câmara de Neubauer.....	33
Figura 14 – Célula de levedura não viável corada com azul de metileno/Células de levedura viáveis.....	34
Figura 15 – Método de diluição seriada.....	35
Figura 16 – Mistura da amostra/corante na Câmara de Neubauer.....	36
Figura 17 – Microscópio Óptico.....	37
Figura 18 – Esquema simplificado da Câmara de Neubauer.....	38
Figura 19 – Gráfico comparativo de dias de fermentação/viabilidade.....	41

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais requisitos da água cervejeira de qualidade.....	13
Quadro 2 – Temperatura e pH de atuação das enzimas .....	23
Quadro 3 – Resultados das análises de viabilidade da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na geração 0 (levedura seca), considerando a média das 3 repetições.....	39
Quadro 4 – Resultados das análises de viabilidade da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na geração 1 (levedura reaproveitada), considerando a média das 3 repetições.....	40
Quadro 5 – Resultados das análises de viabilidade da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na geração 2 (levedura hidratada), considerando a média das 3 repetições.....	40

## SUMÁRIO

Resumo .....	4
Abstract .....	5
Lista de figuras .....	6
Lista de quadros .....	7
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
2.1 Objetivo Específico .....	10
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
3.1 Matéria Prima Cervejeira .....	12
3.1.1 Água .....	12
3.1.2 Malte de cevada .....	13
3.1.3 Adjuntos do malte .....	15
3.1.4 Lúpulo .....	16
3.1.5 Leveduras .....	18
3.2 Etapas do Processo .....	21
3.2.1 Moagem .....	21
3.2.2 Mosturação .....	22
3.2.3 Clarificação .....	23
3.2.4 Fervura .....	24
3.2.5 Fermentação .....	25
3.2.6 Maturação .....	26
3.2.7 Filtragem .....	27
3.2.8 Carbonatação .....	27
3.2.9 Envase .....	28
3.2.10 Cuidados com a levedura .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 Coleta das amostras .....	31
4.2 Método .....	32
4.2.1 Procedimento analítico .....	34
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida arcaica que acompanha a humanidade desde os primórdios. Diversos povos continuaram produzindo cerveja, cada um a sua maneira, conforme os ingredientes e a tecnologia da época. Com o passar dos anos, originou-se diversos estilos diferentes de cerveja, que nos acompanham até hoje. A cerveja artesanal é também chamada de cerveja especial, devido a sua produção ser melhor elaborada. São cervejas produzidas com foco na variedade de cores, aromas e gostos, utilizando técnicas e receitas tradicionais. (PARANHOS, 2017).

As matérias-primas necessárias para a obtenção de uma cerveja de boa qualidade é a água, que deve ser uma água cervejeira bem tratada, o malte, que é o grão de cevada após passar pelo processo de maturação, o lúpulo, que determina o sabor e aroma da cerveja, a levedura, que são os micro-organismos que transformam os açúcares presentes no mosto em álcool e CO<sub>2</sub>, por fim os adjuntos, que são itens incorporados à cerveja por diversos motivos, seja para barateá-la, pela cor, aroma ou sabor. (PALMER, 2006).

Em consoante com Mega (2011), existem diversas técnicas para processos bioquímicos, dos quais destacam-se o uso de micro-organismos para transformação de alimentos em outros derivados, fato este que já é de uso recorrente ao longo da história da humanidade.

Neste tópico de transformação de alimentos e insumos, o presente trabalho irá destacar a cerveja, que salienta em diversas civilizações e em inúmeras áreas gastronômicas.

O levedo é uma matéria-prima primordial para o fabrico da cerveja, por ser responsável pela transformação do mosto no processo de fermentação. Por ser um micro-organismo, ele necessita de cuidados especiais no seu manuseio dentro da cervejaria para garantir a sua qualidade. A propagação e a reutilização das células, por exemplo, são métodos utilizados por alguns cervejeiros para garantir o volume de células necessário para fermentar um determinado volume de mosto. O controle microbiológico desses micro-organismos se faz fundamental para garantir boa qualidade de uma fermentação, que é diretamente proporcional ao estado fisiológico das células (SIMPSON; HAMMOND, 1989).

Pode-se afirmar que as leveduras dão as 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 e outras, são selecionadas determinadas cepas de leveduras. Como a maioria desse material não é produzido no Brasil, o custo de aquisição acaba sendo elevado.

O tempo de fermentação é uma característica importante do processo industrial, pois limita o período necessário para a obtenção da cerveja. O aumento da temperatura de fermentação, da concentração de levedura e a agitação constituem-se nos fatores que podem reduzir o tempo de fermentação, sendo muito desejável para redução do tempo de processamento da cerveja em microcervejarias, desde que mantenha a qualidade do produto.

Com base no exposto, visando à redução de custos, a importância da viabilidade celular e o tempo fermentativo, este estudo objetivou verificar a quantidade de células viáveis, obtida pela avaliação do processo fermentativo, utilizando diferentes meios de propagação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal, fazer um estudo comparativo de viabilidade entre diferentes formas de uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção da cerveja artesanal do tipo Lager, levando em consideração a viabilidade dos micro-organismos, o tempo de fermentação e o custo benefício.

### 2.1 Objetivo Específico

Dessa forma, como objetivo específico utilizou-se para o experimento, a fermentação de uma cerveja tipo pilsen as seguintes formas da levedura:

- Levedura liofilizada
- Levedura reaproveitada
- Levedura hidratada

Também se torna um objetivo importante, a aquisição de conhecimento nessa área específica, através da aprendizagem do processo produtivo cervejeiro, no qual se insere e é parte fundamental o método analítico de contagem de células de levedura, possibilitando, obter uma fermentação eficiente e sem adversidades.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A forma como surgiu às primeiras bebidas alcoólicas ainda são duvidosas, mas supostamente foram produzidas através de cevada, tâmaras, uvas ou mel. A prática da produção da cerveja aparenta ter sido originada na região da Mesopotâmia, onde a cevada cresce em estado selvagem. No Egito, a cerveja era consumida em grande quantidade, onde era destaque em ritos religiosos, sendo partilhada ao povo (DRAGONE, G; SILVA, T, A, O; SILVA, J, B, A, 2016).

O procedimento cervejeiro era efetuado por padeiros, onde o grão de cevada era deixado de molho até sua germinação, em seguida, moído e moldado em forma de bolos, a partir daí, inseriam a levedura e eram ligeiramente assados e posteriormente desfeitos para que pudessem coloca-los para fermentar em jarras com água. Esta cerveja rudimentar, ainda produzida no Egito, tem-se o nome de Bouza (DRAGONE, G; SILVA, T, A, O; SILVA, J, B, A, 2016).

Graças aos egípcios, a cerveja se espalhou entre os povos orientais, chegando até a Europa, a partir de onde continuou se alastrando e ficou conhecida pelo resto do mundo (DRAGONE, G; SILVA, T, A, O; SILVA, J, B, A, 2016).

Sua produção vem desde os primórdios, desde então vem sofrendo aperfeiçoamento técnico em sua qualidade, aumento do consumo e fabricação. Com o avanço da arte cervejeira, na idade média o lúpulo foi introduzido como importante matéria prima, devido à função de atribuir amargor e preservação da cerveja. Com o intuito de manter certo padrão na matéria prima cervejeira, no ano de 1516 foi aprovado pelo Duque Guilherme IV da Bavária (Alemanha) a lei da pureza alemã *Reinheitsgebot*, que relaciona a elaboração da cerveja, que necessitaria ser produzido somente com cevada, lúpulo e água. (DRAGONE, G; SILVA, T, A, O; SILVA, J, B, A, 2016).

Durante a permanência da família real portuguesa em território brasileiro no século XIX, D. João VI trouxe o hábito do consumo de cerveja para o Brasil. Em 1888 foi fundada no Rio de Janeiro a “Manufatura de Cerveja Brahma Villifier e Cia” e em 1891 a “Companhia Antártica Paulista” na cidade de São Paulo (VENTURINI, 2010).

Começava aí uma nova tendência em bebida e um novo hábito da sociedade, que sobreviveu até contemporaneidade. A aceitação dos produtos brasileiros comercializados foi rápida e o crescimento das empresas quase que imediato. Diante disso, as empresas começam a investir em estudos e tecnologias, a fim de melhorar a qualidade de seu produto. Deste modo, faz-se necessário o entendimento desse fabrico a partir da matéria prima utilizada.

### **3.1 Matéria Prima Cervejeira**

Entende-se exclusivamente por cerveja a bebida resultante da fermentação, mediante a adição de levedura cervejeira, do mosto açucarado proveniente do mate de cevada ou do extrato de malte, sujeito a um processo produtivo, adicionado de lúpulo. Pode-se substituir uma parte da cevada maltada por adjuntos cervejeiros. Além disso, poderá ser adicionada a cerveja, corantes, saborizantes e aromatizantes (MAPA, IN. 54, 2001).

#### **3.1.1 Água**

De acordo com Dragone, Silva e Silva (2016), a água no processo cervejeiro é considerada a principal matéria prima a ser utilizada, devido a cerveja conter cerca de 92 a 95% de água em sua composição, além de influenciar diretamente nos processos químicos e enzimáticos na etapa de fermentação. Desta maneira, as quantidades de sais dissolvidos e compostos orgânicos presentes na água estão diretamente ligadas à qualidade do produto.

Na visão de Breda (2016), a qualidade da água é fundamental, no entanto, atualmente é possível criar-se características e parâmetros ideais para a água que deseja-se obter para a produção da cerveja. Grandes indústrias usam este método para corrigir e alcançar o padrão necessário para suas receitas, adicionando compostos essenciais que não estejam presentes na água, de forma que a bebida produzida não seja prejudicada.

Além disso, em conformidade de Breda (2016), na produção artesanal é considerável a preocupação com o pH, presença de cloro, sólidos totais e quantidade de sais presentes na água utilizada. Na filtração utilizando filtros de partículas e de carvão ativado é possível eliminar sólidos em suspensão e grande parte do cloro. A parte que não ficar retida na filtração será retirada no processo cervejeiro, pois o cloro se torna volátil acima dos 45 °C, e durante este processo passa por temperaturas superiores a essa por tempo considerável. Em seguida resta a correção do pH, com adição de ácidos ou sais de acordo com as necessidades da água a ser utilizada. Observam-se pela Quadro 1 alguns requisitos necessários e parâmetros típicos de água cervejeira de qualidade.

Quadro 1 - Principais requisitos da água cervejeira de qualidade.

	Unidade de medida	Intervalo		Objetivo
		Mínimo	Máximo	
pH	-	5	9,5	-
Ca	mg/L	70	90	80
Mg	mg/L	0	10	-
Na	mg/L	0	20	-
HCO <sub>3</sub>	ppm CaCO <sub>3</sub>	10	50	25
Cl	mg/L	30	80	50
SO <sub>4</sub>	mg/L	30	150	100
NO <sub>3</sub>	mg/L	0	25	-
SiO <sub>2</sub>	mg/L	0	25	-
Alcalinidade residual	ppm CaCO <sub>3</sub>	-	20	-
Trihalometanos	µg/L	0	10	-
Fe	mg/L	0	0,1	-
Mn	mg/L	0	0,05	-
NH <sub>4</sub>	mg/L	0	0,5	-
NO <sub>2</sub>	mg/L	0	0,1	-
BrO <sub>3</sub>	mg/L	0	0,01	-
H <sub>2</sub> S	mg/L	0	5	-
Turbidez	NTU	0	0,5	-

Fonte: Bamforth (2006).

O tratamento da água por diversos processos químicos pode ser efetuado caso a qualidade da água não apresente as características desejadas para a fabricação da cerveja (VENTURINI, 2010).

### 3.1.2 Malte de cevada

Segundo Gauto e Rosa (2011), o malte é proveniente do grão de cevada que é submetido a um processo controlado de germinação, para que o grão possa desenvolver enzimas e alterar o tamanho da cadeia carbônica do amido, tornando-o mais macio e solúvel. O malteamento é um processo no qual se obtém a degradação do endosperma dos grãos de cevada, além do acúmulo de enzimas presente neles (BRIGIDO e NETTO, 2006).

O malte utilizado nas cervejarias (FIG. 1) é adquirido através da cevada, cereal de cultivo arcaico, utilizado em culturas neolíticas no Egito entre 6000 e 5000 anos antes de Cristo. Esse tipo de grão pertence ao gênero *Hordeum*, no qual são alinhados em duas ou seis fileiras na espiga, são cobertos por camadas de celulósicas, cujo primeira camada denomina-se palha e a outra camada aderida ao grão caracteriza-se de casca (DRAGONE, G; SILVA, T, A, O; SILVA, J, B, A, 2016).

Figura 1 - Malte ingrediente principal da cerveja



Fonte: CERVEJA PETRA, 2017.

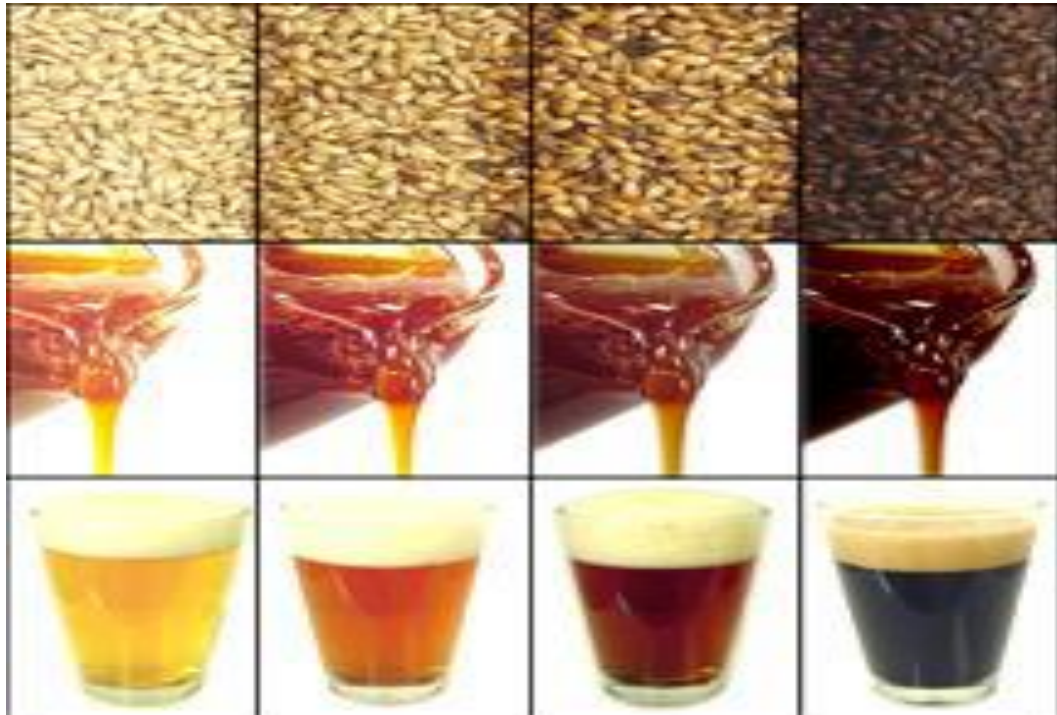
No processo de maltagem, as sementes da cevada germinam até formarem as enzimas hidrolíticas necessárias para a quebra dos polissacarídeos. Nesse ponto, a germinação é interrompida por aquecimento controlado. O produto é o malte, o qual contém enzimas que catalisam a hidrólise das ligações  $\beta$  da celulose e de outros polissacarídeos da parede celular da casca da cevada e enzimas como a  $\alpha$ -amilase e a maltase (NELSON, D, L e COX. M, M, 2019).

Ainda de acordo com Gauto e Rosa (2011), o processo de malteação da cevada origina-se após a colheita dos grãos, onde ficarão armazenados dentro de tanques ou silos submetidos à temperatura e umidade controlada, com o intuito de desenvolver uma nova planta, pois nessa fase tem a formação de enzimas essenciais para a produção de cerveja, momento em que o amido torna-se mais quebradiço, formando cadeias menores, consequentemente ficando macio e solúvel. Nesse momento há interrupção da etapa anterior para um processo de secagem, onde reduz-se a taxa de umidade de forma que não danifique as enzimas já formadas.

A maltagem do grão pode acontecer de diversas maneiras para se obter variados tipos de maltes com cores e sabores mais acentuados, no intuito de melhorar parâmetros como coloração e flavor da cerveja. Uma dessas formas é torrar sucessivamente maltes convencionalmente secos, com o objetivo de criar uma gama de cores entre 110 a 1500 unidades de cor EBC (European Brewery Convention), como mostra na (FIG. 2) Outro exemplo, quando o malte é aquecido lentamente e retido por mais tempo na fase úmida da

torrefação, o grão é estufado, estabelecendo flavors mais adocicados e consequentemente cores entre 2 e 400 EBC (DRAGONE, G; SILVA, T, A, O; SILVA, J, B, A, 2016).

Figura 2 - Influência do malte na cerveja.



Fonte: CARVALHO, 2007.

Existem inúmeras variações de torra, as quais proporcionarão ao malte características específicas que influenciarão na cor, sabor e os potenciais de sacarificação e fermentabilidade, além das características proteicas que contribuirão na formação do corpo de médio peso molecular, que influenciará na formação da espuma (BREDA, 2016).

### 3.1.3 Adjuntos do malte

Em conformidade com o Decreto n° 6.871 (MAPA, 2009), consideram-se adjuntos cervejeiros a cevada cervejeira e os demais cereais aptos para o consumo humano, malteados ou não-malteados, bem como os amidos e açúcares de origem vegetal. Vale lembrar, de acordo com a mesma legislação, parte do malte de cevada poderá ser substituído por adjuntos cervejeiros, cujo emprego não poderá ser superior a quarenta e cinco por cento em relação ao extrato primitivo.

De acordo com Dragone, Silva e Silva (2016), os adjuntos podem ser determinados como carboidratos não maltados de composição adequada, com propriedades que enriquecem ou auxiliam o malte de cevada, ou ainda como usualmente são consideradas, fontes não



maltadas de açúcares fermentescíveis. Cereais não maltados mais comuns são a cevada, o milho, o arroz e o trigo, mas também utilizam-se o sorgo, a aveia e o triticale, os quais são adicionados na etapa de preparação do mosto cervejeiro, utilizando-se das enzimas contidas no próprio malte para hidrolisar o amido existente em açúcares fermentescíveis, presentes no grãos não maltado.

Segundo Reitenbach (2010), o uso de adjuntos cervejeiros resulta em produtos com alta estabilidade física, melhor resistência ao resfriamento e maior brilho. A estabilidade física é devido ao fato dos adjuntos comumente usados não contribuírem com material proteico, somente com carboidratos, o que é vantajoso para estabilidade coloidal, além de terem pouca contribuição em compostos fenólicos, com exceção da cevada. Os adjuntos que são empregados auxiliam a produção de uma cerveja mais leve e suave, inclusive reduzir custos econômicos, uma vez que a produção de cevada nacional não supre a demanda do mercado (EMBRAPA, 2009).

#### **3.1.4 Lúpulo**

Atualmente, um dos principais componentes para a produção da cerveja é o lúpulo, planta trepadeira cultivada em climas frios do hemisfério norte como Inglaterra, Alemanha, República Checa e Estados Unidos, por nome científico de *Humulus lupulus*. São flores de gêneros masculino e feminino, porém para interesse cervejeiro usam-se apenas plantas fêmeas (FIG. 3). Nessas flores existem glândulas de lupulina, nas quais encontram-se os produtos de interesse, as resinas ( $\alpha$ -ácidos) e os óleos essenciais, que proporcionam a bebida o amargor e o aroma característico respectivamente. Além disso, o lúpulo possui a função antisséptica, pois os iso- $\alpha$ -ácidos são bacteriostáticos e auxiliam para o equilíbrio do sabor e espuma da cerveja (SANTOS, J. I, 2013; MEGA, J. F; NEVES, E; ANDRADADE, C. J, 2011; MATOS, 2011).

Figura 3 - Flor de lúpulo, responsável pelo sabor e aroma da cerveja.



Fonte: ALEDEIROS, 2015.

Os componentes químicos do lúpulo são: água (8-14%); proteínas (12-24%); resinas totais (12-21%); ácidos alfa (3-15%); ácidos beta (3-6%); taninos (2-6%); celulose (10-17%); cinzas (7-10%); óleos essenciais (0,5-2%) (CARVALHO, 2007).

As formas que se comercializam os lúpulos são em flores prensadas, pó, extrato e principalmente na forma de “pellets” (FIG. 4).

Figura 4 - Lúpulo na forma de pellets.



Fonte: STEIN, 2015.

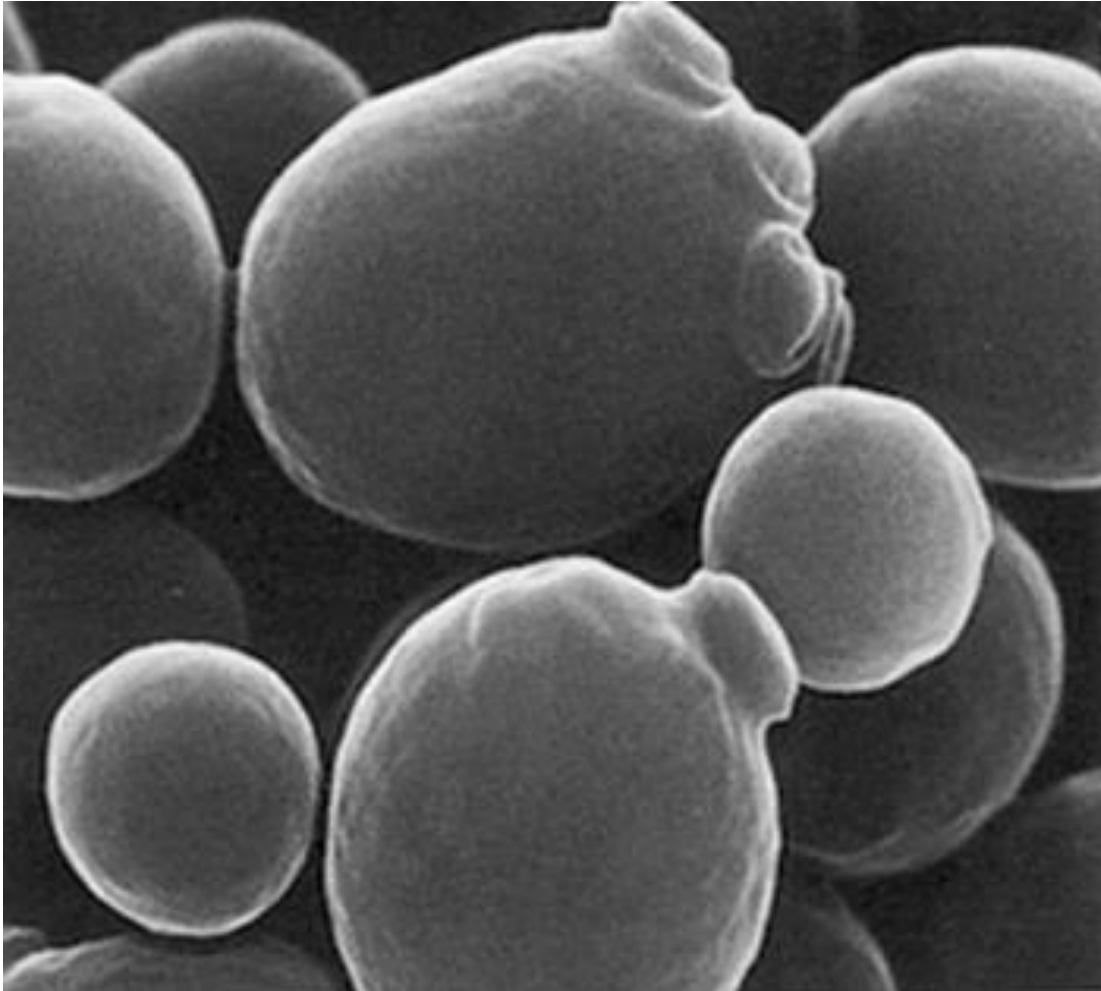
Dependendo do tipo de cerveja, tipo de lúpulo e concentração das substâncias aromáticas e de amargor, é utilizado ente 1 a 5 gramas de lúpulo por litro na forma de “pellets”. Já os extratos, são usados em concentrações menores, pois são mais concentrados (SACHS, L. G, 2001).

### 3.1.5 Leveduras

Segundo Palmer (2006), leveduras são micro-organismos eucarióticos pertencentes ao Reino Fungi (FIG. 5), e são em sua grande maioria unicelulares. Possui a habilidade de metabolizar de forma eficiente os constituintes do mosto, rico em açúcares fermentáveis. As espécies mais utilizadas em cervejarias são duas do gênero *Saccharomyces*. As *Saccharomyces cerevisiae* são de alta fermentação, típicas das Ales, fermentadas entre 18 e 22 °C, e as *Saccharomyces uvarum* de baixa fermentação, típicas das Lagers fermentadas em temperaturas mais baixas (entre 6 e 15°C). É importante que a cultura da levedura seja a mais

pura possível, sem micro-organismos contaminantes como bactérias e leveduras selvagens, porque são fundamentais na formação dos aromas na cerveja.

Figura 5-Micro-organismos (*Saccharomyces cerevisiae*), em escala microscópica.



Fonte: HARPIA CERVEJARIA, 2011.

Apesar dos antigos cervejeiros não entenderem a importância das leveduras no processo da cerveja, sabiam que usando alguns resíduos de uma bebida fermentada, tornaria mais consistente a fermentação. Em 1857, ao contrário do que todos pensavam, Louis Pasteur declarou que a fermentação alcoólica era provocada pela levedura, não por um catalisador químico. Tornando assim, as leveduras preciosas na fabricação de cerveja (FARIA, 2015).

Para realizar o processo de fermentação microbiológica dos açúcares no mosto cervejeiro utiliza-se o fermento, que são organismos anaeróbios facultativos, isto é, produzem energia a partir de compostos de carbono (carboidratos), tanto em condições aeróbias como em condições anaeróbias. Nas condições anaeróbias, especificamente, as células da levedura incorporam açúcares simples, como glicose e maltose, e produzem dióxido de carbono e

álcool como produtos residuais (além de ésteres, álcoois superiores, cetonas, vários fenóis e ácidos graxos) (CARVALHO, 2007).

O sabor do produto obtido difere de uma cepa para outra, em função de pequenas diferenças de metabolismo e consequente formação de substâncias capazes de conferir aroma e sabor ao produto, mesmo estando presentes em quantidades muito pequenas (ENQ – UFSC).

Ésteres, álcoois superiores, cetonas, vários fenóis e ácidos graxos são as substâncias produzidas pelas leveduras, além do álcool e CO<sub>2</sub>, que mais tem influência nos sabores e aromas. Ésteres são os componentes responsáveis pelas notas frutadas na cerveja, enquanto que os fenóis dão notas de especiarias, e em combinação com cloro, notas medicinais. O diacetil é um componente cetônico que pode ser benéfico em quantidades pequenas, mas que é muito instável, e pode tomar um sabor ligeiramente rançoso devido à oxidação quando a cerveja envelhece (PALMER, 1999).

O desempenho do fermento funciona, basicamente, quando há muita quantidade de açúcar no meio onde está, pois o fermento utiliza da fermentação para obter energia para viver, contando com o oxigênio do meio para se reproduzir. Já, quando há pouca ou nenhuma concentração de açúcar no meio, ele usufrui da respiração para obter energia para sua sobrevivência e não para se reproduzir. No final do processo de fermentação a maior parte do fermento irá flocular e se depositar no fundo do fermentador (FARIA, 2015).

Deve ser levado em consideração o conhecimento sobre a sua floculação, que é a taxa que ela se deposita no fundo, na escolha de um tipo de levedura. É importante também saber a sua atenuação, que é a medida de transformação que a levedura converte açúcar em álcool. Uma cerveja muito atenuada será menos doce e mais seca, e uma pouco atenuada, ainda uma cerveja mais doce devido ao açúcar ter ficado para trás. Ressalta-se ainda que muitos sabores indesejáveis da cerveja artesanal são causados pelas condições que as leveduras precisam ter e não possuem, por isso é importante a atenção e conhecimento sobre a levedura escolhida para a cerveja. (FARIA, 2015).

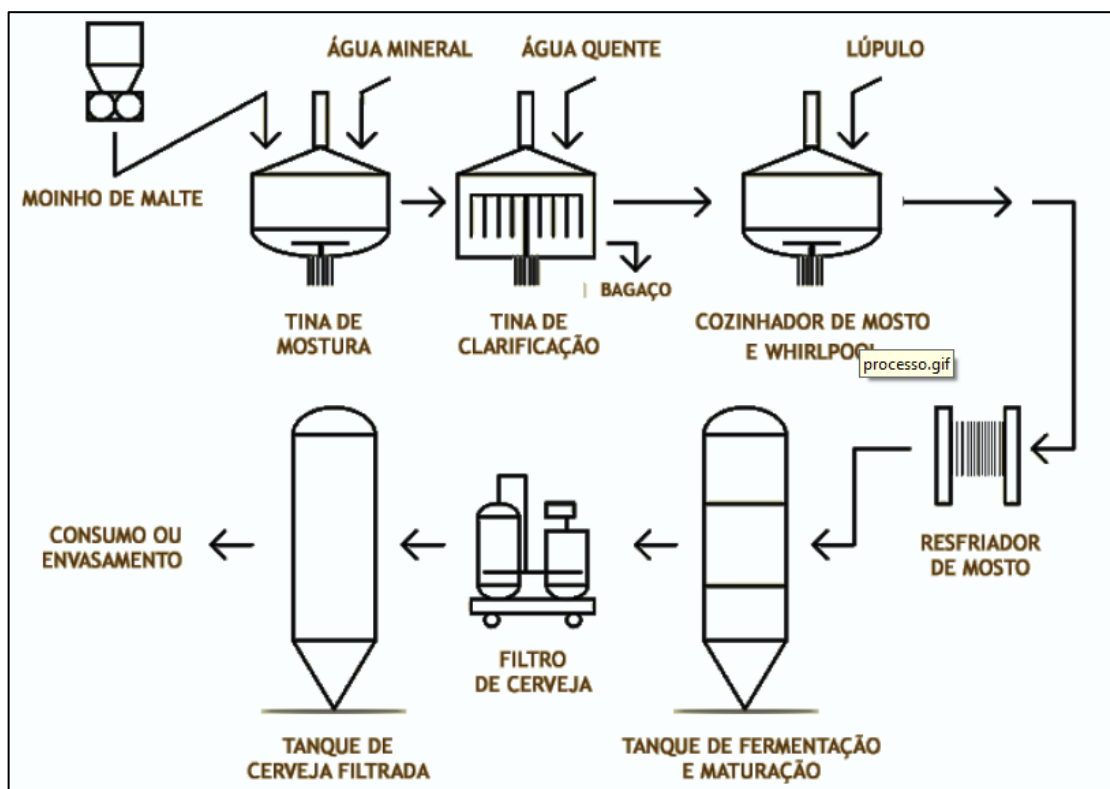
### 3.2 Etapas do Processo

Basicamente, de acordo com GAUTO e ROSA (2011), para produção de cerveja em escala industrial, têm-se as seguintes etapas no processo:

- A produção do mosto açucarado (moagem do malte, mosturação, filtragem, fervura e clarificação);
- Fermentação;
- Acabamento (filtração, carbonatação, envase, pasteurização)

Para melhor exemplificação e entendimento, um fluxograma mostra o processo como todo (FIG. 6).

Figura 6 - Fluxograma do Processo de Fabricação da Cerveja Artesanal.



Fonte: (Verde. A. A; Cucolo. M. C; Emanuelli I. P, 2017).

#### 3.2.1 Moagem

Considera-se o malte como a matéria-prima principal da cerveja, pois ele é responsável por grande parte das características que diferem os estilos de cerveja. O malte é moído para

expor o seu endosperma presente no grão, rico em amido. A casca é muito importante também pelo fato dela ser utilizada na etapa de filtração (SILVA, 2017).

De acordo com GAUTO e ROSA (2011), a moagem é o processo onde o malte é triturado com o objetivo de se expor o interior do grão, no qual contém uma quantidade significativa de amido, que serão usados para a formação de açúcares na mostura. O grão não deve ser muito e nem pouco moído, pois podem acarretar problemas durante o processo.

Uma moagem eficaz é aquela onde o moedor não tritura o malte totalmente, quebram-se apenas seus grãos, permitindo uma quantidade equilibrada de cascas e um volume baixo de farelos. A FIG. 7 apresenta-se o malte moído, onde os grãos encontram-se completamente moídos com pouca quantidade de farinha. Em percentuais, tem-se que a moagem ideal produz: 20–25% de cascas, 45–65% de sêmola e 15–25% de farinha. (SILVA, 2017).

Figura 7 - Malte moído.



Fonte: Gibram, 2014.

O malte moído não pode ficar muito tênue e nem espesso, pois eles afetam na estrutura da cerveja. Caso estejam tênues, há problemas com o processo de filtração e com as cascas do malte que possui os taninos, responsáveis pela adstringência, propriedade da cerveja. E por outro lado, ele sendo espesso, o malte não consegue expor seu endosperma, como consequência dificultando a hidrólise (VIEIRA, 2009).

### 3.2.2 Mosturação

Nesta etapa, os cereais já moídos são acrescentados à água e dissolvidos, visando obtenção de uma mistura líquida e açucarada chamada mosto, que é a base para cerveja a ser

produzida (SINDICERV, 2014). A temperatura do cozimento deve ser rigorosamente controlada Quadro 2, pois as substâncias do malte, diretamente solúveis em água, serão hidrolisadas (com auxílio das enzimas) de amido a açúcares simples, conforme o aumento da temperatura no decorrer do processo (VENTURINI, 2010).

Quadro 2 - Temperatura e pH de atuação das enzimas.

<b>Enzimas</b>	<b>Temperatura ótima</b>	<b>pH ótimo</b>	<b>Substrato</b>
Hemicelulases	40-45 °C	4,5-4,7	Hemicelulose
Exopeptidases	40-50 °C	5,2-8,2	Proteínas
Endopeptidases	50-60 °C	5,0	Proteínas
Dextrinase	55-60 °C	5,1	Amido
Beta-amilase	60-65 °C	5,4-5,6	Amido
Alfa-amilases	70-75 °C	5,6-5,8	Amido

Fonte: Tschope, 2001.

Diversos intervalos de temperatura conduzem a mostos ricos em açúcares fermentescíveis ou em dextrinas. Geralmente, altas temperaturas de mosturação (67 a 72°C) favorecem a ação da  $\alpha$ -amilase que produz um hidrolisado de amido, chamado de dextrinas, que não é fermentado pelas leveduras, resultando em cervejas mais encorpadas e adocicadas. Temperaturas mais baixas na mistura (62 a 66°C) produzem açúcares, como a maltose, glicose e maltotriose, que são fermentadas completamente pelas leveduras, o resultado são cervejas "secas" (sem doçura). No processo de mosturação, obtém-se a extração de 65% dos sólidos totais do malte (MATOS, 2011).

### 3.2.3 Clarificação

Terminada a mosturação, inicia-se o processo de clarificação do mosto por recirculação. Nesse momento ocorre a formação da camada filtrante, a partir da casca de malte, no fundo da tina de mosturação. Esta torta é responsável pela retenção das partículas em suspensão e, conseqüentemente, pela filtração do mosto, tornando-o límpido. A recirculação é feita até que o mosto esteja clarificado (BREDA, 2016).

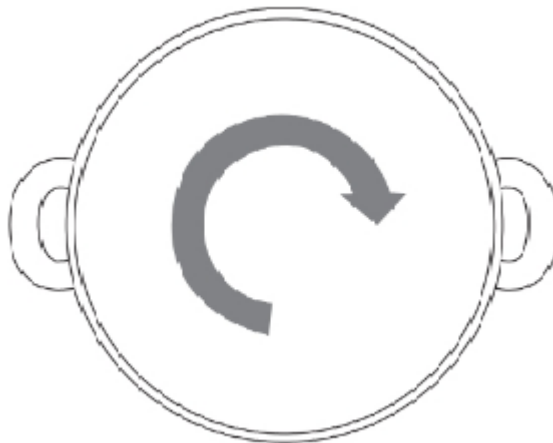
A casca do malte serve como camada filtrante. Após esta operação, a camada filtrante é lavada com uma certa quantidade de água (denominada água secundária, ou água de lavagem) a 75°C, visando aumentar a extração de açúcar e, conseqüentemente, elevar o rendimento do processo (ALMEIDA E SILVA, 2005).



### 3.2.4 Fervura

De acordo com Breda, (2016), na tina de fervura ocorre a correção da densidade, a lupulagem e *whirlpool*. No decorrer da fervura, o mosto libera substâncias indesejáveis para o produto final, tais como proteínas, taninos e polifenóis os quais serão arrastados e decantados no fundo da panela após a realização do *whirlpool* (FIG. 8).

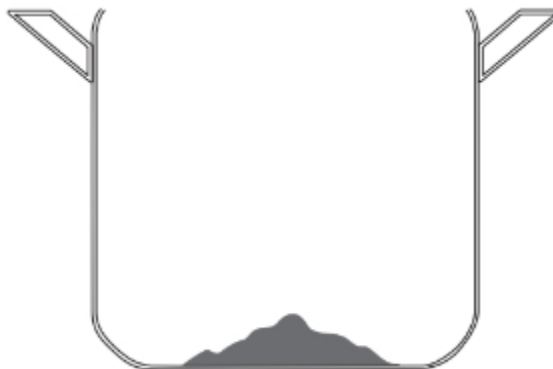
Figura 8 - Movimento do *Whirlpool*.



Fonte: DRAGONE, G; SILVA, T, A, O; SILVA, J, B, A, 2016.

Forma-se um redemoinho, o qual fará com que todos os sólidos em suspensão sejam atraídos para o fundo e para o centro do caldeirão criando uma “torta” chamada de *trub* quente, que são proteínas e restos de lúpulo (FIG. 9). O tempo de *whirlpool* deve ser de 15 minutos, sendo 5 minutos de rotação e 10 minutos de repouso, para que ocorra a decantação de sólidos suspensos e o mosto esteja o mais límpido possível para iniciar o resfriamento.

Figura 9 - *Trub* depositado no fundo da tina após *whirlpool*.



Fonte: DRAGONE, G; SILVA, T, A, O; SILVA, J, B, A, 2016.

Normalmente, o processo de fervura dura algo em torno de 90 a 120 minutos, durante este período acontece à volatilização de substâncias indesejáveis na fermentação e produto final.

O objetivo da fervura é extrair o aroma e o gosto amargo do lúpulo, esterilizar, concentrar, desenvolver cor, inativar enzimas e coagular proteínas presentes no mosto. Durante a fervura, ocorre a destruição da flora bacteriana, a inativação das enzimas que ainda apresentavam alguma atividade e a eliminação de alguns compostos voláteis que conferem odor e sabor da cevada ou do malte (BRUNELLI, 2012).

Na fase da fervura ocorre-se a adição do lúpulo. A temperatura elevada contribui para melhor retirada do extrato dos dois tipos de lúpulo e, assim, ocorre o bom desenvolvimento do sabor e aroma característicos deste. A adição do lúpulo é feita no meio ou no final da fervura, podendo ser adicionado em etapas. O processo é realizado desta maneira porque as resinas responsáveis pelo aroma e sabor do lúpulo são voláteis, logo, se fosse adicionado no início da fervura perderia sua função no processo cervejeiro (EVANGELISTA, 2012).

Depois da fervura, é necessário resfriar o mosto rapidamente, para evitar a oxidação, contaminação por micro-organismos, e a formação de DMS (dimetil sulfeto). O DMS é formado por bactérias, ou pelo calor, ao provocar a redução do S-metilmetionina (SMM) (que é produzido na malteação). O DMS tem sabor rançoso, e é característico de algumas *light lagers* (cervejas mais leves e suaves), enquanto que em outros estilos é tido como um *off flavor* (sabor não desejável) com aroma e sabor de milho cozido. O DMS é formado também na fervura, mas pelo fato de o líquido estar em ebulição, o mesmo se vaporiza junto com a água. Quando a ebulição para, ele é formado e permanece no mosto. Então, o mosto passa pelo trocador de calor de placas, ou um chiller é colocado dentro do mesmo, e é resfriado de 100°C para 10 a 20°C imediatamente (MATOS, 2011).

### **3.2.5 Fermentação**

Ocorre a transformação dos açúcares fermentescíveis em gás carbônico e álcool, pela ação da levedura cervejeira adicionada. Nesta fase, em condições anaeróbias, subprodutos oriundos do crescimento celular das leveduras, agregam sabor e aroma para a cerveja. A temperatura para as cervejas denominadas de “baixa fermentação”, é de 8 a 11°C, fermentando de 5 a 7 dias. Já as cervejas de “alta fermentação”, de 18 a 22°C fermentando entre 3 a 5 dias (BRUNELLI, 2012).

A fermentação, industrialmente, ocorre em tanques fechados, revestidos por uma camisa externa que permite a passagem de fluido refrigerante (amônia ou etileno glicol) para

manter o sistema na temperatura desejada, que pode variar. Em produções artesanais o controle de temperatura é em geladeira, em salas climatizadas, em temperatura ambiente, entre outras técnicas. O principal objetivo da fermentação é obter cervejas com as características sensoriais, químicas e físico-químicas desejadas (MATOS, 2011).

A fonte de carboidratos do malte contém: glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, além de dextrinas. As leveduras cervejeiras são capazes de utilizar glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose nesta sequência, embora algum grau de sobreposição aconteça (VENTURINI, 2010).

O oxigênio injetado no mosto, é utilizado pelas leveduras, para a produção de ácidos carboxílicos insaturados e esteróis que são essenciais para a síntese da membrana celular e, conseqüentemente, para o crescimento celular (VENTURINI, 2010).

Durante a fermentação, se faz necessário o controle da atenuação, ou seja, o acompanhamento dos valores de densidade final ou FG planejada, pois à medida que as leveduras vão convertendo os açúcares do mosto em álcool e CO<sub>2</sub>, este valor vai sendo reduzido. O controle da atenuação precisa ser feito diariamente para que o cervejeiro possa observar o comportamento das leveduras e se certificar de que a fermentação chegou efetivamente ao final. Para tanto, é recomendada a observação de estabilização da densidade por pelo menos 48 horas, para que a finalização dessa etapa seja feita no momento correto e com segurança (BREDA, 2016).

### **3.2.6 Maturação**

O objetivo da maturação é aprimorar o sabor e o aroma da cerveja através da redução do teor de diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico, além do aumento do teor de éster; carbonatar parcialmente o produto; evitar a ocorrência de oxidações que comprometam sensorialmente a bebida e clarificar o líquido através de deposição do fermento e outros materiais em suspensão (BRUNELLI, 2012).

A maturação pode durar de 4 a 42 dias (generalizando, pois depende do método e do tipo de cerveja). Neste ponto do processo, a exposição ao oxigênio só irá contribuir para oxidar a cerveja, ou pior ainda, contaminá-la. Se o mosto é exposto ao oxigênio em temperaturas superiores a 26°C por muito tempo, a cerveja, mais cedo ou mais tarde, desenvolve sabores desagradáveis (MATOS, 2011).

A cerveja deve ser resfriada entre 0 e 2 °C para favorecer a decantação das leveduras e a clarificação da cerveja. Durante esse período, o fermento deve ser purgado dos

fermentadores, para possibilitar uma maturação livre de leveduras e favorecer a formação do *trub* frio (decantação do fermento e partículas mais pesadas), que será purgado durante o período. Essa purga pode ser feita facilmente em fermentadores de fundo cônico, porém, caso o cervejeiro utilize outro tipo de fermentador, as purgas podem ser substituídas por uma trasfega total da cerveja para outro tanque, de forma a separar a bebida da borra de leveduras. A trasfega deve ser feita, na medida do possível, sem que haja contato da cerveja com o ar. Os tanques devem estar muito bem limpos e sanitizados, atenção especial deve ser dada às válvulas, registros ou torneiras, e a passagem da bebida para o tanque de maturação não deve gerar tumulto ou espuma (BREDA, 2016).

### 3.2.7 Filtragem

A filtragem é opcional, usa-se esta etapa em alguns casos, para a eliminação de partículas menores em suspensão, o que torna a cerveja cristalina, brilhante e transparente. A filtração, em tese, não altera a composição e o sabor da cerveja (REITENBACH, 2010). Além disso, após a filtração, a cerveja deverá aumentar sua estabilidade microbiológica, logo, físicoquímica, pois as leveduras em suspensão são retiradas, bem como alguns compostos que não decantaram. Com isso, a alteração da cerveja no armazenamento e comercialização é, em parte, evitada (os processos da maturação continuam a acontecer, fazendo com que a cerveja possa “passar do ponto” se não for estabilizada por meio de técnicas).

Outro benefício da filtração é o padrão da cerveja dentro da garrafa, pois em alguns casos, principalmente em cervejas caseiras ou artesanais, o líquido na parte inferior é muito mais denso do que na parte superior, pessoas que não estão acostumadas interpretam isso a má de qualidade do produto, perdendo o interesse no mesmo. Por outro lado, a não filtração da cerveja acaba deixando as leveduras em suspensão, que são ricas em vitaminas, enriquecendo nutricionalmente a cerveja. Nessa fase são adicionados estabilizantes, antioxidantes, entre outras coisas (REITENBACH, 2010).

### 3.2.8 Carbonatação

A carbonatação ou gaseificação pode ser feita com injeção de CO<sub>2</sub> forçadamente, ou por *priming*. Para produções em menor escala e caráter mais artesanal é feito o *priming*, que consiste na adição de açúcar na cerveja não filtrada e envasamento imediato. Esse açúcar adicionado necessita ser o de mais fácil consumo para a levedura, por isso ele passa pelo processo de inversão (é fervido por algum tempo para que a sacarose se transforme em glicose + frutose, e em baixo pH para que não haja caramelização). As leveduras ainda presentes na

cerveja irão fermentar esse açúcar, produzindo CO<sub>2</sub>, conseqüentemente a garrafa irá pressurizar por estar fechada e o gás carbônico irá se armazenar no líquido. Na indústria costuma-se colocar na cerveja o CO<sub>2</sub> que foi reservado da fase de fermentação, ou se faz uma técnica parecida com a do *priming*, porém sem adição de açúcar. O método similar ao *priming* é um sistema que permite manter a cerveja sob pressão de CO<sub>2</sub> no tanque de maturação. Assim, a cerveja não perde todo o gás que trouxe da fermentação e permite acumular mais um pouco produzido no próprio maturador. (CRUZ et. al, 2008). Se depois disso a cerveja não estiver com a pressão adequada para o envase, é adicionado CO<sub>2</sub> forçadamente. Há empresas que injetam gás de qualquer forma, sem se preocupar se terá como a própria cerveja produzir o gás ou não, e só depois as mantêm nos tanques pressurizados até a carbonatação. Há cervejarias, ainda, que eventualmente injetam gás nitrogênio, com o intuito de favorecer características de formação de espuma (SANTOS, 2005).

### 3.2.9 Envase

O envase é o procedimento de engarrafamento, enlatamento ou embarrilamento do produto e é a etapa mais dispendiosa em uma cervejaria, em termos de matérias-primas e de mão-de-obra. Essa operação é executada em um equipamento denominado de enchedora, no caso de garrafas e latas, ou em máquinas de embarrilamento, quando se trata de barris (DRAGONE; SILVA; SILVA, 2016).

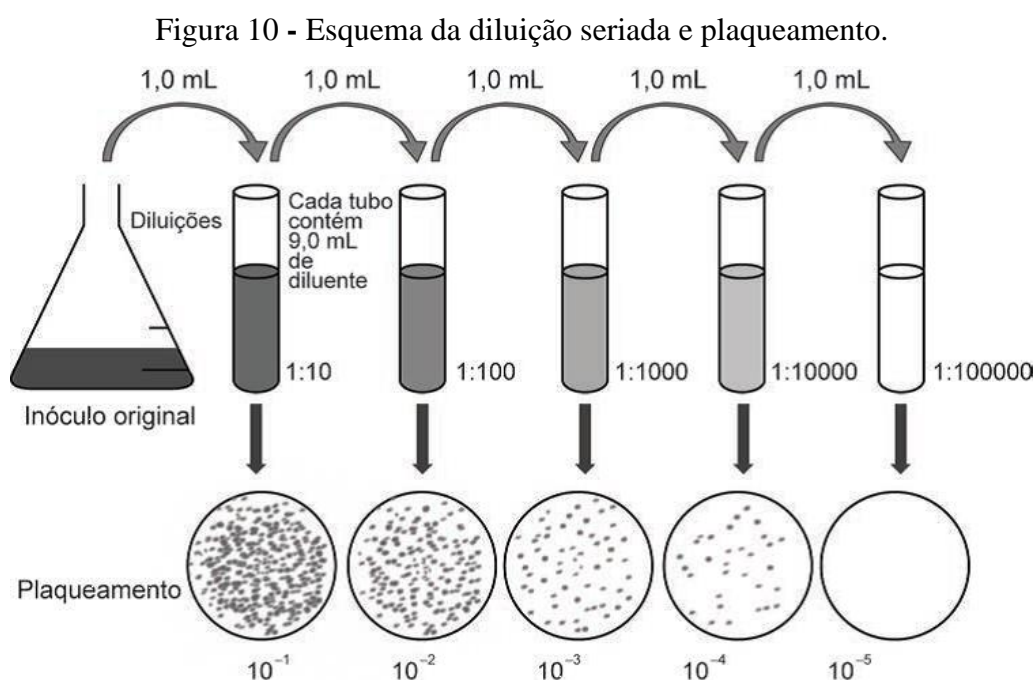
O enchimento é a fase final do processo de fabricação de cerveja, logo após o enchimento, a cerveja é submetida ao processo de pasteurização, principalmente quando são embaladas em latas ou garrafas (no barril, a cerveja normalmente não é pasteurizada e por isso, recebe o nome de chope). A pasteurização nada mais é do que um processo térmico no qual a cerveja é submetida a um aumento a 60 °C e posteriormente resfriado para 30 °C, para garantir maior estabilidade ao produto. Graças a este processo, é possível assegurar uma data de validade ao produto de seis meses após sua fabricação (SINDICERV, 2014).

Faz-se necessário a limpeza e sanitização das garrafas e tampinhas de forma a evitar-se qualquer tipo de contaminação a cerveja. Para diminuir uma possível aeração durante o envase é necessário inclinar a garrafa um pouco de modo que a cerveja escorra pela lateral, e vai até o fundo da garrafa. Logo depois, lacra-se bem a garrafa com a tampa. É importante que logo após o envase, as garrafas sejam armazenadas de pé e em temperatura próxima a de fermentação, e sem contato com luz, por aproximadamente 15 dias. (SILVA, 2015).

### 3.2.10 Cuidados com a levedura

Para garantir a qualidade da cerveja, é necessário manter um controle rígido principalmente na fermentação, com atenção as condições internas e externas, mas também com a fisiologia da levedura. Para ocorrer a fermentação, as leveduras devem estar viáveis (células vivas) e metabolicamente ativas na etapa de fermentação (SUHRE, 2014).

Existem maneiras de fazer a avaliação da viabilidade (percentual de células vivas), uma delas, consiste na determinação do número de colônias formadas após plaqueamento de uma diluição conhecida de células em meio de cultura sólido. As amostras de leveduras são diluídas, pipetadas em uma placa com meio contendo ágar ou estéril, misturada com o inóculo para o caso da placa estéril e então a placa é incubada (FIG. 10). Após esse procedimento, as colônias irão se formar na placa e após um tempo de 24 a 48 horas pode-se analisar a viabilidade das células, contando-se as colônias que se desenvolveram depois da incubação e multiplicando pela diluição (SENAI, 2014).



Fonte: Ceccato-Antonini, 2010.

Outro meio de avaliação da viabilidade celular, é pela observação microscópica da coloração diferencial de células. Neste método, é adicionado corante a uma amostra de levedura devidamente diluída, sendo que as células de levedura com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto as mortas ficam da cor do corante utilizado. As células vivas não se pigmentam, pelo fato de conter enzimas que reduzem a substância corante em compostos

incolores. O procedimento consiste na contagem das células coradas e não coradas, utilizando um microscópio e uma Câmara de Neubauer, e então calcula-se a razão entre as células coradas e a quantidade total. Os corantes mais utilizados são o azul de metileno e eritrosina (O'CONNOR-COX et al., 1997 e CECCATO-ANTONINI, 2010).

A viabilidade das células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção da cerveja do tipo lager, foram analisadas da geração 0 (levedura seca), geração 1 (levedura reaproveitada) e levedura hidratada, a fim de avaliar qual o método mais vantajoso, em relação à viabilidade, tempo de fermentação e economia.

Considera-se a geração 0, quando o fermento é utilizado pela primeira vez, ou seja, quando se adquire o pacote fechado do fornecedor e o usa. A geração 1, será considerado o fermento reutilizado, o qual é transferido de um tanque em maturação para um tanque que irá iniciar a fermentação, essa transferência ocorre por meio de uma mangueira esterilizada com sanitizante, no momento em que ocorre a transferência do mosto clarificado para o mesmo tanque. As leveduras não passam por nenhum tipo de tratamento para fazer-se o seu reuso.

Já a levedura hidratada, é quando se hidrata com água o fermento antes de utiliza-lo, em uma porção de 10 vezes seu próprio peso, segundo recomendações do próprio fabricante.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do estudo escolhido, necessitou-se a aquisição de três amostras de leveduras cedidas pela cervejaria Fürst Bier, localizada no município de Formiga- MG. O mestre cervejeiro da empresa gentilmente nos cedeu as amostras, em quantidades de 250 ml por amostra em frascos esterilizados com solução de ácido peracético a 0,5%.

### 4.1 Coleta das amostras

As amostras colhidas são provenientes de uma pós-fermentação da cerveja estilo pilsen produzida na cervejaria, nas datas de 02/09, 18/09 e 01/10 de 2019, a qual ficaram armazenadas sob refrigeração de 0 a 4 °C até o momento do deslocamento ao laboratório para o estudo, sendo que o teste de viabilidade era efetuado no mesmo dia das coletas.

A levedura utilizada é do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, de origem *Weihenstephan* na Alemanha, produzida e comercializada pelo laboratório Fermentis, denominada W-34/70, levedura de baixa fermentação, indicada para cervejas Lagers. Sua extração ocorreu no tanque fermentador conforme ilustrado na FIG. 11, quando o mesmo já se encontrava em processo de maturação, dessa forma, as leveduras decantadas no fundo do tanque foram retiradas com auxílio de um material específico de coleta diretamente para o recipiente coletor (FIG.12).

Figura 11 – Tanque fermentador onde foi colhida a amostra de levedura.



Fonte: Próprio autor, 2019.



Figura 12 - Equipamento de coleta e recipiente coletor

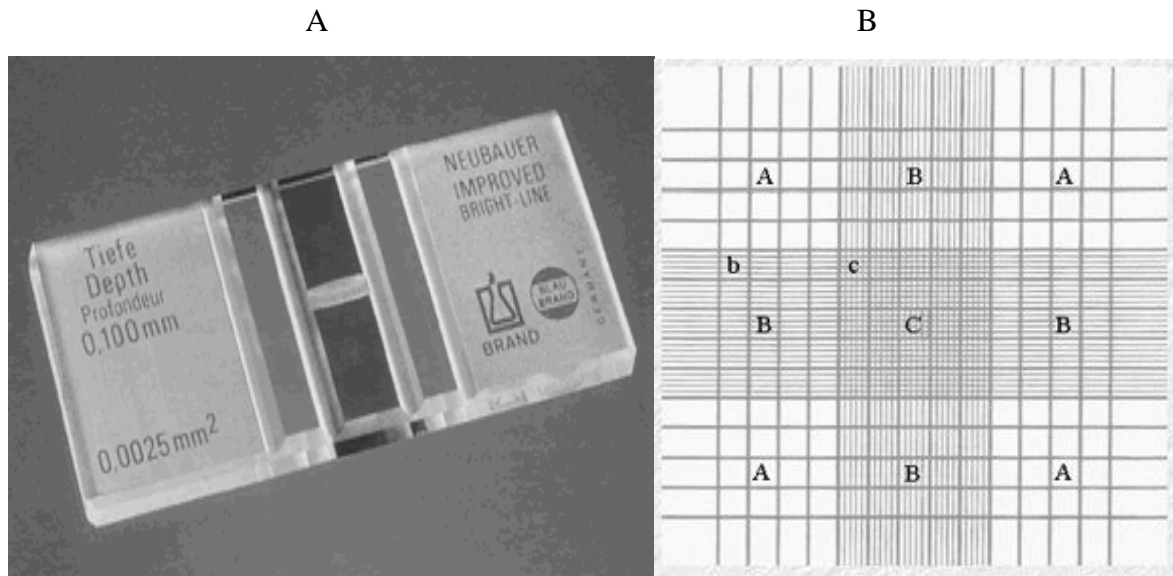


Fonte: Próprio autor, 2019.

#### 4.2 Método

No presente trabalho utilizou o método de contagem direta de células de levedura, com recurso ao microscópio e à câmara de contagem de Neubauer para análise da viabilidade das células. De uma forma geral, neste método foi utilizada uma suspensão diluída da amostra a ser analisada, coloca-se essa amostra na câmara de contagem de Neubauer que então será observada ao microscópio. O que torna possível realizar a contagem neste método é o fato da câmara de Neubauer se encontrar dividida em quadrados de dimensões bem definidas, denominados A, B e C, que juntos constituem um quadrado maior, sendo assim o seu volume conhecido. A seguir as FIG. 13A e 13B representativas da câmara de Neubauer e a visão da mesma por um microscópio.

Figura 13A e 13B – Câmara de contagem de Neubauer/Observação ao microscópio da câmara de Neubauer.



Fonte: Lucarini et al; Bicalho, 2011.

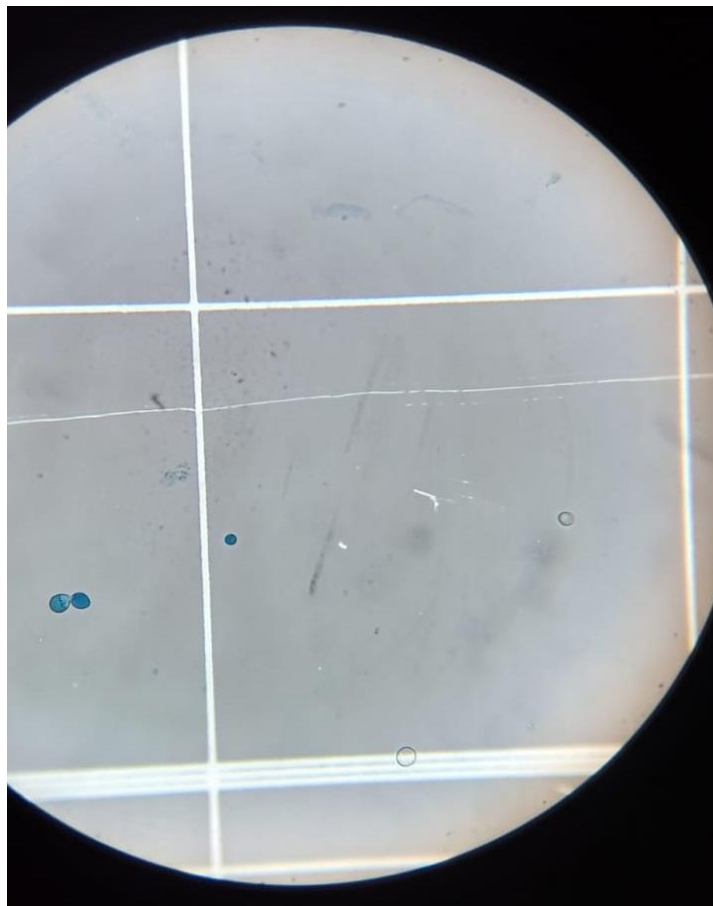
Nota-se que os quadrantes têm subdivisões diferentes, sendo que o critério de escolha do quadrante onde as células foram contadas é o tamanho das células. Então, células muito grandes são contadas no quadrante A, células de tamanho médio são contadas no quadrante B e células muito pequenas são contadas no quadrante C (LUCARINI *et al*, 2011).

Cada quadrante (A, B e C) possui 1 mm<sup>2</sup> de área, sendo a área total 9 mm<sup>2</sup>. A lâmina é coberta por uma lamínula, que fica a uma distância (profundidade) de 0,1 mm, que permite obter um volume de 0,1 mm<sup>3</sup> sobre cada quadrante. Com o auxílio de uma Pipeta de Pasteur, uma alíquota da solução de levedura com corante foi adicionada a Câmara de Neubauer, por meio de um dos canais laterais ao campo central, aguarda-se até a amostra se espalhar por toda a superfície da lâmina e procede-se à contagem no microscópio (LUCARINI *et al*, 2011 e CECCATO-ANTONINI, 2010).

Devido a não distinção das células vivas das células mortas e a dificuldade de contagem de células no microscópio correspondente ao fraco contraste entre as células e o meio que as circunda, o grau de viabilidade da levedura é determinado recorrendo ao uso de um corante vital, no caso usou-se o azul de metileno, baseando-se no princípio em que as células de levedura viáveis não absorvem o corante, enquanto as células não viáveis, ou seja, as células de levedura mortas assumem a cor do corante utilizado. Com recurso a um microscópio e a câmara de Neubauer, as centenas de células são contadas conforme FIG.14 e

em seguida foi calculada a razão entre as células coradas e o número total de células (vivas e mortas), sendo desta forma o resultado expresso em % de viabilidade.

Figura 14 – Célula de levedura não viável corada com azul de metileno/Células de levedura viável transparente.



Fonte: Próprio autor, 2019.

#### 4.2.1 Procedimento analítico

As análises de viabilidade celular foram feitas em triplicatas, nas datas de 02/09, 18/09 e 01/10 do ano de 2019 no Laboratório de Microscopia, localizado no Centro Universitário de Formiga - UNIFOR-MG utilizando-se o método de contagem direta ao microscópio com coloração junto ao azul de metileno (CECCATO-ANTONINI, 2010).

Inicialmente preparou-se uma solução de azul de metileno-citrato de sódio, com 0,01 g de azul de metileno, 2 g de citrato de sódio, preparada da seguinte forma: dissolveu-se o azul de metileno em 10 mL de água destilada num balão volumétrico de 100 mL. Após ser dissolvido, acrescentou-se o citrato de sódio e completou o volume até 100 mL com água destilada, A solução preparada foi esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos.

Como podem existir bilhões de células em um único mL de amostra, fez-se necessário a diluição da levedura pelo método de diluição seriada, de forma a se obter a redução do número de células de levedura por mL, com o objetivo de facilitar a contagem da mesma ao microscópio.

Utilizando-se quatro tubos de ensaio, foi feita a diluição da amostra de levedura na proporção de 1 mL de amostra para 9 mL de água destilada (FIG.15), repetiu-se esse procedimento mais 4 vezes, de forma que se obteve-se diluições de (1/10), (1/100), (1/1000) e (1/10000). Essa diluição foi escolhida em razão da boa quantidade de células disponíveis para contagem no quadrante, na qual se obteve melhores resultados para sua utilização no experimento.

Figura 15 – Método de diluição seriada



Fonte: Próprio autor, 2019.

Transferiu-se 100  $\mu$ L da amostra diluída (1/10000) para um eppendorf transparente e adicionou-se 100  $\mu$ L da solução de azul de metileno-citrato de sódio (FIG.16), em seguida foi feita a homogeneização da solução.

Figura 16 – Mistura da amostra/corante na Câmara de Neubauer.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Adicionou-se uma alíquota desta mistura para a Câmara de Neubauer, com o auxílio de uma micropipeta, colocou-se a lamínula sobre a Câmara de Neubauer, e procedeu-se à observação das células com a ajuda de um microscópio (marca Coleman, modelo N107) conforme ilustrado na FIG.17, a observação ocorreu na objetiva de 40x.

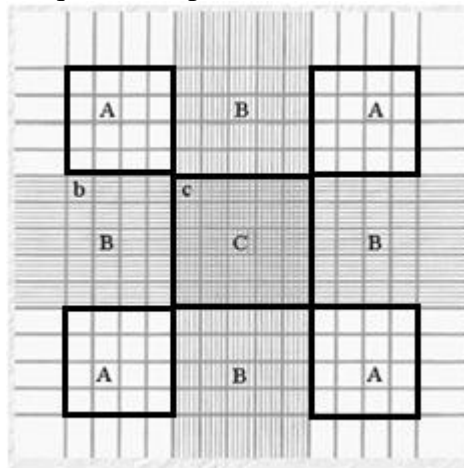
Figura 17 – Microscópio Óptico



Fonte: Próprio autor, 2019.

Para a contagem de células na amostra, contou-se o número total de células viáveis e não-viáveis nos 5 campos da câmara, sendo um de cada ponta e um central. Os campos usados para fazer a contagem foram numerados de 1 a 5. Na FIG.18 observa-se um esquema simplificado da câmara de Neubauer. Na contagem, foram consideradas todas as células que estavam nos limites superior e lateral esquerdo do campo e desprezadas as que tocavam o limite inferior e lateral direito. Também foram contadas todas as células no interior de cada campo considerado, respeitando as considerações anteriormente citadas.

Figura 18 - Esquema simplificado da Câmara de Neubauer



Fonte: Adaptado de Bicalho, 2011.

Para fazer-se o cálculo da viabilidade celular foram contadas e anotadas, em triplicata a quantidade de células vivas (células transparentes) e as células mortas (células coradas de azul).

A população total de leveduras da amostra considerada foi calculada pela Equação 1:

$$\frac{\text{Número total de células}}{\text{mL}} = \frac{\text{número de células nos 5 campos}}{5} \times \text{diluição} \times 10^4 \quad (1)$$

A quantidade de células vivas da amostra foi calculada pela Equação 2:

$$\frac{\text{Número de células vivas}}{\text{mL}} = \frac{\text{número de células vivas nos 5 campos}}{5} \times \text{diluição} \times 10^4 \quad (2)$$

A viabilidade celular foi calculada pela Equação 3:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células}} \times 100 \quad (3)$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante do experimento realizado, foram encontrados e analisados os resultados expressos nos quadros abaixo que mostram informações das amostras do fermento liofilizado, reaproveitado e hidratado. Para a determinação da viabilidade, foram consideradas as médias dos resultados encontrados em cada repetição. O tempo de fermentação foi acompanhado desde o primeiro dia (início da fermentação) até o término da fermentação.

A seguir apresentam-se os dados do uso do fermento liofilizado após a fermentação, expressos no Quadro 3.

Quadro 3 - Resultados das análises de viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na geração 0 (levedura seca), considerando a média das 3 repetições.

	<b>Células vivas</b>	<b>Células mortas</b>	<b>Total de Células</b>	<b>N° células vivas/mL</b>	<b>N° total células/mL</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
1º campo	4,67	1,00	5,67			
2º campo	5,67	1,33	7,00			
3º campo	5,00	1,67	6,67	1,15*10 <sup>9</sup>	9,47*10 <sup>8</sup>	82,56
4º campo	4,00	1,00	5,00			
5º campo	4,33	0,00	4,33			
<b>Total</b>	<b>23,67</b>	<b>5,00</b>	<b>28,67</b>			
Tempo de Fermentação				12 dias		

Fonte: Próprio autor, 2019.

No Quadro 3 observou um resultado satisfatório referente a viabilidade com valor de 82,56%, porém o tempo de fermentação é um pouco maior que os demais. Isso acontece devido às células estarem totalmente desidratadas, que ao entrar em contato com o mosto açucarado levaram um tempo maior para se reidratar e multiplicar, e somente depois começaram a fermentação propriamente dita. O tempo de fermentação é acompanhado com medições diárias da densidade da cerveja, com uso de um densímetro, o qual se percebe a diminuição da densidade com o passar dos dias, até que em dois dias seguidos obtém os mesmos valores de densidade, dando o indicativo que chegou ao fim a fase de fermentação.

Os resultados contidos no Quadro 4 se diferem um pouco, onde se obteve dados da utilização da levedura reaproveitada.



Quadro 4 - Resultados das análises de viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na geração 1 (levedura reaproveitada), considerando a média das 3 repetições.

	<b>Células vivas</b>	<b>Células mortas</b>	<b>Total de Células</b>	<b>N° células vivas/mL</b>	<b>N° total células/mL</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
1º campo	6,67	0,67	7,34			
2º campo	7,67	1,33	9,00			
3º campo	6,33	1,67	8,00	1,28*10 <sup>9</sup>	1,47*10 <sup>9</sup>	87,26
4º campo	4,00	1,00	5,00			
5º campo	7,33	0,00	7,33			
<b>Total</b>	<b>32,00</b>	<b>4,67</b>	<b>36,67</b>			
Tempo de Fermentação	5 dias					

Fonte: Próprio autor, 2019.

Os dados do Quadro 4 mostram resultados significativamente melhores que o do Quadro 3, tanto na viabilidade com valor de 87,26%, quanto no tempo de fermentação. Isso sucede pelo fato dessas células estarem vindo de um pós-fermentação, ou seja, essas células se encontram ativas e multiplicadas, assim que entram em contato com um novo mosto, elas se propagam ainda mais rápido, conseqüentemente começaram a fermentação mais cedo, resultando em um tempo de fermentação muito menor.

O cenário muda, no Quadro 5 a seguir com uso da levedura hidratada antes de ser inoculada no mosto.

Quadro 5 - Resultados das análises de viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na geração 2 (levedura hidratada), considerando a média das 3 repetições.

	<b>Células vivas</b>	<b>Células mortas</b>	<b>Total de Células</b>	<b>N° células vivas/mL</b>	<b>N° total células/mL</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
1º campo	6,67	0,33	7,00			
2º campo	7,67	1,00	8,67			
3º campo	9,00	1,00	10,00	1,77*10 <sup>9</sup>	1,61*10 <sup>9</sup>	90,98
4º campo	9,67	1,67	11,34			
5º campo	7,33	0,00	7,33			
<b>Total</b>	<b>40,34</b>	<b>4,00</b>	<b>44,34</b>			
Tempo de Fermentação	10 dias					

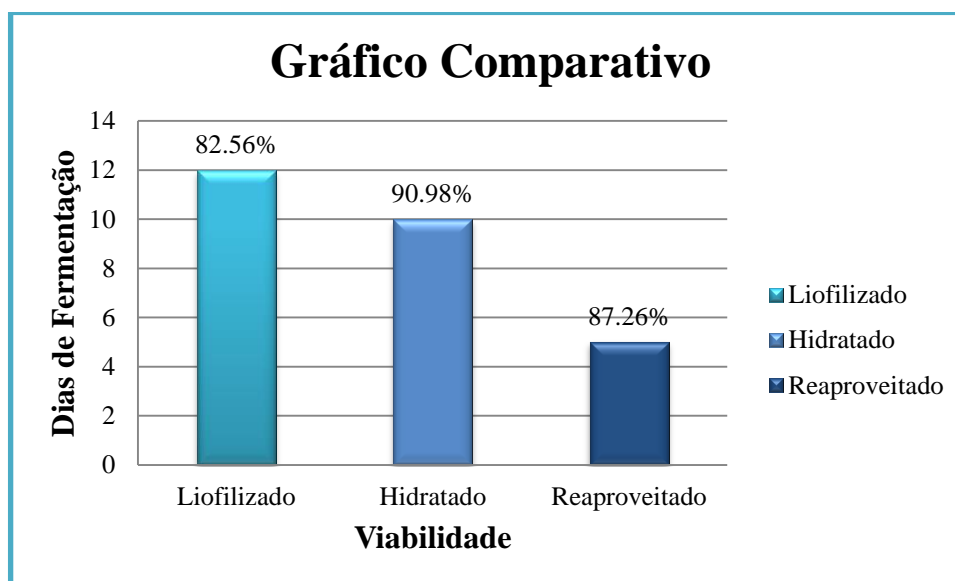
Fonte: Próprio autor, 2019.

No Quadro 5, apresentou dados com valores de viabilidade melhores que os anteriores, cerca de 90,98% . Também apresentou um tempo de fermentação razoável diante dos demais dados encontrados. Pode observar que o tempo de fermentação foi menor do que os dados do

Quadro 3, isso porque ao se hidratar a levedura, ativa as células ali presente e com a presença do oxigênio contido na água começam sua multiplicação, deste modo, quando jogadas no mosto açucarado ficam com o dobro de células viáveis.

Para ter um melhor entendimento em termos de comparação, foi necessária a construção de um gráfico, com os dados expressos na FIG. 18 a seguir.

Figura 18 – Gráfico comparativo de dias de fermentação/viabilidade



Fonte: Próprio autor, 2019.

Diante do gráfico apresentado, percebe-se que em questão de viabilidade, o fermento hidratado seria a melhor escolha para uma produção de cerveja estilo lager com 90,98%, pois apresentou uma melhor porcentagem em relação aos outros, e teve um ganho de 2 dias de fermentação em relação ao fermento liofilizado. Em concordância com (CRUZ *et al.*, 2014, p.3) que fez um estudo da viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e sua reutilização em processos de fermentação em batelada repetida, obteve-se dados de viabilidade com levedura hidratada de 91,89%, e apresentava decréscimo ao decorrer das novas bateladas com o reuso da levedura anterior.

Em uma fábrica de cerveja, tempo é um fator primordial em um processo de produção, pois a cada dia de atraso em uma fermentação, perde-se também um dia de maturação, em consequência disto, leva maior tempo para colocar o produto no mercado, gerando possíveis prejuízos. Vale ressaltar, que existe certa desvantagem no uso de fermento hidratado, pois se faz necessário a aquisição de equipamentos para realizar esse procedimento, além do risco de contaminação, podendo comprometer a qualidade do produto.

O fermento liofilizado apresenta desvantagens diante dos outros dois procedimentos em quesito de viabilidade e tempo de fermentação, apresentando uma viabilidade mais baixa e fermentação mais demorada. Porém ele é o único que não corre o risco de contaminação, além da facilidade de utiliza-lo.

Já o fermentado reaproveitado, apresenta percentual de viabilidade significativo diante dos demais, que vai em conformidade com (Paiva, 2019), onde o mesmo realizou um estudo somente com o reaproveitamento de levedura, apresentando valor de viabilidade próximo ao encontrado no presente trabalho com 89,09% na geração 1. Também o método de reaproveitamento manifesta um tempo muito baixo de fermentação, realçando que em questão de eficiência no processo fermentativo, esse procedimento se destaca melhor em relação aos outros, além de trazer uma economia considerável. Isso acontece devido à reutilização de um fermento da receita anterior, economizando-se com a compra de um novo pacote, podendo repetir essa técnica em mais outros lotes. Contudo, existe certo limite para o reaproveitamento, devido sua perda de células viáveis a cada lote que se faz seu reuso além de riscos de contaminação.

## 6 CONCLUSÃO

A fermentação é uma das etapas que mais influenciam no produto final, são os micro-organismos presentes nessa etapa que transformam aquele simples mosto açucarado na famosa “cerveja”. É importante que se tenha uma boa eficiência nesse processo, de forma que não comprometa a qualidade final da cerveja produzida.

Os resultados obtidos nas análises de viabilidade com a utilização de levedura liofilizada, reaproveitada e hidratada foram de 82,56%, 87,26%, 90,98% respectivamente, e tempo de fermentação de 12, 5 e 10 dias.

Pode-se afirmar, que para a fermentação da cerveja tipo lager o valor de viabilidade se apresenta superior com o uso do fermento hidratado, também apresenta um número baixo em dias de fermentação, o que gera vantagem dentre os outros meios de inocular a levedura.

Para ter-se uma maior certeza dos resultados, outras análises devem ser feitas, como a vitalidade das células e a detecção de contaminantes microbianos, pois em um meio fermentativo pode haver células vivas, porém não vitais, ou seja, sua incapacidade fermentativa. Também podem existir agentes contaminantes no meio, de forma diminuir a viabilidade das células.

## REFERÊNCIAS

- ALEDEIROS. O que é lúpulo, afinal? 2015. Disponível em:  
<<https://crialeimportadora.wordpress.com/2015/07/20/o-que-e-lupulo-afinal/>>
- BAMFORTH, C. W. Brewing: new technologies. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. 484p.
- BICALHO, I. C. Concentração de leveduras da fermentação alcoólica em hidrociclones [manuscrito] / Isabele Cristina Bicalho. - 2011. 135 f.: il. Disponível em:  
<<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15161/1/Diss%20Isabele.pdf>>. Acesso em: 09 mai. 2019.
- BORTOLI, D. A. da S; SANTOS, F; STOCCO, N. M; ORELLI, A; TOM, A; NEME, F. F; NASCIMENTO, D. D. Multiplicação de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) cervejeiras utilizando meios de cultura a base de açúcar mascavo. Bioenergia em revista: diálogos, ano 3, n. 2, p. 50-68, 2013.
- BREDA, M. H. Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia. Editor Edgard Blucher Ltda. 2º Edição, capítulo 4, pág 91, São Paulo, 2016.
- BRIGIDO. R. V; NETTO M. S. Produção de Cerveja. Trabalho apresentado à disciplina de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.
- BRUNELLI, L. T. Produção de Cerveja com Mel: Características Físico-Químicas, Energética e Sensorial. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrônomicas Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Botucatu, 2012.
- CARVALHO, L. G. de. Produção de Cerveja. Dossiê Técnico, REDETEC – Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2007.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias / Sandra Regina Ceccato-Antonini. -- São Carlos : EdUFSCar, 2010. 105 p. -- (Coleção UAB-UFSCar).
- CERVEJA PETRA. Maltes caramelos, cristal e torrado. 2017. Disponível em:  
<<http://www.cervejapetra.com.br/2017/04/06/maltes-caramelo-cristal-e-torrado/>>.
- CRUZ, M. L *et al.* Estudo da viabilidade da levedura *saccharomyces cerevisiae* y904 empregando processo fermentativo em batelada repetida. Universidade federal de Uberlândia. Florianópolis, 2014.
- DRAGONE, G; SILVA, T, A, O; SILVA, J, B, A. Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia. Editor Edgard Blucher Ltda. 2º Edição, capítulo 3, pág 52, São Paulo, 2016.

EMBRAPA. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/>> Acesso em 13 de Junho de 2019.

ENQ – UFSC. Engenharia Química UFSC. Produção de Cervejas. Disponível em: [http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_pos2004/vinho\\_cerveja/inicial\\_%20cervejas.html](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2004/vinho_cerveja/inicial_%20cervejas.html).

EVANGELISTA, R. R. Análise do processo de fabricação industrial de cerveja. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Tecnologia em Biocombustíveis. Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2012.

FARIA, M. T. de. O completo manual de cerveja em casa. 1. ed. São Paulo: OnLine, 2015.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; DA SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. Química Nova, São Paulo, v. 31, n. 7, 2008.

GAUTO, M. A; ROSA, G. R. Processos e Operações Unitárias da Indústria Química. Rio de Janeiro: Ciência Moderna, 2011.

GIBRAM, D.M. Fabricação de Cerveja Weissbier por Fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* através de processo artesanal. 2014. 76 p. Monografia, Universidade Federal de São João del Rey, Ouro Branco/MG, 2014.

HARPIA CERVEJARIA: redescubra sua cerveja. 2011

LUCARINI A. C.; SILVA L. A.; BIANCHI R. A. C. Um sistema para a contagem semi-automática de micro-organismos. PESQUISA & TECNOLOGIA FEI - Nº 26 p 36-40. Disponível em: <<http://fei.edu.br/~rbianchi/publications/RevistaFEI2004-a.pdf>>. Acesso em: 19 mai. 2019.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 8.918: Padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas. Decreto Nº 6.871. Brasília, 2009. Em instrução normativa nº 54, 5 de novembro de 2001.

MATOS, R. A. G. Cerveja: Panorama do Mercado, Produção Artesanal, e Avaliação de Aceitação e Preferência. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MEGA FRANCIELI. A produção da cerveja no brasil. Revista Citino: ciência, tecnologia e oportunidades. [S.L.], v. 1, n.1, out./nov. 2011.

MEGA, J. F; NEVES, E; ANDRADADE, C. J. A produção da cerveja no brasil. Revista Citino Vol. 1. Nº.1, 2011.

NELSON, D, L; COX, M, M. Princípios de bioquímica de Lehningern. Artmed . 7º ed. Cap 14, pág 556. Porto Alegre, 2019.

O'CONNOR-COX, E & MOCHABA, F. M. & LODOLO, ELIZABETH & MAJARA, M & AXCELL, B. (1997). Methylene blue staining: Use at your own risk. *Master Brew Assoc Am Tech Q.* 34. 306-312.

PAIVA, G.H. de S. Análise da viabilidade de leveduras m uma microcervejaria, Universidade federal de Lavras, LAVRAS, 2019.

PALMER, J. How to Brew. Colorado: NatlBook Network 1999.

PALMER, John. How to Brew. Everything You Need to Know to Brew Beer Right the First Time.1. ed. Colorado: NatlBook Network, 2006.

PARANHOS, A. P. O que é cerveja artesanal? 2017. Disponível em: <<http://www.mestre-cervejeiro.com/o-que-e-cerveja-artesanal/>>.

REITENBACH, A. F. desenvolvimento de cerveja funcional com adição de probiótico: *Saccharomyces Boulardii*. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2010.

SACHS, L. G. Cerveja. Fundação Faculdades "Luiz Meneghel" Bandeirantes – PR, 2001.

SANTOS, J.I; DINBAM, R; ADAMES, C. O essencial em cervejas e destilados. 2ª ed. rev. e amp. - São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2013.

SANTOS, M. S. dos; RIBEIRO, F. de M.; Cervejas e refrigerantes. São Paulo : CETESB, 58 p. 2005.

SENAI. Departamento Regional do Estado do Rio de Janeiro. Tecnologia cervejeira/SENAI, agraria, Centro de Tecnologia SENAI alimentos e bebidas. Rio de Janeiro: 2014. 284 p.

SILVA, D. Como fazer a carbonatação da cerveja artesanal, 2015.

SILVA, D. Moagem de malte. 2017. Disponível em: <<http://www.condadodacerveja.com.br/moagem-do-malte/>>. Acesso em: 6 jun. 2019.

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

SINDICERV – Sindicato Nacional da Indústria Cervejeira.

STEIN. W. Lúpulo. 2015. Disponível em: <<http://maltadonaofiltrado.blogspot.com.br/2015/01/lupulo.html>>

SUHRE, T. Controle de qualidade em microcervejarias: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras. 2014. 48 p. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2014.

TSCHOPE, E.C., Microcervejarias e Cervejarias. A História, a Arte e a Tecnologia. São Paulo: Editora Aden, 2001.

VENTURINI FILHO, W. G. Bebidas alcoólicas ciência e tecnologia – volume 1. São Paulo: Blucher, 2010.

VERDE, A, A; CUCOLO, M, C ; EMANUELLI, I, P. Pegada hídrica como indicador de sustentabilidade ambiental na produção de cervejas artesanais: um estudo de caso. Centro Universitário de Maringá- UNICESUMAR, Maringá-PR, 2016.

VIERIA, A. W. Apostila de produção de cervejas artesanais. ACervAPaulista – Associação dos Cervejeiros Artesanais Paulista. 2009.