

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS**  
**COORDENAÇÃO DE ALIMENTOS**  
**CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

**GUILHERME BLANCO HORST**  
**LUCIANE BERNARDO SALLES**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA LEVEDURA**  
***Saccharomyces cerevisiae* (W-34/70) REAPROVEITADA NA**  
**PRODUÇÃO DE CERVEJA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PONTA GROSSA**

**2015**

**GUILHERME BLANCO HORST**  
**LUCIANE BERNARDO SALLES**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA LEVEDURA**  
***Saccharomyces cerevisiae* (W-34/70) REAPROVEITADA NA**  
**PRODUÇÃO DE CERVEJA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, do Departamento Acadêmico de Alimentos – Coordenação de Alimentos, do Curso Superior em Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giovana de Arruda Moura Pietrowski

Co-orientador: Prof. Dr. José Luiz Ferreira da Trindade

**PONTA GROSSA**

**2015**



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*  
(W-34/70) REAPROVEITADA NA PRODUÇÃO DE CERVEJA  
por

GUILHERME BLANCO HORST  
LUCIANE BERNARDO SALLES

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 24 de junho de 2015 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Tecnologia em Alimentos. Os candidatos foram arguidos pela Banca Examinadora composta pelos professores/membros abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giovana Arruda Moura Pietrowski  
Prof<sup>a</sup> Orientadora

---

Prof. Dr. José F. da Trindade  
Prof. Co-orientador e Membro titular

---

Prof<sup>a</sup>. MSc. Simone Bowles  
Membro titular

---

Luciano Moro Tozetto  
Membro titular

## **AGRADECIMENTOS**

Aos nossos pais e familiares pelo apoio concedido todos esses anos e principalmente durante o processo de conclusão do curso.

A professora Dr<sup>a</sup>. Giovana de Arruda Moura Pietrowski, pela orientação, apoio e empenho para que o trabalho fosse realizado. Não nos esqueceremos das palavras confortáveis nos momentos de dificuldade e também, da dedicação ao buscar resultados conosco, mesmo quando às dúvidas não estavam relacionadas à sua área de atuação e pesquisa.

Ao professor Dr. José F. da Trindade, pela sua co-orientação, nos auxiliando a interpretar resultados e possíveis discussões, não somente durante a produção do presente trabalho, mas durante a graduação nas aulas por ele ministradas.

Agradecemos ao Luciano Moro Tozetto e a MSc. Simone Bowles pelo interesse e disponibilidade, bem como pelos ensinamentos cedidos.

A todos os professores de Tecnologia em Alimentos da UTFPR – Câmpus Ponta Grossa, pelo suporte dado durante a graduação.

Não podemos nos esquecer dos alunos que trabalham nos laboratórios da instituição, que nos auxiliaram da melhor forma quando estava ao alcance.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa, mesmo que indiretamente como os demais servidores e terceirizados da instituição. Obrigado!

“A cerveja, se bebida com moderação,  
torna a pessoa mais dócil, alegre o  
espírito e promove a saúde”.

(Thomas Jefferson)

## RESUMO

SALLES, Luciane B.; HORST, Guilherme B. **AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* (W-34/70) REAPROVEITADA NA PRODUÇÃO DE CERVEJA**. 2015. 30 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2015.

A cerveja representa um mercado em constante crescimento no Brasil, principalmente no ramo de cervejas especiais com uma maior variedade de sabores e estilos. Sendo a fermentação realizada pela levedura, um processo muito importante influenciando a característica do produto final, o trabalho objetivou analisar a composição físico-química e o crescimento microbiológico da biomassa durante a fermentação de uma cerveja Pilsen produzida artesanalmente no laboratório da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, com reaproveitamento subsequente da levedura por três fermentações. Após o preparo do mosto da cerveja, foram separados 3 amostras da mesma brassagem para serem submetidas a fermentação, Mosto A, B e C, visando o reaproveitamento subsequente da levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem (W-34/70). Foram realizadas análises microbiológicas por contagem direta em placas, °Brix do mosto durante a fermentação, assim como determinação do teor de etanol do ponto final de fermentação por cromatografia gasosa. Os resultados microbiológicos obtidos foram próximos ao esperado em relação à literatura, com um gráfico expressando um pico de crescimento no meio da fermentação e consequente diminuição da concentração de células próximo do término do processo. No entanto, para os resultados físico-químicos, os valores obtidos indicaram um crescimento na concentração de sólidos solúveis, sendo um resultado insatisfatório para conclusão concisa dos dados. Para o resultado de etanol, observou-se dentre as três fermentações resultados compatíveis com a contagem de levedura. Apesar do Mosto C apresentar maior quantidade de UFC/g, houve menor produção de álcool em relação ao Mosto A e B, indicando uma possível diminuição na vitalidade da levedura durante seu reaproveitamento.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação. Biomassa. Reaproveitamento.

## ABSTRACT

SALLES, Luciane B.; HORST, Guilherme B. **Efficiency Evaluation of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* (W-34/70) Reused in the production of beer.** 2015. 30 pages. Term Paper (Food Science Technology)- Parana Federal Technology University. Ponta Grossa, 2015.

Beer represents a constant growing market in Brazil, mainly in the branch of specialty beers with a greater variety of styles and tastes. Being the fermentation performed by yeast, a very important process in the influence of the final product, this project aimed to analyze the physical-chemical composition and the microbiologic growth of the biomass during the fermentation of a Pilsner beer craft brewed in the Parana Federal Technology University lab, reusing subsequent yeast for 3 fermentations. After the preparation of the beer wort, 3 samples of the same brew were separated to be subjected to fermentation, Wort A, B and C, aiming the subsequent reuse of the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* (W-34/70). Microbiological analyzes were performed by direct plate counting, Brix of the wort during fermentation and the determination of the ethanol content at the end point of fermentation by gas chromatography. The microbiological results were close to expectations in relation to the literature, with a graph expressing a growth peak in the middle of fermentation and consequent reduction of the concentration of cells near the end of the process. However, for the physical-chemical results, the values obtained indicated an increase in the concentration of soluble solids, being an unsatisfactory result for concise conclusion of the data. For the result of ethanol, it was observed within the three fermentation results compatible with the yeast count. Although the Wort C shows higher quantity of CFU/g, a lower alcohol production in relation to the alcohol in Wort A and B, indicating a possible decrease in vitality of yeast for its reuse.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentation. Biomass. Reuse.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
2.1 PRODUÇÃO DA CERVEJA.....	12
2.2 FERMENTAÇÃO .....	14
2.2.1 Peso Seco .....	14
2.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	17
2.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MOSTO FERMENTADO .....	17
2.4.1 Densidade.....	17
2.4.2 Sólidos Solúveis .....	17
2.4.3 Determinação do teor de etanol .....	17
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
3.1 CONTAGEM MICROBIOLÓGICA.....	19
3.2 DENSIDADE .....	21
3.3 SÓLIDOS SOLÚVEIS .....	21
3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETANOL.....	24
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Lei Federal nº 8.918/94 regulamentada pelo Decreto nº 6.871/09, Art. 36, cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (BRASIL, 2009).

Almeida e Silva (2005) definem cerveja como uma bebida carbonatada de teor alcoólico entre 3 e 8% (v/v), preparada a partir de malte de cevada, lúpulo, fermento e água de boa qualidade, sendo facultativo a adição de outras matérias primas como arroz, milho e trigo. Neste sentido, o processo cervejeiro é composto de múltiplos estágios envolvendo a conversão biológica de materiais *in natura* em produto final (CARVALHO *et al.*, 2006).

Entre as mais tradicionais cadeias produtivas do Brasil, o setor cervejeiro vai do agronegócio ao pequeno varejo e está presente em todas as cidades do país. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (ANUÁRIO, 2014), fundada em 2012, projeta que o consumo per capita do mercado brasileiro ainda tem um enorme potencial de crescimento. No entanto, o notável impacto do setor no Brasil é exposto no primeiro anuário do setor cervejeiro de 2014, em que o país ocupa a 24ª posição mundial em 2012, com consumo de 68 litros por pessoa.

No atual mercado brasileiro, são vários os tipos de cerveja encontrados no comércio. No entanto, a cerveja mais consumida no país é a Pilsen, produzida em larga escala em indústrias de grande porte (ARAUJO *et al.* 2003 apud KUCK, L. S. 2008). Para Piccini *et al.* (2002 apud SCHEFFER, R. C. *et al.*, 2013) a variação é decorrente da forma que a matéria-prima é processada, a quantidade de insumo utilizado, a duração das etapas do processamento bem como o processo tecnológico empregado.

Ainda de acordo com Araujo, 2003 (apud KUCK 2008), uma nova tendência se mostra cada vez mais forte no Brasil, dando espaço a um produto mais encorpado, de sabor e aroma pronunciado que são a preferência de consumidores mais exigentes em relação à qualidade sensorial. Sendo assim, a partir do aumento da implantação de microcervejarias no país, ficou mais fácil o acesso a cervejas diferentes do tipo Pilsen (REINOLD, 1997 apud KUCK, L.S. 2008).

Angelino (1991) apud Dragone (2007) aponta que diversos compostos voláteis contribuem com o sabor, e em especial com o odor das cervejas. Sendo que a importância de cada um destes é determinada pela concentração e interação com os demais constituintes, voláteis ou não voláteis, e seu limiar de percepção. Carvalho *et al.* (2007) observou também que além dos compostos durante a fermentação e maturação, que exercem grande impacto, o sabor da cerveja é determinado pela matéria, pelo tipo de processo e pela levedura utilizada.

O processo industrial de cerveja, segundo Aquarone *et al.* (2001), consiste basicamente em três etapas: preparo do mosto (moagem, mosturação, filtração, fervura e clarificação), processo fermentativo e o acabamento de cerveja (filtração, carbonatação, modificações no aroma, sabor e cor). Conforme Venturini (2005), “As características de sabor e aroma de qualquer cerveja estão determinadas, de forma preponderante, pelo tipo de levedura utilizada.”.

Para Carvalho *et al.* (2006), as leveduras são capazes de metabolizar eficientemente os constituintes do mosto, caldo resultante da mistura fervida de malte e água, rico em açúcares fermentáveis. Com a finalidade de produzir uma cerveja com qualidade e estabilidade sensorial satisfatória, esse caldo é filtrado para receber o lúpulo e o fermento ser transformado em álcool e gás carbônico.

Na indústria cervejeira, as linhagens mais utilizadas pertencem a duas espécies do gênero *Saccharomyces*. Segundo Varnan e Sutherland, 1997 (apud WYLER, 2013) essa levedura é capaz de fermentar sacarose, glicose, frutose galactose, manose, maltose e maltotriose, ou seja, grande número de açúcares diferentes. Para Venturini (2005) as mais utilizadas são as do gênero *Saccharomyces cerevisiae* por apresentar alta atividade fermentativa. Neste sentido, Aquarone *et al.* (1983) apresentam que as duas leveduras mais utilizadas em cervejaria são as *S. cerevisiae* e *S. uvarum* (*S. carlsbergensis*), sendo que as cervejas do tipo “Lager” são produzidas por *S. uvarum*, apresentando fermentação profunda (baixa) e as do tipo “Ale” por *S. cerevisiae*, são em sua maioria produzidas por fermentação superficial (alta). Neste contexto, é importante ressaltar que taxonomistas de leveduras têm designado todas as linhagens empregadas na produção de cerveja como pertencentes à espécie *S. cerevisiae* (OLIVEIRA, 2011).

De acordo com Lima *et al.* (2001 apud OLIVEIRA, 2011), a *Saccharomyces* apresenta habilidade de se ajustar metabolicamente em presença ou ausência de

oxigênio, sendo que na presença de oxigênio uma porção do açúcar se transforma em biomassa, gás carbônico e água e, na ausência de oxigênio, ocorre a fermentação alcoólica na qual a maior parte é convertida em etanol e gás carbônico. Com a finalidade de promover o crescimento e o reviramento do fermento, o processo de aerobiose é energeticamente mais eficiente do que o processo anaeróbio, que por sua vez promove a conversão do açúcar em etanol e gás carbônico, ou seja, a transformação do mosto em cerveja.

Conhecida como uma levedura ascomicética gemulante típica, *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada no processo de fermentação para a produção de bebidas alcoólicas. Para Pelczar Jr. *et al.* (2004 apud CARVALHO, B. M *et al.* 2006), cepas desta espécie representam grande importância econômica e têm sido empregadas na cervejaria e padaria a milhares de anos. Hammond (1995 apud RIBEIRO, C. A. F, 1999) destaca como constantes fontes de interesse, a sua produtividade e a eficiência de fermentação, a tolerância ao etanol e à temperatura, a resistência às altas concentrações de açúcares, a habilidade de flocular e de produzir ou não certos componentes do aroma das bebidas e a propriedade de produzir metabólitos anti-contaminantes, caráter “Killer”.

Após o término da fermentação alcoólica em um processo industrial, as leveduras são separadas do produto ou resíduos produzidos, devido obtenção de um volume considerável de resíduo úmido cervejeiro (RUC). De acordo com Santos e Ribeiro (2005), o resíduo úmido pode ser obtido na primeira etapa do preparo do mosto, resultando na obtenção do bagaço de malte na etapa de filtração e também, ao final do processo de fermentação do mosto pela ação das leveduras, encontra-se um rejeito sólido composto pela levedura e matéria prima utilizada. Souza (2004) afirma que além da levedura, o resíduo de cervejaria pode se apresentar nas formas de resíduo úmido, prensado e seco.

Devido à alteração na composição das matérias-primas e também dos efeitos do processamento, os resíduos de cervejaria apresentam grande variação em sua composição nutricional. Sendo assim, por serem produzidos em larga escala e por não apresentarem problemas com a sazonalidade, sendo possível adquirir o produto em qualquer época do ano, o resíduo cervejeiro apresenta destaque no quesito de reaproveitamento trazendo benefícios econômicos e ambientais. Para Giordano (2000), o desenvolvimento dos processos de transformação de alimentos com a evolução do agronegócio e da indústria levou à geração de muitos resíduos, sendo

este um dos principais problemas ambientais do mundo. Ademais, independente do regime político ou sistema econômico, o meio ambiente é uma das preocupações centrais de todas as nações, sendo um dos assuntos que despertam grande interesse em todos os países. Para Blanco e Link (2001 apud ROCHA *et al.*, 2005), as consequências dos danos ambientais ultrapassam fronteiras, atingindo até mesmo regiões diferentes.

Para minimizar a poluição ambiental da indústria, estes resíduos podem ser encaminhados como um novo produto para demais setores. De acordo com a reportagem da Revista Pequenas Empresa, Grandes Negócios (2011 apud SCHEFFER, R. C. *et al.*, 2013), uma destas inovações sustentáveis para reduzir os custos da produção da bebida e ainda cuidar do ambiente, foi a criação de um dispositivo que transforma os resíduos resultantes da fabricação de cerveja em energia. Assim, a partir de resíduos é produzida uma substância chamada de BOB (*Biphase Orbicular Bioreactors*), que funciona como combustível para geração de energia. De acordo do Souza (2004), esses resíduos também podem ser utilizados para alimentação de ruminantes, como concentrado protéico, reduzindo assim custos de alimentação.

Nesse sentido, ao avaliar técnicas como tratamento e purificação como métodos adotados para viabilizar a incorporação de levedura em alimentos e outras preparações alimentares, assim como a eficiência as *Saccharomyces cerevisiae* quando de subsequentes reutilizações em fermentações, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da levedura reaproveitada na produção de cerveja, visando contribuir para o reaproveitamento da biomassa na atividade artesanal de fabricação de cerveja e também, com a diminuição de custos e possíveis impactos ambientais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados insumos adquiridos na microcervejaria BodeBrown e as análises descritas, bem como a produção da cerveja foram realizadas nos laboratórios de: Vegetais, Microbiologia, Métodos Instrumentais e Carnes, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa.

### 2.1 PRODUÇÃO DA CERVEJA

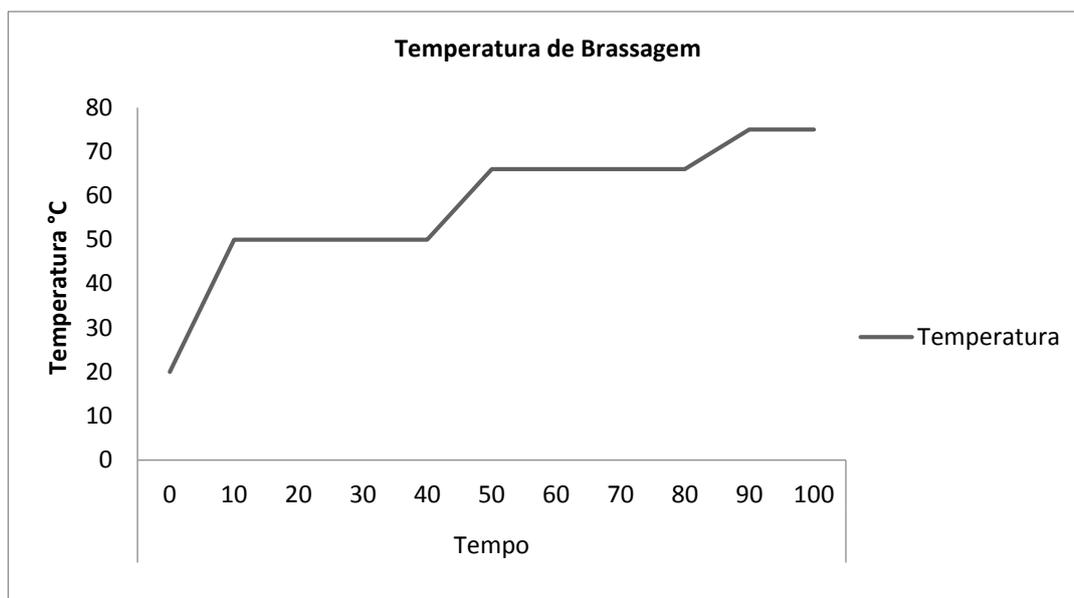
Inicialmente foram sanitizados com álcool 70° GL os seguintes materiais: recipiente em aço inox com capacidade total para 30L contendo filtro bazuca, recipiente em aço inox com capacidade de 50L para fervura do mosto, galão plástico com capacidade de 20L destinado para fermentação e 2 galões plásticos com capacidade de 5L para as duas fermentações de reutilização do fermento.

A primeira etapa para produção da cerveja foi a moagem seca do grão Pilsen Agrária (Agromalte) com Moedor de disco GUZZO-funil longo. Os grãos foram moídos de tal forma a não permitir a formação de farelos e nem a passagem de grãos inteiros, sendo o ideal, grãos apenas quebrados (AQUARONE, *et. al* 1983).

Com objetivo de promover a gomificação e posterior hidrólise do amido e açúcares, realizou-se a mosturação, que compreende na mistura do malte moído com água e, caso necessário, a adição de complemento (AQUARONE *et al.* 1983). Para isso, foram adicionados 15 L de água do poço artesiano localizado na própria Universidade, na proporção 3L/Kg de malte e aquecidos até 55°C em recipiente de aço inox. Os grãos moídos (5 kg) foram adicionados na panela para cozimento dos grãos onde foram aplicados algumas faixas de temperatura para que as enzimas presentes pudessem fazer as transformações de amido para açúcares simples e também para que algumas proteínas do mosto fossem solubilizadas.

Para solubilizar a maior quantidade possível de matérias hidrossolúveis do malte e dos adjuntos de fabricação empregados, foi realizado a brassagem. Sendo assim, iniciou-se a brassagem (cozimento) em fogão industrial com boca de alta pressão, aplicando a primeira rampa de temperatura com um repouso térmico de

50°C por 30 minutos conforme demonstra o Gráfico 01. Após esse tratamento a temperatura foi elevada até 66°C e mantida por um tempo de 30 min. Finalmente, a última aplicação de calor, com uma temperatura de 75°C por 10 min foi realizada (VICENTE *et al.* 1996).



**Gráfico 01 – Temperatura utilizada durante a Brassagem**

**Fonte: autoria própria (2015)**

Com adaptações à metodologia descrita por Herrero (2006 apud SILVA *et al.*, 2009), afim de clarificar o mosto para eliminar as impurezas, utilizou-se da mesma panela de brassagem para fazer a recirculação do mesmo. Com o auxílio de uma jarra de graduação de 1 L foi recirculado um total de 5 L de mosto, para posterior filtração da cerveja. Concluído a clarificação, iniciou-se o processo de filtração transferindo o mosto já cozido para uma panela de aço inox. Os grãos foram separados do líquido utilizando o Filtro Bazuca. Simultaneamente com a filtração, foram adicionados 15 L de água para lavagem dos grãos sendo então iniciado o processo de fervura.

No presente estudo foi escolhido o lúpulo modelo FUGGLE em pellet, sendo que na produção em questão a inclusão dos lúpulos foi dividida em três momentos distintos com a quantidade de 15 g por vez. A primeira adição aconteceu no começo do processo de fervura (0 min) o segundo após 10 min do início e o último com 60min de fervura, deixando assim, mais 20 min restantes para cessar esse processo, totalizando 80 min totais de fervura (ALMEIDA E SILVA, 2005).

Após o processo de ebulição, foi realizado o resfriamento de 20 L do mosto com o auxílio de um Chiller (serpentina de cobre), a fim de abaixar a temperatura deste até 20°C. Resfriado, o mosto foi dividido em três amostras, a primeira com 16 L (Mosto A), foi encaminhada diretamente para a fermentação. As outras duas amostras com 2 L cada (Mosto B e C), acondicionadas em um recipiente de vidro previamente esterilizado, foram armazenadas no freezer do laboratório de Microbiologia até o momento da fermentação, sendo que as reinoculações destes aconteceram em dias distintos e, para o descongelamento, as mesmas foram retiradas do freezer e mantidas em temperatura ambiente até a estabilização a 20°C.

## 2.2 FERMENTAÇÃO

Para a inoculação do Mosto A foi adicionado 11,5 g de levedura liofilizada, FERMENTIS SAFLAGER W-34/70 (baixa fermentação) aos 16 L do mosto preparado, que foi enviado imediatamente para uma geladeira com temperatura controlada por termostato para início da fermentação.

Após a primeira fermentação, retirou-se o mosto fermentado do fermentador por sifonação. O volume restante do fundo do fermentador, a pasta de levedura, foi acondicionado em um frasco de 1 L, previamente esterilizado, e submetido à refrigeração (08 a 10°C) por aproximadamente 24 horas.

Para realizar a reinoculação dos Mostos B e C, agora com a levedura em pasta e com menos mosto cervejeiro, calculou-se a proporção em relação ao peso inicial da levedura liofilizada. Foi realizado o cálculo de peso seco da pasta de levedura e verificou-se que 1,44 g de biomassa deveria ser reinoculada, ou seja, aproximadamente 4 mL.

### 2.2.1 Peso Seco da pasta de levedura

O peso seco da pasta de levedura foi determinado por desidratação em estufa convencional a 70°C até peso constante. Desta forma, a biomassa da do Mosto A foi centrifugada e lavada com água destilada por três vezes antes de sofrer

dessecação. O resultado obtido foi de 1,44g (correspondendo a 3,7mL) de levedura em pasta a ser reinoculada em 2 L de mosto.

A fermentação da cerveja ocorreu conforme fluxograma apresentado na Figura 1, onde os mostos A, B e C seguiram os mesmos parâmetros de fermentação. A fermentação teve seu início com temperatura aproximada de 10°C durante 72 horas e então a temperatura foi elevada a 15°C e mantida até o final da fermentação, totalizando nove dias completos de processo.

Aproximadamente 50 mL do fermentado foram retirados a cada 48 horas (tubo Falcon), durante cinco dias (0, 48, 96, 144 e 192 horas). A cada coleta, para que houvesse uma dispersão da pasta de levedura (biomassa) pelo ambiente fermentativo, o fermentador foi homogeneizado, propiciando uma amostra mais representativa do todo. Este procedimento foi realizado para todas as fermentações.

Paralelamente ao processo produtivo, os tubos coletados eram encaminhados para o laboratório de microbiologia para análise microbiológica e armazenados sob congelamento para posterior análise físico-química.

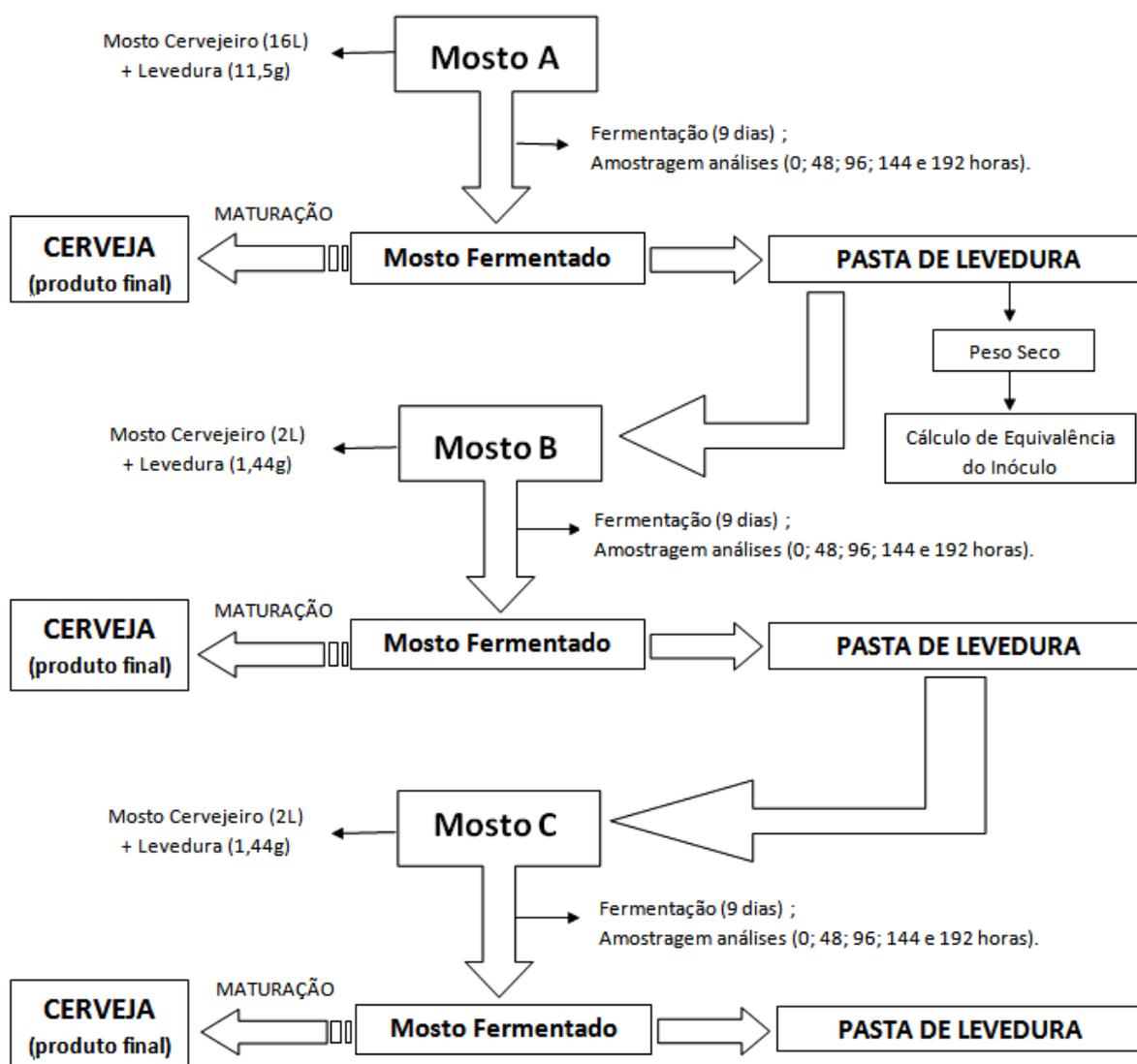


Figura 01 – Fluxograma das fermentações

Fonte: autoria própria (2015)

## 2.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As contagens microbiológicas, para as três fermentações (Mosto A, B e C), foram realizadas em intervalos de 48h. Foram preparadas seriadas a partir de 1 mL das amostras, para submetê-las a metodologia de Contagem Direta em Placas, com Semeadura em Superfície com Alça de Drigalski, utilizando o meio de cultura YMA "Yeast Malt Agar" (SILVA *et al*, 2010).

## 2.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MOSTO FERMENTADO

### 2.4.1 Densidade

As análises de densidade foram realizadas segundo metodologia descrita por Adolfo Lutz – Densidade relativa a 20°C/20°C com picnômetro (IAL, 2008, p. 411).

### 2.4.2 Sólidos Solúveis

Os meios foram submetidos à análise de °Brix em refratômetro de bancada, determinando assim os açúcares totais e demais substâncias solúveis no mosto.

### 2.4.3 Determinação do teor de etanol

A determinação do teor de etanol foi realizada por cromatografia gasosa nas amostras do ponto final de fermentação dos mostos A, B e C.

#### 2.4.3.1 Preparo das amostras para coleta do headspace

As amostras do mosto fermentado foram colocadas em frascos com capacidade de 20 mL, na quantidade de 6mL, onde foram colocados 100 µL de

padrão interno (Hexanol, Merck) e 1 g de sulfato de sódio anidro. Os frascos foram fechados com tampa de silicone e lacre de alumínio. Antes da coleta dos compostos voláteis, as amostras permaneceram a 60°C sob agitação no forno do injetor automático (cromatógrafo gasoso Young Lin Instrument) durante 10 minutos.

#### 2.4.3.2 Análise cromatográfica de compostos voláteis

A análise do etanol foi realizada em cromatógrafo gasoso Young Lin Instrument- YL 6100 GC, equipado com detector de ionização de chama - FID, coluna capilar (Phenomenex) de 30 m de comprimento, com diâmetro interno de 25 mm e filme de ZB-WAX com 0,25 µm de espessura. A temperatura do injetor foi de 200°C, do detector de 230°C e o gás de arraste foi o nitrogênio a um fluxo de 2 mL.min<sup>-1</sup>. A técnica de injeção foi split 1:1,2 e foi utilizado o modo de injeção automática do CG, com volume de 1000µL. As condições de análise foram com programação de temperatura inicial a 40°C por 2 minutos, elevação de 10°C.min<sup>-1</sup> até 230°C, permanecendo nesta temperatura por 5 min.

O etanol foi identificado comparando o tempo de retenção com o obtido na solução de referência. Para a quantificação do etanol foi utilizada a equação 1.

$$C = \frac{A \cdot h \cdot I}{H \cdot i} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

**C** = concentração do componente (mg.L<sup>-1</sup>)

**A** = concentração da substância na solução de referência (mg.L<sup>-1</sup>)

**h** = área do pico da substância na amostra

**H** = área do pico da substância na referência

**I** = área do pico do padrão interno na referência

**i** = área do pico do padrão interno na amostra.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas três fermentações com reaproveitamento da biomassa, efetuadas com a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* (W-34/70) foram organizados, descritos e discutidos conforme os parâmetros analisados.

#### 3.1 CONTAGEM MICROBIOLÓGICA

As análises microbiológicas demonstraram nas três fermentações aumento do número de células, caracterizando a fase de crescimento exponencial, que chega a um ponto máximo de desenvolvimento e diminui próximo ao final das fermentações.

O Gráfico 02 indica as leituras do crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* em UFC/g do Mosto A, B e C, no qual é possível observar que a curva de crescimento foi semelhante nas três fermentações, exceto na transição entre as análises realizadas no momento 144 e 192 horas da primeira fermentação (Mosto A), onde houve aumento de  $1,87 \times 10^6$  UFC/g para  $3,5 \times 10^6$  UFC/g configurando um possível erro de amostragem ou das técnicas da Contagem Direta em Placas.

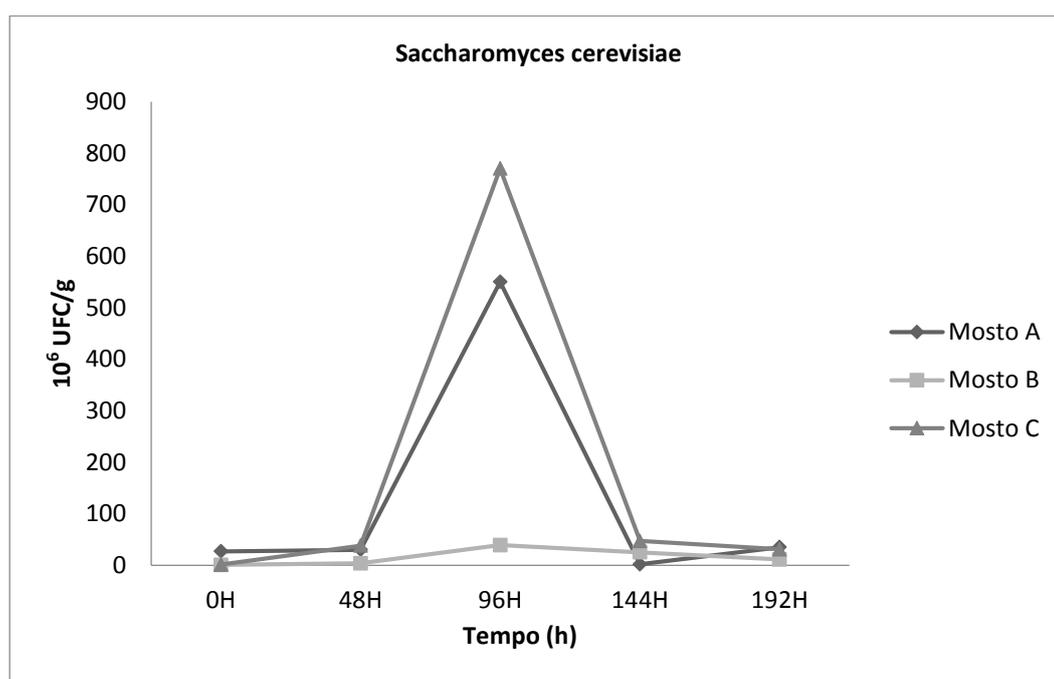


Gráfico 02 – Contagem de levedura em  $10^6$  UFC/g das três fermentações (Mosto A, B e C)

Fonte: Autoria própria (2015)

Na segunda fermentação, Mosto B, houve uma contagem muito baixa de UFC/g em todos os horários. Comparando os valores com as outras duas fermentações realizadas, nota-se que os resultados obtidos ficaram abaixo da leitura mínima dos demais mostos. Essa diminuição de UFC/g do Mosto B pode ser reflexo de possíveis interferências externas (tratamento biomassa) ou devido o cálculo de equivalência do inóculo. O cálculo realizado (peso seco) pode não ter relação direta com a quantidade de levedura utilizada na primeira fermentação (Mosto A), uma vez que não é possível afirmar que todas as células presentes na biomassa estavam viáveis, levando em consideração que o peso obtido contabilizava células que possivelmente estariam inativas. Ademais, o Mosto A foi fermentado com levedura liofilizada, sendo este o mosto controle.

De acordo com Lima (2004) apud Pacheco (2010), os micro-organismos reciclados não necessitam consumir substrato para a fase de crescimento e já estão aptas ao meio, sendo que após o término da fermentação alcoólica, a fim de evitar contaminações, as leveduras devem ser separadas do produto e ou resíduo produzido. No presente trabalho, a biomassa no final da primeira fermentação (Mosto A) foi submetida a condições diferentes que a mesma se encontrava até o último horário do mosto fermentado, pois após separação por sifonação, a pasta úmida foi acondicionada e armazenada sob refrigeração (08 a 10°C). Ou seja, ao promover a queda forçada na temperatura e também escassez de nutrientes, que até então era proporcionado pelo mosto da cerveja, compreende-se que a viabilidade de células presentes na borra podem ter sido comprometidas, justificando a baixa contagem e desempenho das leveduras na segunda fermentação, pois ao ser reinoculadas, iniciaram novamente uma fase de adaptação.

As leveduras sofrem vários tipos de estresse durante a fermentação. Bai e Moo-Young (2008 apud PACHECO, 2010) afirmam que a consequente inibição do crescimento celular e produção de etanol pode ser em resposta ao meio, como deficiência nutricional, alta temperatura e contaminação e também, pelo próprio metabolismo da levedura.

Os resultados para a terceira fermentação, Mosto C, gráfico 2, evidenciam o grande crescimento da concentração de leveduras, registrando a mais alta entre as demais fermentações. Sugere-se que a partir do início da fermentação do Mosto B, a levedura entrou em processo de adaptação do meio, e não foi submetida a condições diferentes quando foi inoculada no Mosto C, onde já estava adaptada,

podendo atingir contagens maiores, justificando uma alta contagem para o Mosto C. Além disso, no Mosto A, onde obteve o segundo maior crescimento, as cepas utilizadas para inoculação, estavam liofilizadas. Portanto, é preciso considerar que muitas cepas liofilizadas nem sempre conseguem re-idratar-se de maneira adequada após o processo de liofilização, mantendo-se inviáveis.

Com o cálculo de peso-seco realizado após a primeira fermentação, a quantidade calculada proporcionalmente, pode ter apresentado diferenças entre biomassa liofilizada e a pasta de leveduras, justificando as diferenças encontradas nas contagens dos Mostos A, B e C.

O gráfico do crescimento das leveduras não gerou informações muito precisas em relação à fase estacionária da população dos micro-organismos. Tal problema pode ser compreendido, devido à periodicidade estabelecida para as amostragens, que não permitiram verificar após atingir a população máxima por quanto tempo esta população se manteve antes de entrar em declínio ou morte. Num próximo experimento acredita-se ser necessário estabelecer mais pontos de amostragens entre 48h e 144h.

### 3.2 DENSIDADE

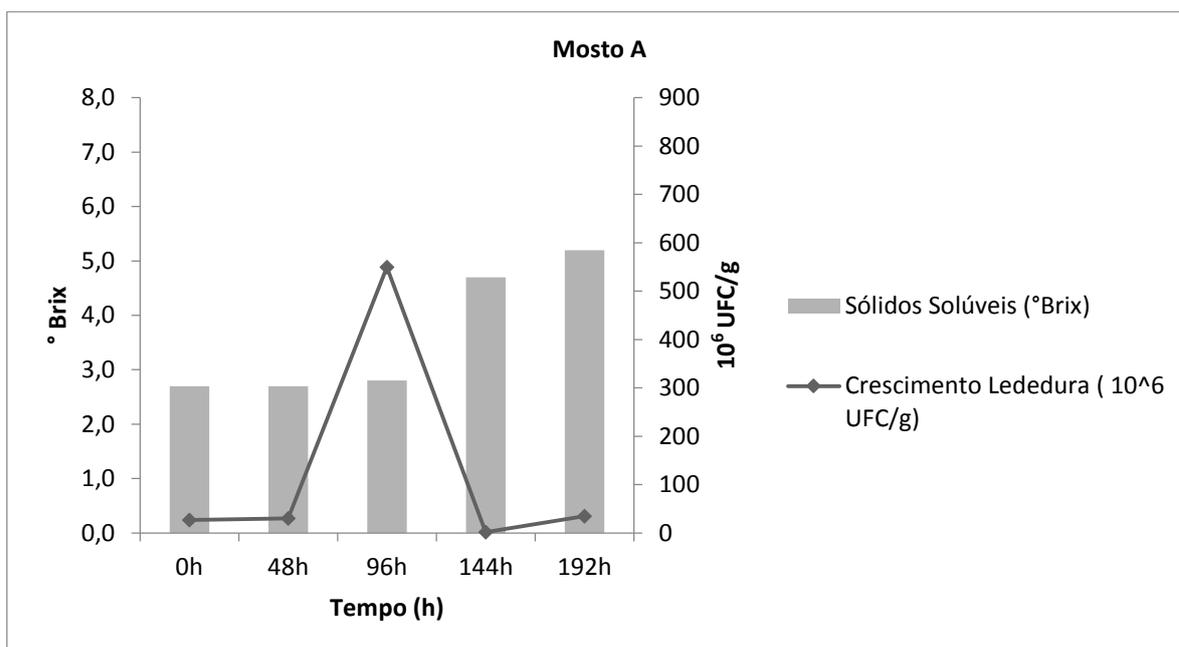
As análises de densidade foram realizadas segundo metodologia descrita por Adolfo Lutz – Densidade relativa a 20°C/20°C com picnômetro (IAL, 2008, p. 411). No entanto, os resultados obtidos podem ter sofrido influências externas. Por acreditar que a falta de precisão da balança e do picnômetro, pode ter mascarado os resultados, optou-se em não apresentá-los e discutí-los neste momento. Indicamos num próximo experimento realizar densidade a partir de metodologias mais confiáveis e indicadas para a amostra em questão.

### 3.3 SÓLIDOS SOLÚVEIS

Os gráficos 03, 04 e 05 apresentam os resultados dos sólidos solúveis em °Brix e o crescimento microbiológico de cada fermentação, respectivamente.

Em contradição com a literatura (LIMA *et al.*, 2001 apud OLIVEIRA, 2011), durante a primeira fermentação observou-se aumento dos sólidos solúveis. É

possível observar no Gráfico 03 que durante os três primeiros horários, os sólidos mantiveram resultados constantes, sendo que após o pico de crescimento de levedura (96h) e posterior queda devido à atividade metabólica da *Saccharomyces cerevisiae*, a quantidade de sólidos aumentou, podendo sugerir que os microorganismos pudessem ter quebrado moléculas de açúcares para utilização, ou talvez produzido outros compostos que contaram como sólidos solúveis.



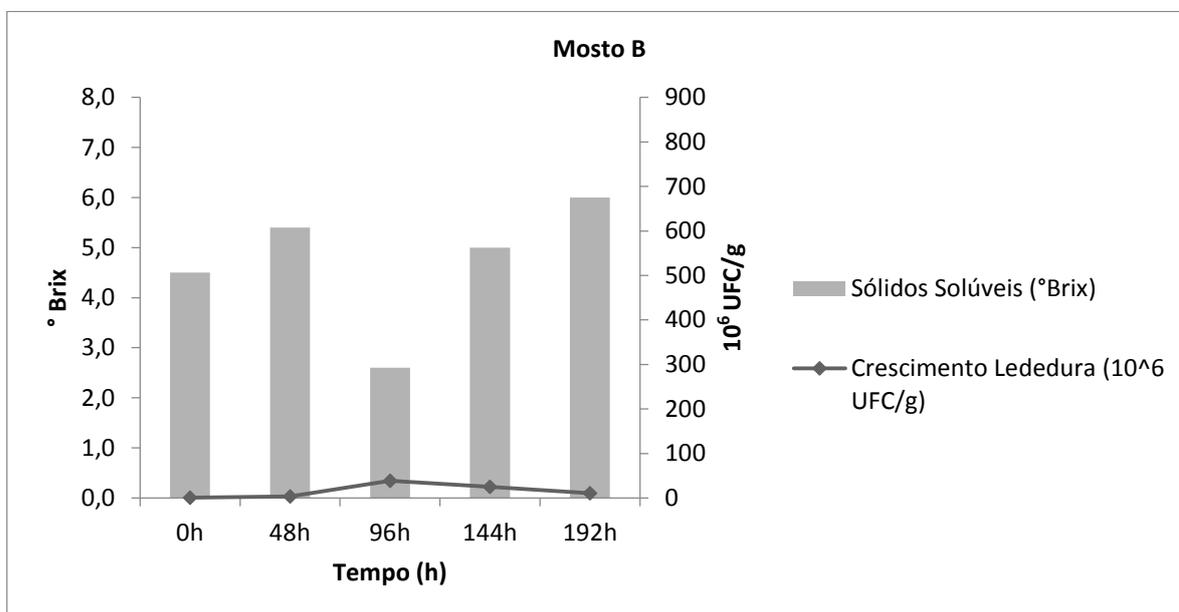
**Gráfico 03 – Resultado comparativo do crescimento da levedura ( $10^6$  UFC/g) e sólido solúveis durante a primeira fermentação (Mosto A).**

**Fonte: Autoria própria (2015)**

Os resultados obtidos na segunda fermentação, Mosto B, também indicam aumento de sólidos solúveis. No entanto, diferente da primeira fermentação, esta apresentou valores altos de sólidos desde o início da fermentação. No pico de crescimento da levedura (96h) houve queda de sólidos solúveis, sendo que nos dois últimos horários (144 e 192h), os valores de °Brix retomam suas posições, indicando uma quantidade de sólidos muito próximos do valor inicial.

Após a multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio na pré-fermentação, segundo Antonini (2004), entre cinco e seis horas, com pouca espuma, inicia-se a fermentação principal. Essa é reconhecida pela elevação rápida da temperatura e queda da densidade do mosto por causa do desaparecimento dos açúcares e da formação equivalente do álcool. No entanto,

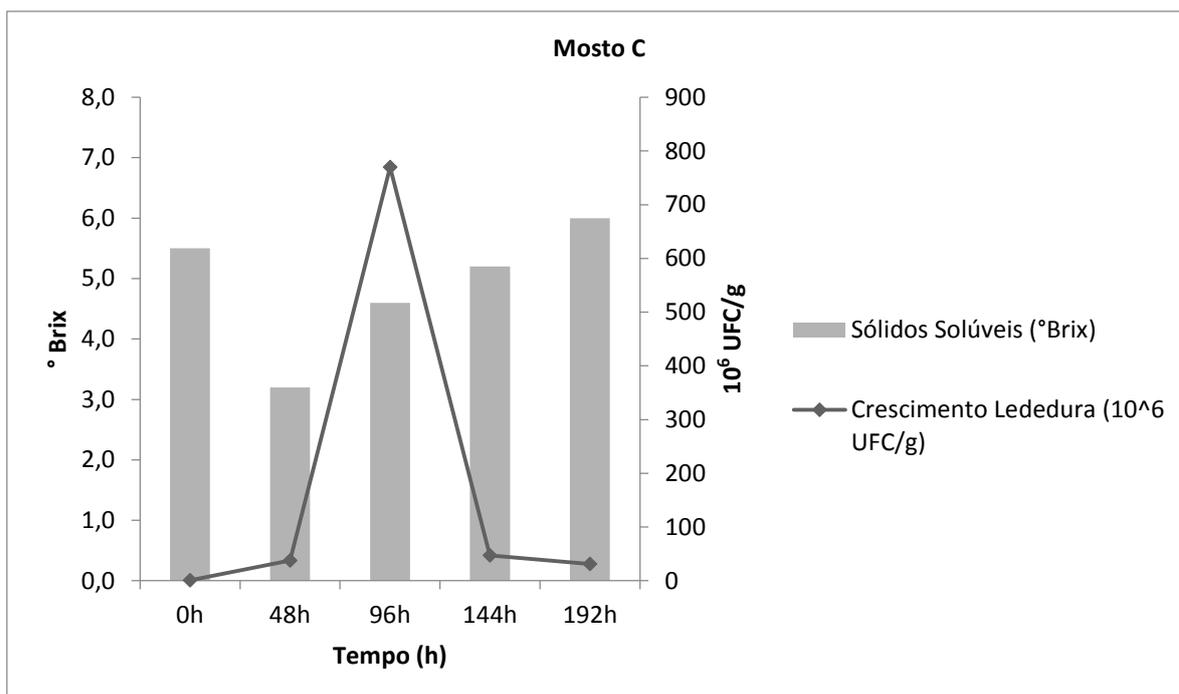
como pode ser analisado no Gráfico 04, não houve queda dos sólidos mesmo com o crescimento e demais atividades da levedura em tempo gradual.



**Gráfico 04 – Resultado comparativo do crescimento da levedura (10<sup>6</sup> UFC/g) e sólido solúveis durante a segunda fermentação (Mosto B).**

**Fonte: Autoria própria (2015)**

Para a terceira fermentação, como demonstra o Gráfico 5, dá-se início a fermentação com valor de 5,5 °Brix, havendo em seguida uma diminuição para 3,2 °Brix. Ao contrário dos outros processos fermentativos, este, apresenta uma queda no segundo momento, 48 horas, mas em sequência volta a apresentar valores mais altos do que indica a literatura, comparando-os com a atividade fermentativa dos respectivos horários. A partir deste horário, os resultados apresentaram um crescimento para os valores de sólidos solúveis como pode ser visualizado no Gráfico 05, contrariando os resultados esperados.



**Gráfico 05 – Resultado comparativo do crescimento da levedura (10<sup>6</sup> UFC/g) e sólido solúveis durante a terceira fermentação (Mosto C).**

**Fonte: Autoria própria (2015)**

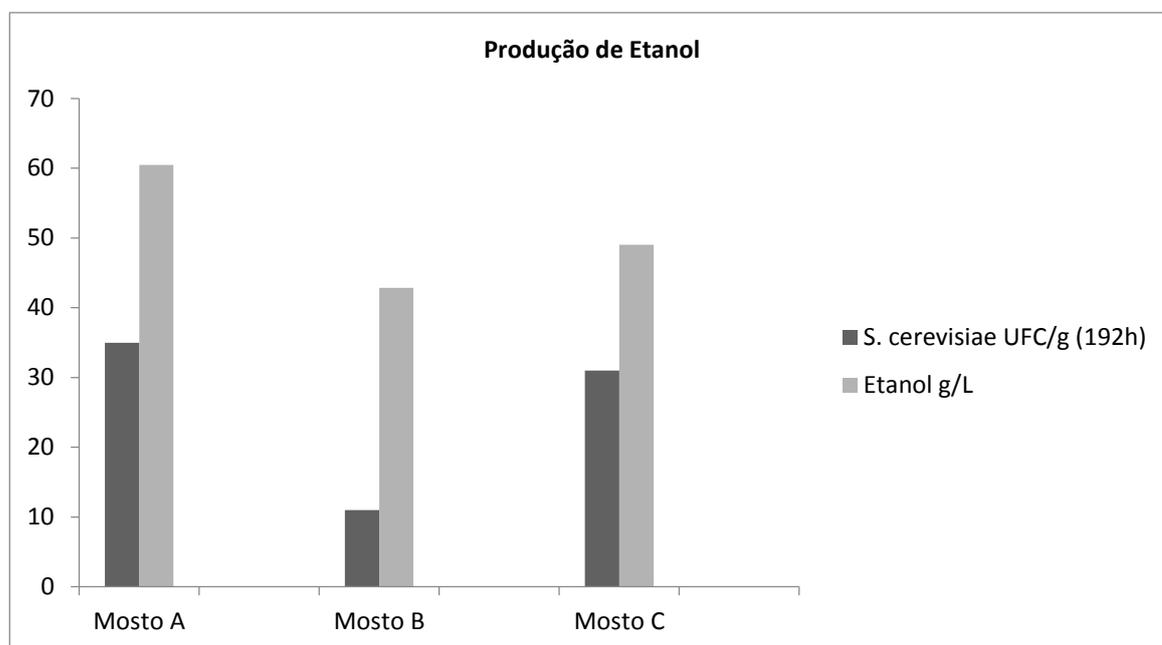
### 3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETANOL

Um dos metabólitos mais excretados pela levedura durante a fermentação é o etanol, sendo este passível de se tornar substrato em aerobiose e também, ocasionar a queda na viabilidade da levedura por se mostrar tóxico (KOTIAHO *et al.*, 1995 apud SANTOS, 2005).

Os níveis de produção de etanol aqui apresentados referem-se ao total obtido no último horário (192h) de cada fermentação - Mosto A, B e C. A análise do Gráfico 06 revela que a produção de etanol no Mosto A foi superior quando comparado aos demais. No Mosto B, onde teve menor quantidade de leveduras houve menor teor alcoólico.

De acordo com dados da pesquisa realizada por Santos (2005), a fermentação do projeto desenvolvido pelo autor foi interrompida com 80% de consumo de açúcares fermentáveis e os níveis de etanol atingiram em média 30g/L. Guido *et al.* (2004 apud SANTOS, 2005) apontam que níveis acima de 45g/L em pleno processo fermentativo, como confirmado em trabalho feito pelo autor, podem impedir o crescimento e a multiplicação da levedura no processo cervejeiro,

considerando que a maioria das linhagens de levedura usadas na cervejaria, como confirmado por Watier (1990 apud SANTOS, 2005), tem somente tolerância moderada ao etanol.



**Gráfico 06 – Resultado comparativo do crescimento da levedura ( $10^6$  UFC/g) e produção de etanol (g/L) durante o último horário das três fermentações (Mosto A, B e C).**

**Fonte: Autoria própria (2015)**

Observa-se que a formação de álcool se apresentou proporcional ao número de *Saccharomyces cerevisiae* em atividade nas três fermentações. A diminuição do teor alcoólico do Mosto C, apesar de apresentar maiores quantidades de levedura em relação à fermentação anterior, pode indicar uma possível diminuição da vitalidade desses micro-organismos. Para Jeffries, 2005 (apud SANTOS, 2005), a produção eficiente de etanol por micro-organismos está diretamente relacionada com sua carga genética.

#### 4 CONCLUSÃO

Visando contribuir para o reaproveitamento da biomassa na atividade artesanal de fabricação de cerveja e também para diminuição de custos e impactos ambientais, o presente projeto mostrou a possibilidade de produzir cerveja a partir da subsequente utilização da biomassa das fermentações antecedentes.

No entanto, a pesquisa em questão apresentou resultados contraditórios em relação aos dados encontrados na literatura, mostrando um aumento de sólidos solúveis, evidenciando a necessidade de realizar análises específicas de açúcares totais e redutores, que poderiam elucidar o que ocorreu nas fermentações. Entretanto, os resultados de teor de etanol deixaram claro que o reaproveitamento da biomassa pode ser realizado, pois houve produção de álcool com as subsequentes reutilizações da biomassa, embora o teor alcoólico tenha sofrido variações de acordo com a quantidade e a fase da biomassa do mosto no momento analisado.

Os resultados evidenciaram também a necessidade de unificar a forma de inoculação das leveduras em todos os experimentos, padronizando o inóculo com contagens de leveduras viáveis por Câmara de Neubauer.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA E SILVA, JB. **Cerveja**. In: Venturini Filho, G. W. Tecnologia de Bebidas. Edgar Blucher, Brasil, 2005, p.347-380.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de Destilaria**. In: Curso de treinamento ministrado a unidades pertencentes à Usina de Açúcar Santa Teresinha, Iguatemi, 2004. p.33.

ANUÁRIO SETOR CERVEJEIRO. **Associação Brasileira da Indústria da Cerveja: CervBrasil**. 2014. Disponível em: <<http://cervbrasil.org.br/wp-content/themes/cerv/pdf/anuariofinal2014.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotecnologia Industrial**. v. 4. São Paulo: Blucher, 2001.

AQUARONE, E.; LIMA, U. .A.; BORZANI, W. **Biotecnologia: alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher. v.5, 1983, 243p.

BRASIL. Decreto nº 6.871/09, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei nº 8.918/94, de 14 de julho de 1994. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 jun. 2009. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm) >. Acesso em: 27 abr. 2015.

CARVALHO, B.M.; BENTO, C.V.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª. Parte- As leveduras. **Revista Analytica**, v. 25, p.36 - 42, 2006.

CARVALHO, G.B.M., ROSSI, A.A., ALMEIDA e SILVA, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2ª. parte, A fermentação. **Revista Analytica**, v.26, p.46 - 54, 2007.

DRAGONE, G. M. **Fermentação primária para produção de cervejas de altas densidades por processo contínuo utilizando leveduras imobilizadas em bagaço de malte**. 2007. 140f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007. Disponível em: <[http://bd.eel.usp.br/tde\\_arquivos/2/TDE-2002-01-24T181850Z-80/Publico/BIT07008.pdf](http://bd.eel.usp.br/tde_arquivos/2/TDE-2002-01-24T181850Z-80/Publico/BIT07008.pdf)>. Acesso em: 09 dez. 2014.

GIORDANO, S. R. Gestão Ambiental no Sistema Agroindustrial. In: zylbersztajn, D.; neves, M. F. **Economia e Gestão dos Negócios Agroalimentares**: indústria de alimentos, indústria de insumos, produção agropecuária, distribuição. 1. ed. São Paulo, 2000. p. 255-281.

KUCK, L. S. **Cerveja: sabor e aroma**. 2008. 46f. Trabalho acadêmico - Graduação em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008. Disponível em:  
<[https://quimicadealimentos.files.wordpress.com/2009/08/cerveja\\_sabor\\_e\\_aroma.pdf](https://quimicadealimentos.files.wordpress.com/2009/08/cerveja_sabor_e_aroma.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2015.

LUTZ, I. A. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1. ed. digital. São Paulo, 2008. p 1020. Disponível em:  
<[http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf)>. Acesso em: 27 jan. 2015.

OLIVEIRA, A. M. de. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja**. 2011. 45 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Ambiental e Industrial) - Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2011. Disponível em:  
<<http://microbiologia.icb.ufmg.br/monografias/195.PDF>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 106f. Dissertação (mestrado) – Programa de pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2010. Disponível em:  
<[http://www.btdt.ufu.br/tde\\_arquivos/12/TDE-2010-04-12T170946Z-1890/Publico/thalita.pdf](http://www.btdt.ufu.br/tde_arquivos/12/TDE-2010-04-12T170946Z-1890/Publico/thalita.pdf)>. Acesso em: 25 mar. 2015.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 255-263, 1999. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90161999000200001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161999000200001)>. Acesso em: 09 dez. 2014.

ROCHA, E. C.; CANTO, J. L. do C.; PEREIRA, P. C. Avaliação de Impactos Ambientais nos Países do Mercosul. *Ambiente & Sociedade*, v. 8, n. 2, p. 147-160, 2005.

SANTOS, I. J. dos. **Cinética de fermentações e estudo de metabólitos e enzimas intracelulares envolvidas na fermentação alcoólica cervejeira conduzidas com leveduras de alta e baixa fermentação em diferentes composições de mosto.** 2005. 121f. Tese (Doutorado) –Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2005.

Disponível em:

<<http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/ciencia%20e%20tecnologia%20de%20alimentos/2005/188859f.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2015.

SANTOS, M. S. dos; RIBEIRO, F. de M. **Cervejas e Refrigerantes.** São Paulo: CETESB, 2005. Disponível em:

<[http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas\\_refrigerantes.pdf](http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf)>. Acesso em: 27 mar. 2015.

SCHEFFER, R. C; DIAS, E. N; LEMES, B. K; LEMOS, A. J. **Processo produtivo da cerveja tipo Pilsen.** In: VII ENCONTRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO AGROINDUSTRIAL, nov. 2013, Campo Mourão. Disponível em:

<[http://www.fecilcam.br/anais/vii\\_eepa/data/uploads/artigos/12-03.pdf](http://www.fecilcam.br/anais/vii_eepa/data/uploads/artigos/12-03.pdf)>. Acesso em: 08 abr. 2015.

SILVA, A. E. da; COLPO, E.; OLIVEIRA, V. R. do; HERBST JUNIOR, C. G.; HECKTHEUER, L. H. R.; REICHERT, F. S. **Elaboração de cervejas com diferentes teores alcoólicos através de processo artesanal.** Alim. Nutr., Araraquara. v.20, n.3, p. 369-374, jul./set. 2009. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/1129/832>>. Acesso em:

03 mar. 2015.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos, GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** n.4, São Paulo: Livraria Varela, 614p, 2010.

SOUZA, A. A; **Resíduos de cervejaria na nutrição de bovinos de corte.** 2004.

Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/nutricao/residuos-de-cervejaria-na-nutricao-de-bovinos-de-corte-18728/>>. Acessado em 28 mar. 2015.

VENTURINI, W. G. **Cerveja.** In: Tecnologia de Bebidas. 1.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. 550p.

VICENTE, A. M.; CENZANO, I.; VICENTE, J. M. **Manual de indústrias dos alimentos.** São Paulo: Varela, 1996. 599p.

WYLER, Patricia. **Influência da madeira de carvalho na qualidade da cerveja.** 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Ciências em Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura (Luiz de Queiroz), 2013. Disponível em: <[http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/LTQB/sites/default/files/publicacao/Patricia\\_Wyler\\_versao\\_revisada.pdf](http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/LTQB/sites/default/files/publicacao/Patricia_Wyler_versao_revisada.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2015.