

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

GILMAR CAMARGO

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE BAIXO CUSTO PARA
CONSERVAÇÃO DE LEVEDURAS CERVEJEIRAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2017

GILMAR CAMARGO

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE BAIXO CUSTO PARA
CONSERVAÇÃO DE LEVEDURAS CERVEJEIRAS**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo B. Sydney

TOLEDO
2017

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

GILMAR CAMARGO

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE BAIXO CUSTO PARA CONSERVAÇÃO DE
LEVEDURAS CERVEJEIRAS**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, *Campus* Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo. Observação: a Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

Prof Dr Eduardo Bittencourt Sydney

Prof^a Dr^a Alessandra Cristine Novak Sydney

Ms Cervejeiro Fábio Gabriel da Silva

Toledo, maio de 2017

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais João e Geni Camargo por estarem me ajudando em todos os sentidos e me incentivando a cada dia que se passava te chegar na presente data.

Ao meu irmão Cleiton Camargo por me ajudar e incentivar nesta jornada acadêmica.

Aos meus avós Pedro Camargo, Ernesto Braus e Romilda Maria Braun (em memória) por estarem presentes em todos os momentos de minha vida, incluindo a jornada acadêmica.

Ao meu Orientador Prof Dr Eduardo Bittencourt Sydney por me auxiliar neste trabalho, pelo tempo gasto fora de seu horário de trabalho e pela amizade que veio desde sua chegada ao campus.

Ao Fábio Gabriel da Silva pelo incentivo ao trabalho e por seus conhecimentos.

Aos técnicos de laboratório Rafael, Bruna, Caroline e Danielle pelos momentos de descontração.

Para Isabella e Caroline Dall O'glio por auxiliarem e incentivarem em todos os momentos.

RESUMO

A levedura é um ingrediente fundamental para a produção de cerveja e o seu reaproveitamento dentro da indústria cervejeira é de extrema importância. O objetivo presente trabalho foi desenvolver e avaliar um método viável e de baixo custo para o reaproveitamento e manutenção das cepas. O estudo foi realizado utilizando cepas da fabricante Fermetis onde cervejas foram produzidas em escala piloto, visando imitar o processo industrial para posteriormente reaproveitar as leveduras da pós-fermentação. As leveduras foram lavadas e isoladas em uma fase em que continha somente leveduras vivas e saudáveis. As mesmas foram armazenadas em temperaturas de geladeira, cerca 2 a 4°C e outra parte foi congelada com uma solução crioprotetora de glicerol e ácido ascórbico em uma temperatura de -20°C. As cepas preservadas em geladeira partiram de uma viabilidade entre 86 e 91% e depois de seis meses a viabilidade baixou para cerca de 60 a 65% com a exceção da levedura US-05 que resistiu melhor às condições de frio, mantendo sua viabilidade em 76,5% para o presente estudo. O congelamento por sua vez, não mostrou-se muito eficiente, pois a maioria das leveduras não resistiu às condições severas. O motivo por trás disso é que a levedura foi adicionada ao glicerol em sua fase estacionária e o álcool presente na solução acabou se transformando em um agente criossensibilizador levando a baixa eficiência do método proposto. Desta forma, baseado nos resultados deste experimento, os cervejeiros e microcervejarias poderão fazer o reaproveitamento e manutenção de duas leveduras com um método simples, resultando em uma importante economia na indústria cervejeira.

Palavras-chave: Leveduras; Manutenção de cepas; Congelamento; Cerveja.

ABSTRACT

Yeast is a key ingredient for brewing and its reuse within the brewing industry is of extreme importance. The objective of this work was to develop and evaluate a viable and low cost method for reuse and maintenance of the strains. The study was carried out using strains from “Fermetis”, a national manufacturer, where beer was produced on a pilot scale, aiming at imitating the industrial process and later re-using post-fermentation yeasts. The yeasts were washed and isolated at a stage which contained only living and healthy yeasts. The strains preserved in the refrigerator started from a viability between 86 and 91% and after six months the viability decreased to about 60 to 65%, except for the US-05 yeast that better withstand the cold conditions, maintaining its viability in 76,5% for the present study. The freezing was not very efficient since most of the yeasts did not withstand the severe conditions. The reason behind this is that glycerol was added to the yeast in its stationary phase and the alcohol present in the solution became a cryosensitising agent. Thus, based on the results of this experiment, brewers and microbreweries will be able to maintain and reuse yeasts with a simple method that represents a large economy in brewer industry.

Keywords: Yeast, Strains Maintenance, Freezing, Beer.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

UFC	Unidade formadora de colônia
DME	(Dry Malt Extract) Extrato de malte em pó
μL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Separação da fase que contem leveduras sadias do trub e leveduras mortas	28
Figura 2 – Imagem dos campos de contagem de leveduras	29
Figura 3 – Contagem das leveduras armazenadas em geladeira	31
Figura 4 – Leveduras inoculadas em meio sólido acondicionadas na estufa	32
Figura 5 – Formação de colônias de levedura em meio sólido	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perda da viabilidade das leveduras armazenadas em geladeira33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo Geral	13
1.1.2 Objetivos específicos	13
1.2 JUSTIFICATIVA	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 HISTÓRICO	15
2.2 CONSUMO DE CERVEJA	16
2.3 INGREDIENTES	16
2.3.1 Malte de cevada	16
2.3.2 Lúpulo.....	17
2.3.3 Água.....	18
2.3.4 Levedura	19
2.4 PROCESSO DE PRODUÇÃO DA CERVEJA.....	19
2.4.1 Moagem	19
2.4.2 Mosturação.....	20
2.4.3 Filtração.....	20
2.4.4 Cozimento do mosto.....	21
2.4.5 Resfriamento do mosto	21
2.4.6 Fermentação	22
2.5 METABOLISMO DA LEVEDURA.....	23
2.6 PITCHING RATE.....	23
3 MATERIAL DE MÉTODOS	24
3.1 OBTENÇÃO DOS INSUMOS	24
3.2 PRODUÇÃO DAS CERVEJAS	24
3.3 MOAGEM DOS GRÃOS	24
3.4 PRODUÇÃO DO MOSTO	25
3.5 INOCULAÇÃO DA LEVEDURA	25
3.6 ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO.....	26
3.7 LAVAGEM DAS LEVEDURAS	26
3.8 CONTAGEM DAS CÉLULAS VIÁVEIS	27
3.9 ARMAZENAMENTO DAS LEVEDURAS EM GELADEIRA.....	29
3.10 ARMAZENAMENTO DAS LEVEDURAS EM FREEZER.....	29
3.11 ACOMPANHAMENTO DA PERDA DE VIABILIDADE	29
3.12 UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÃO	37
6 REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que o homem começou a produzir bebidas fermentadas há 30 mil anos. Estudos mais aprofundados indicam que a produção primitiva da cerveja começou por volta de 8000 a.C. A primeira prova arqueológica referente à produção de cerveja vem da Suméria (AQUARONE, 2008). Os sumérios teriam percebido que a massa do pão, quando molhada, fermentava, assim imagina-se o surgimento de uma forma primitiva da cerveja, chamada de pão líquido, tudo isto data por volta de 6.000 A.C.(BIERLAND,2016)

A cerveja primitiva também foi produzida por gregos e romanos. Por volta século XIII, os cervejeiros germânicos foram os primeiros a empregar o lúpulo na cerveja, conferindo as características básicas da bebida atual (AQUARONE, 2008).

No Brasil a chegada da cerveja ocorreu em 1808 com a mudança da família real portuguesa (CERVESIA, 2015). No entanto, a sua ascensão foi demorada e tortuosa pois a cachaça e o vinho eram as bebidas alcoólicas preferidas pela população. Esta situação só mudou com a abertura dos portos brasileiros a artigos de outras origens que não portuguesa, sendo a cerveja um desses produtos (CERVEJAS DO MUNDO, 2010.)

O seu consumo vem aumentando cada vez mais. Em 2013 , o consumo mundial de cerveja alcançou 188,81 bilhões de litros (KIRIN BEER UNIVERSITY, 2014). Segundo os dados lançados, neste mesmo período a produção brasileira foi de 13,5 bilhões de litros, tornando o país o terceiro maior produtor mundial(CERVBRASIL, 2014).

O mercado das microcervejarias no Brasil vem crescendo, cada vez mais vemos cervejas artesanais nas prateleiras das lojas em todo o nosso país. Este mercado hoje representa 1% do total de cervejas produzidas no território brasileiro e só tende a crescer (SEBRAE, 2016).

O sabor da cerveja é determinado por diversos fatores como a matéria-prima, o de processo e a levedura utilizada. É a levedura a responsável por transformar os açúcares fermentescíveis em etanol e gás carbônico (CARVALHO et al, 2007).

A levedura hoje dentro das microcervejarias é responsável por grande parte dos gastos com insumos para a produção das cervejas. Não só reaproveitamento dela é de grande importância econômica para as pequenas fábricas, mas a

manutenção de uma cepa saudável também pode gerar uma redução de custos, uma vez que mantendo uma cepa saudável existe apenas a necessidade de multiplicá-la e não de comprar nova.

Como o Paraná vem se destacando na produção de cervejas e a quantidade de microcervejarias vem aumentando, é de extrema importância de reaproveitar as leveduras excedentes do final do processo produtivo da cerveja, almejando desenvolver uma técnica apropriada e de baixo custo para a manutenção e reaproveitamento fabril dessas leveduras.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

- Avaliar a viabilidade celular de leveduras cervejeiras comerciais preservadas em refrigerador (2°C) e freezer convencional (-20°C).

1.1.2 Objetivos específicos

- Isolar as leveduras em uma fase que contenha leveduras vivas, por meio de lavagem de leveduras após a fermentação.
- Manter as leveduras em temperatura de 2°C na geladeira e acompanhar a viabilidade dela com o tempo de armazenamento.
- Congelar as cepas em temperatura de -20°C utilizando crioprotetores e acompanhar a viabilidade com o tempo de congelamento.
- Utilizar meios de cultura e formas baratas para a preservação das cepas.

1.2 JUSTIFICATIVA

A levedura é um importante insumo para a produção de cervejas, é ela que transformará os açúcares fermentescíveis do mosto cervejeiro em etanol e gás carbônico. Além de fermentar o mosto, ela contribui com ésteres conferindo aromas e sabores distintos dependendo da cepa utilizada e do estilo da cerveja.

Após o processo fermentativo, ela se acumula no fundo do fermentador e é reaproveitada algumas vezes, dependendo da levedura, se ela não mantiverem os padrões de produção de álcool, características organolépticas ou se houver alguma contaminação, ela é descartada.

Com o atual mercado de microcervejarias artesanais crescendo, a necessidade de reutilizar e manter a cepa acaba se tornando grande, pois o custo da mesma é elevado e a reutilização e manutenção das cepas trás uma grande vantagem econômica para a cervejaria, uma vez que o seu custo por litro pode variar de 20% até 40%, dependendo da receita e estilo da cerveja.

Em uma breve revisão na literatura, é possível notar que a manutenção de baixo custo destas cepas é pouco estudada e faltam informações para que os microcervejeiros possam utilizar em seus processos produtivos. Neste projeto a intenção foi realizar experimentos para coletar dados e informações para o pequeno produtor poder reproduzir em seus estabelecimentos com um custo reduzido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

Estima-se que o homem começou a utilizar bebidas fermentadas há 30 mil anos. Estudos mais aprofundados indicam que a produção primitiva da cerveja começou por volta de 8000 a.C. Esta bebida foi desenvolvida através da fermentação de cereais. Na Antiguidade, difundiu-se lado a lado com as culturas de milho, centeio e cevado, entre os sumérios, babilônicos e egípcios (AQUARONE, 2008)

A primeira prova arqueológica referente à produção de cerveja vem da Suméria. Os sumérios teriam percebido que a massa do pão, quando molhada, fermentava, assim imagina-se o surgimento de uma forma primitiva da cerveja, chamada de pão líquido, tudo isto data por volta de 6.000 A.C (BIERLAND, 2016)

Esta bebida também foi produzida por gregos e romanos. Dentre os povos bárbaros que ocuparam a Europa durante o Império Romano, os de origem germânica destacaram-se na arte de fabricar a cerveja. Por volta século XIII, os cervejeiros germânicos foram os primeiros a empregar o lúpulo na cerveja, conferindo as características básicas da bebida atual (AQUARONE, 2008).

No Brasil a chegada da cerveja foi em 1808 com a mudança da Família Real Portuguesa (CERVESIA, 2015). No entanto, a sua ascensão foi demorada e tortuosa pois no início XIX, a cachaça e o vinho eram as bebidas alcoólicas preferidas pela população. Nessa época, a cerveja já era produzida, mas o seu consumo não era grande. Devido à pressão e influência portuguesas, o vinho era a bebida mais comercializada. Esta situação só mudou com a abertura dos portos brasileiros a artigos de outras origens que não portuguesa, sendo a cerveja um desses produtos (CERVEJAS DO MUNDO, 2010).

Segundo a legislação brasileira, Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997, art.64 a art.71: “Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. O malte de cevada usado na elaboração de cerveja e o lúpulo

poderão ser substituídos por seus respectivos extratos. Parte do malte de cevada poderá ser substituída por cereais maltados ou não, e por carboidratos de origem vegetal, transformados ou não, os cereais referidos neste artigo são a cevada, o arroz, o trigo, o centeio, o milho, a aveia e o sorgo, todos integrais, em flocos ou a sua parte amilácea”

O sabor da cerveja é determinado por diversos fatores como a matéria-prima, pelo tipo de processo e pela levedura utilizada, além dos compostos durante a fermentação e maturação, que exercem maior impacto (CARVALHO et AL, 2007).

2.2 CONSUMO DE CERVEJA

O consumo de cervejas vem aumentando consecutivamente. Em 2013 , o consumo mundial de cerveja alcançou 188,81 bilhões de litros. Em comparação com 2012 , houve um aumento de cerca de 1,0 milhão de litros, um aumento anual de 0,5 %, marcando 28 anos consecutivos de crescimento (KIRIN BEER UNIVERSITY, 2014). Segundo a Cervbrasil, em 2013 a produção foi de 13,5 bilhões de litros de cerveja, (CERVBRASIL, 2014).

O mercado das microcervejarias no Brasil vem crescendo, segundo o SEBRAE, cada vez mais vemos cervejas artesanais nas prateleiras de lojas e supermercados. Este mercado hoje representa 1% do total de cervejas produzidas no país (SEBRAE, 2016).

2.3 INGREDIENTES

2.3.1 Malte De Cevada

A cevada é uma gramínea pertencente ao gênero *Hordeum*, que é cultivada desde a antiguidade, sendo originária do oriente. Dentre as espécies cultivadas de cevada a chamada cevada cervejeira, usada na obtenção do malte utilizado na fabricação de cervejas. A maioria das espécies de cevada possui uma casca cimentada ao grão, que funciona como um agente filtrante contribuindo no aroma,

cor e sabor do mosto, além de proteger o grão durante o processo de maltagem. (ALMEIDA, 2014)

Devido às mais vantajosas alternativas de alimentação animal, a malteação tem sido a principal aplicação econômica da cevada. Em média, 75% do volume da cevada produzida anualmente é aproveitado na fabricação de malte e 95% deste é destinado para fins cervejeiros. (EMBRAPA, 2012)

O nome malte define a matéria prima resultante da germinação de qualquer cereal sob condições controladas. Quando não há denominação específica, entendemos que é feito de cevada e em qualquer outro caso, acrescenta-se o nome do cereal por exemplo: malte de milho, de trigo, de centeio, de aveia e de outros cereais (AQUARONE, 2008).

Malteação é o processo de germinação forçada de um cereal, interrompida no ponto certo do processo de secagem, onde o objetivo principal é a ativação de enzimas amilolíticas. (JORGE, 2004)

A princípio, qualquer cereal pode ser maltado, entretanto, leva em consideração, entre outros fatores, o poder diastásico, que é basicamente a quantidade de enzimas no malte e o valor econômico de cada cereal. Entre os de maior poder diastásico encontra-se, nessa ordem: cevada, centeio, trigo, aveia, milho e arroz. O valor econômico é definido pelo tipo de uso; há cereais utilizados em alimentação humana e animal.

Ao escolher o cereal, algumas características devem ser levadas em consideração, que constituem métodos de avaliação do potencial de maltagem, ou seja o poder germinativo. Esse poder germinativo não deve ser inferior a 95%, pois não só da origem a malte de baixa atividade enzimática como os grãos não germinados podem abrigar focos de infecção. Potencial de germinação é a porcentagem de grãos que germinam em 72 horas. É diretamente proporcional à atividade enzimática do grão e deve ser de 65% a 85% (AQUARONE, 1983).

2.3.2 Lúpulo

A lúpulo (*Humulus lupulus*) pertence a família *Cannabaceae*, um parente próximo da *Cannabis* e da urtiga. É uma planta perene que pode viver por mais de

25 anos. A cada primavera ela pode alcançar aproximadamente 9 metros de altura. Muitas vezes é confundida como uma videira pela aparência das folhas ásperas e com pelos que ajudam na escalada dos ramos em seus suportes. Muitas variedades necessitam no mínimo 120 dias de frio intenso para uma boa produção.

Embora possam ser cultivadas plantas do sexo masculino e feminino, somente a planta fêmea produz flores em formato de cone que são utilizadas na produção cervejeira e saúde humana.

O corpo da flor feminina é composta de várias estruturas pétala chamado brácteas. Quando os cones amadurecem, as bases destas brácteas suportam glândulas que são preenchidas com uma substância resinosa amarelo conhecido como lupulina. A resina contém os ácidos alfa e óleos, os compostos que determinam quanta amargura e sabor está disponível (ORAN, 2011).

Os alfa-ácidos são constituídos praticamente 10% da matéria seca e lúpulo dividido em seis tipos de alfa-ácidos. O cohumulone, n-humulona e adhumulone constituem 98% da quantidade total de alfa-ácidos e os congêneres, posthumulone, prehumulone e adprehumulone, atingem a quantidade relativa 2%. Os iso-alfa-ácidos, alfa-ácidos isomerizados, são os principais responsáveis para o gosto amargo característicos e as propriedades da espuma de cerveja. O grau de amargura transmitida pelo lúpulo depende da quantidade de alfa-ácidos que se isomeriza durante a fervura do mosto cervejeiro (HUANG, 2013).

2.3.3 Água

Há muito tempo, sabe-se que a qualidade água é um fator importante para a produção cervejeira. A grandes cervejarias na Europa se desenvolveram ao redor de onde existia uma água de boa qualidade para se fabricar uma boa cerveja (AQUARONE, 2008).

Para cada 100 litros de cerveja produzidos na indústria, há um consumo de 1000 litros de água, mas não só para a cerveja propriamente dita, outros locais como caldeira, sala de brassagem e limpeza se incluem nesses números. (JORGE, 2004).

Em torno 90% da cerveja, é água, exercendo grande influência sobre o tipo e a qualidade da mesma. Ela deve ser potável, transparente, incolor, inodora, neutra e

sem sabor, fazendo com que o produto final seja de qualidade e tenha um padrão (JORGE, 2004).

2.3.4 Levedura

As leveduras são fungos unicelulares utilizadas na indústria de alimentos e bebidas e abrangem setores da indústria de panificação, fermentação alcoólica para a produção de etanol combustível, nas indústrias de cerveja, vinhos e álcool, em outros setores, sendo usada um como catalisador biológico (PINTO et al, 2013)

As cervejas são divididas em dois grupos distintos, sendo as Lagers (de baixa fermentação) e Ale (de alta fermentação). Cervejas do tipo lager são fermentadas à temperatura de 3,3 a 13 °C sendo que a duração da fermentação e da maturação pode ser de 4 a 12 semanas. Os aromas das cervejas lager são mais leves, quando comparadas com o tipo ale. As cervejas do tipo lager, são elaboradas com cepas de *Saccharomyces pastorianus*, sendo mais populares em todo o mundo. A cerveja do tipo ale, são elaboradas com cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo mais populares na Grã Bretanha (REBELLO, 2009). Estas por suas vez fermentam em temperaturas mais altas, em torno de 18 a 24 °C. (FERMENTIS, 2016)

2.4 PROCESSO DE PRODUÇÃO DA CERVEJA

2.4.1 Moagem

O objetivo da moagem do malte é produzir a desintegração completa do endosperma do grão através trituração, para que todos os seu interior esteja acessível para a atuação das enzimas. A moagem do malte não deve ser muito fina e nem muito grossa, pois se for fina pode tornar lenta a filtragem do mosto, já se for grossa demais, irá dificultar a hidrólise do amido. Esta etapa influencia na mosturação, filtração e extração do bagaço, rendimento em extrato e qualidade da cerveja produzida (CARVALHO, 2007).

2.4.2 Mosturação

A transformação das matérias-primas cervejeiras no mosto chama-se de mosturação. O principal objetivo é recuperar a maior quantidade possível de extrato a partir do malte ou da mistura de malte e adjuntos. A atividade enzimática produz mosto com carboidratos fermentescíveis como glicose, maltose e maltotriose. Esses chegam a constituir até 80% do mosto cervejeiro (CURI, 2006).

As principais enzimas para a produção de cerveja são a α e β -amilase, as β -glucanases e as proteases. A ação destas enzimas é promovida por certas temperaturas, por exemplo, as β -glucanases e as proteases estão muito mais ativas entre os 35°C e os 55°C, as α e β -amilase entre os 60°C e os 72°C. Acima destas temperaturas as enzimas são completamente inativadas (PINTO, 2013).

2.4.3 Filtração

Após a conversão do amido em açúcares, o mosto é aquecido para inativação das enzimas e então filtrado para remoção de resíduos dos grãos de malte e adjunto. A filtração é realizada por meio de peneiras que utilizam como meio filtrante, as próprias cascas do malte presentes no mosto (PESSOA, 2011).

Terminado a filtração, o bagaço é lavado com água quente para retirar o máximo de açúcares possível. Depois da lavagem, o mosto vai direto para a cuba de fervura onde será esterilizado e receberá o lúpulo (MONTEIRO, 2001).

É imprescindível obter um mosto o mais límpido possível, pois os resíduos de bagaço de malte podem acarretar a produção de compostos indesejáveis na cerveja (PESSOA, 2001).

2.4.4 Cozimento Do Mosto

Essa fase da produção tem como finalidade de esterilizar o mosto, concentrar os açúcares no grau desejado, extrair as substâncias essenciais do lúpulo, coagular e precipitar as proteínas. Na fervura do mosto é adicionado o lúpulo, que dá o amargor ao mosto. Ele é um dos principais responsáveis pela coagulação das proteínas e de taninos por reação com a proteína, que se precipitam em flocos

denominados "trubs". Outros efeitos da fervura do mosto com o lúpulo é amargar (isomerização dos alfa-ácidos), dar sabor e aromatizar o mosto (JORGE, 2004).

2.4.5 Resfriamento Do Mosto

Quando a fervura é completa, o lúpulo usado e os materiais coagulados chamados de trub são depositados no fundo do decantador. O mosto claro é drenado do decantador para ser fermentado, sobrando apenas o trub no fundo. É importante não passar o *trub* para a fermentador, pois ele irá proporcionar sabores estranhos à cerveja.

Para tornar mais rápida e eficiente a decantação dos materiais em suspensão, é feito o resfriamento do mosto, bem como uma movimentação chamada de *whirpool* (MATOS, 2011)

O mosto entra tangencialmente no decantador, provocando um giro da massa líquida, que, ao girar gera pela força centrífuga, uma pressão maior na periferia que no centro do decantador. Esta diferença de pressão empurra os sólidos em suspensão para o centro do recipiente onde o trub decanta (JORGE, 2004).

2.4.6 Fermentação

Após o resfriamento, o mosto recebe a levedura cervejeira e é acondicionado nos fermentadores, dando início à fase de fermentação. Nesta fase, a levedura transforma o açúcar do mosto em álcool e gás carbônico, em sistema anaeróbio, obtendo-se assim a energia necessária à sua sobrevivência.

Para obter de uma cerveja de qualidade, vários aspectos devem ser levados em consideração dentro da fase fermentativa, sendo a principal delas a seleção do microrganismo, seguido da quantidade e estado fisiológico do inóculo, a cinética fermentativa, a ausência de contaminantes, a temperatura e a relação do volume de mosto *versus* quantidade de levedura (*Pitching rate*), entre outros (CARVALHO *et al*, 2006).

As fermentações tem início com cepas de leveduras puras, mantidas em meios de cultura sólidos ou leveduras liofilizadas. A levedura de boa qualidade deve permanecer em suspensão durante a fase ativa da fermentação e, então flocular e

decantar, permitindo a separação da cerveja clarificada do sedimento. Na etapa de fermentação, diversas reações físico-químicas acontecem, como atenuação do extrato, através da transformação dos açúcares fermentescíveis em álcool e CO₂, redução do pH de 5,4 ~ 5,7 do mosto, para 4,0 ~ 4,6, na cerveja fermentada, alterações na cor que passa a ser mais clara, provocada pela queda do pH e alterações nas proporções das proteínas, onde a quantidade total é reduzida durante a fermentação em 20 a 25%.

O processo de fermentação dura em média, de 5 a 8 dias, dependendo da aeração durante o resfriamento do mosto, o tipo de fermento e a quantidade dosada, a concentração e a qualidade do mosto, a temperatura de fermentação e a quantidade de trub. Durante este período, deve ser feito o acompanhamento da atenuação dos extratos, ou seja, a queda da gravidade específica do mosto (CARVALHO, 2007).

2.5 METABOLISMO DA LEVEDURA

A levedura realiza a fermentação dos açúcares para obtenção da energia para sobrevivência. O objetivo principal da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, é gerar uma forma de energia (ATP) que é empregada na realização dos diversos trabalhos fisiológicos e biosínteses, necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. Os produtos do metabolismo da levedura são a produção da biomassa e produtos de excreção (etanol, glicerol, succinato, acetato entre outros) (SOUZA, 2007).

As células de *S. cerevisiae* são em geral elípticas, medindo cerca de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura. Durante o processo de multiplicação (brotamento), o núcleo se divide e uma porção dele entra no broto juntamente com outras organelas. A conexão citoplasmática é fechada pela síntese de novo material para a reconstrução da parede celular. (CARVALHO et al., 2006).

2.6 PITCHING RATE

Pitching rate refere-se à quantidade de levedura que é adicionada ao mosto que está pronto para o processo fermentativo e geralmente é expresso em células

por ml. Para que uma fermentação tenha um bom desenvolvimento, é necessária uma dosagem adequada de leveduras. A quantidade de levedura a ser usada varia de acordo com a gravidade específica do mosto e o tipo da levedura, sendo ela ale ou large (BRANYK, 2005).

Segundo o catálogo da Fermentis, produtora de leveduras liofilizadas, a taxa de inoculação para cervejas ale é de 4×10^6 a 6×10^6 de células/ml ou 50 a 80 g/hl. Para as Lages são 8 a 12 milhões de celular/ml ou 80 a 120 g/hl (FERMENTIS, 2017).

3 MATERIAL DE MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS INSUMOS

Obteve-se insumos para a produção de cerveja em uma loja online chamada WE Consultoria, especializada em insumos cervejeiros, sendo eles os maltes, lúpulos e leveduras selecionadas para tais cervejas.

3.2 PRODUÇÃO DAS CERVEJAS

Realizou-se a produção das cervejas no Laboratório de Alimentos da UTFPR Campus de Toledo, seguindo os métodos citados na revisão bibliográfica. O intuito de produzir as cervejas foi imitar um processo industrial, com a finalidade de reaproveitar a levedura após o término do processo fermentativo e de maturação. Cinco estilos diferentes de cerveja foram produzidas, três delas ales e duas lagers, seguindo o guia de estilos BJCP 2015, sendo elas American Ipa, Witbier, Weissbier (ales), German Pilsner, Munich Helles (lagers). Cada batelada rendeu 10 litros de mosto.

3.3 MOAGEM DOS GRÃOS

Moeu-se os grãos em um moinho de pratos, feito em ferro fundido. Cada receita levava alguns grãos diferentes, então foram moídos separadamente para não haver contaminação cruzada.

3.4 PRODUÇÃO DO MOSTO

Cada uma das cervejas foi produzida individualmente e o equipamento devidamente higienizado para não haver contaminação cruzada entre as produções. Na tabela abaixo é possível ver os insumos utilizados na produção das cervejas. As receitas foram desenvolvidas propriamente para esse estudo.

Tabela 1: Insumos utilizados na produção das cervejas.

Cervejas	Grãos	Lúpulos	Levedura
Weissbier	1,25 kg trigo 1,25 kg malte pilsen	7 g Magnun	6 g levedura WB-06
American IPA	2,7 kg malte pilsen 0,2 kg malte melano 0,2 kg malte crystal 60	11 g Columbus 10 g Citra 10 g Cascade	7 g levedura US 05
Witbier	1,25 kg malte pilsen 1,25 kg flocos de trigo	11 g Cascade	6 g levedura S33
German Pilsner	2,7 kg malte pilsen	7 g Magnun 13 g Saaz	11 g levedura W34/70
Munich Helles	1,2 kg malte pilsen 0,8 kg malte munich	8 g Magnun	11 g levedura S23

Fonte: Autoria própria

Ao término na fervura, resfriou-se os mostos com o auxílio de um chiller durante aproximadamente uma hora. Depois de resfriados, os mostos foram trasfegados para dentro dos fermentadores e posteriormente as leveduras foram inoculadas

3.5 INOCULAÇÃO DA LEVEDURA

Antes de serem inoculadas, as leveduras foram reidratadas com água estéril na temperatura de 35°C, pois segundo os experimentos de BKYest 2012, mostrou que esta temperatura é onde conseguimos a reidratação com maior número de células viáveis. Nesta fase, a levedura está muito frágil, e uma diferença de pressão osmótica por influência da temperatura pode mata-la.

A dosagem de leveduras nos mostos foi feita de acordo com o catálogo da FERMENTIS, que nos apresenta uma faixa de dosagem. Para estes experimentos utilizou-se uma faixa intermediária da qual ele recomendam.

3.6 ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO

Depois da inoculação, as cervejas foram levadas para uma incubadora onde as cervejas do tipo Ale foram mantidas as 18°C até o termino da fermentação. As cervejas do tipo Lager foram mantidas a 12°C. A cada 8 horas uma amostra foi retirada para medir a gravidade específica com o intuito de se verificar o término da fermentação.

Cessada a fermentação, as cervejas passaram para a maturação na temperatura de 2°C. Tanto Ales como as Lagers foram mantidas por sete dias nessa temperatura, para imitar as condições das quais passariam se estivessem em uma fábrica.

3.7 LAVAGEM DAS LEVEDURAS

Após a fermentação, as cervejas foram envasilhadas, deixando somente as leveduras decantadas no fundo do fermentador e um pouco de cerveja, aproximadamente 500 ml. Para cada fermentador, foram adicionados 500 ml de água destilada e estéril. Agitou-se os fermentadores até o liquido ficar homogêneo. Após este processo, os fermentadores foram levados até a capela de fluxo laminar e liquido foi transferido para um béquer estéril. Após trinta minutos, o liquido de separa em duas fases, uma fase esbranquiçada e outra com um tom marrom contendo proteínas e leveduras mortas, sendo que a fase superior é onde se encontra as leveduras sadias (WYEASTLAB 2016). Este processo baseou-se no método de lavagem do laboratório de leveduras Wyeast, variando apenas na quantidade de água utilizada para soltar o fermento do fundo do fermentador. Na figura 1 podemos verificar separação das fases.



Figura 1: Separação da fase que contém leveduras sadias do trub e leveduras mortas. A parte superior e mais clara contém as leveduras vivas, já na parte escura, estão as leveduras mortas e proteínas.

Fonte: Autoria própria.

A fase contendo levedura foi transferida com o auxílio de pipetas estéreis para dois erlemeyers de 250 ml. Este processo se repetiu para cada levedura utilizada nas cervejas produzidas.

3.8 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS

A contagem de células viáveis foi feita em um microscópio. As leveduras foram misturadas com uma solução azul de metileno 0,025%. As leveduras que ainda tem atividades fisiológicas não absorvem o corante, já as leveduras mortas, aparecem com uma cor azulada. A determinação da viabilidade consiste em pegar uma amostra da solução com leveduras e corante e levar até o microscópio (ANTONINI, 2004).

Segundo Antonini (2004), a metodologia consiste em fazer uma diluição de leveduras conveniente. Em seguida fazer uma solução 1/1 de leveduras e azul de metileno 0,025%. A amostra deve ser homogeneizada e uma pequena amostra deve ser levada para a câmara de Neubauer. Após realizada esta etapa, ajustar o foco na

objetiva de 40x e fazer a contagem dos campos, como está representado na figura 2 abaixo. Cada campo não deve ter mais do que 40 células.

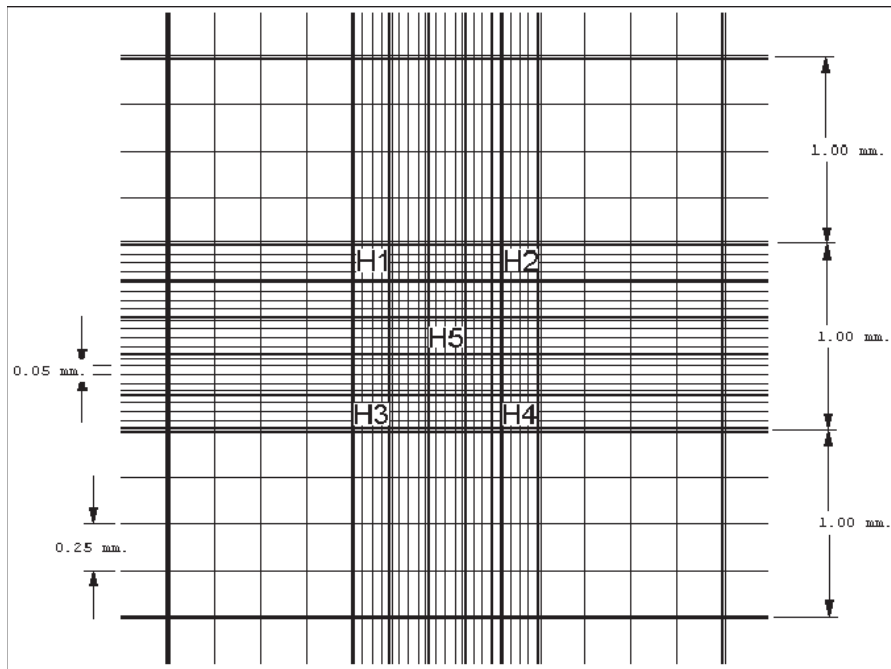


Figura 2: H1, H2, H3, H4 e H5 são os campos utilizados de contagem de leveduras das leveduras deste experimento.

Fonte: Docslide (2017).

Um fator é importante estabelecer limites nos quadrantes, sendo que as células que estão sobre o limite superior e lateral esquerda devem ser contabilizadas e as do limite inferior e lado direito devem ser desprezadas. Anotar a quantidade de células vivas (não coradas) e das células mortas (coradas).

A viabilidade em (%) = $(\text{Número de células vivas} / \text{Número de células total}) \times 100$. Para estabelecer o número de células/ml é o número de células nos 25 campos $\times 10^4 \times$ diluição.

3.9 ARMAZENAMENTO DAS LEVEDURAS EM GELADEIRA

As leveduras coletadas no processo de lavagem foram transferidas com auxílio de uma pipetadora para espendorfs estéreis contendo 1 ml de leveduras em suspensão. Os espendorfs foram acondicionados em geladeira em uma temperatura que varia entre 2 a 4°C.

3.10 ARMAZENAMENTO DAS LEVEDURAS EM FREEZER

Para proteger as leveduras por um tempo de congelamento longo, uma solução protetora estéril foi feita, seguindo a metodologia de Caridi 2009. Esta solução foi feita com 50% água, 50% glicerol e 1g/L de ácido ascórbico. Ela foi adicionada com as leveduras, na proporção de 1 parte de leveduras para uma parte da solução crioprotetora. A solução foi agitada e transferida com auxílio de uma pipetadora, para ependorfs estéreis no volume de 1 ml e levados ao freezer, onde permaneceram acondicionadas em uma temperatura de -20 a -22°C.

3.11 ACOPANHAMENTO DA PEDRA DE VIABILIDADE

A queda da viabilidade das leveduras armazenadas em geladeira foi verificada nos prazos de 7,15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias seguindo a metodologia de Antonini (2004). As leveduras congeladas foram contadas pelo mesmo método e pelo mesmo período de tempo. Na figura 3 abaixo, vemos uma imagem das leveduras armazenadas em geladeira, sendo contadas na câmara de Neubauer.

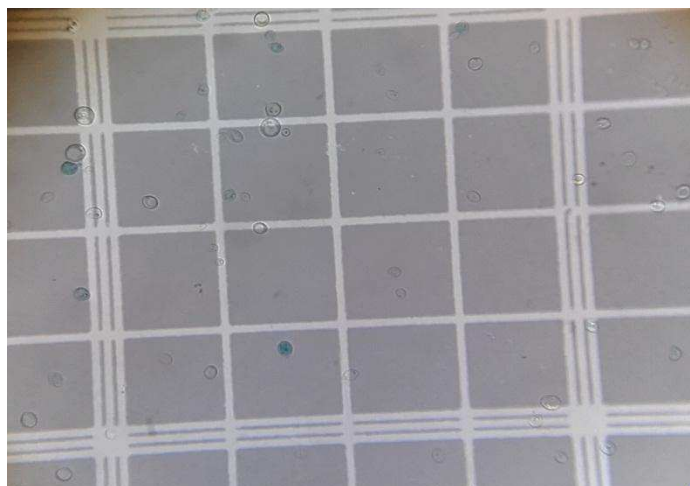


Figura 3: Contagem das leveduras armazenadas em geladeira. As leveduras de cor azulada estão mortas, pois o azul de metileno entra na célula através da parede celular rompida. As leveduras transparentes estão vivas pois sua parede celular está intacta e o corante não consegue entrar.

Fonte: Autoria Própria.

3.12 UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

Esta técnica é utilizada para a contagem de colônias de vários microrganismos, especialmente fungos. As leveduras que foram congeladas foram contadas através desta metodologia. Para esta metodologia, basicamente precisamos de um meio sólido e fazer diluições seriadas para as leveduras. Neste trabalho o meio sólido foi desenvolvido para imitar o meio líquido onde elas cresceram, sendo ele constituído de 1000ml de água, 57g de DME e 1,5% de agar-ágar. A solução de diluição das leveduras foi baseado na metodologia da EMBRAPA (2012), onde a solução é constituída de 0,9% de NaCl, 1000 ml de água destilada e 1 ml de tween 80. Depois de preparados, os dois meios foram autoclavados junto com placas de petri, tubos de ensaio, ponteiras e alças de drigalski.

O meio sólido foi levado ao microondas para voltar a estado líquido e derramados nas placas de petri dentro de uma capela de fluxo laminar. As diluições para as leveduras foram de 10^1 até 10^4 dentro dos tubos de ensaio. Antes de serem diluídas em outro volume e ser semeadas, a solução era agitada em um agitador orbital. Para a semeadura, 20 μ L eram utilizados e espalhados com a alça de drigalski. Após serem semeadas, foram levadas a uma incubadora com temperatura de 35°C, como mostrados na figura 4 abaixo e após 72 horas, as colônias cresceram, como mostra a figura 5, e então foram contadas. As amostras foram feitas em duplicata para cada experimento de leveduras congeladas a -20°C nos tempos pré-estabelecidos de 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.



Figura 4: Leveduras inoculadas em meio sólido acondicionadas na estufa na temperatura de 35°C por 72 horas.

Fonte: Autoria própria.



Figura 5: Formação de colônias de levedura em meio sólidos após 72 horas. As leveduras se apresentam como círculos gelatinosos e esbranquiçados.

Fonte: Autoria própria.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com a levedura que foi acondicionada em geladeira na temperatura de 2°C, podem ser vistos no gráfico abaixo. Nele está demonstrada a queda da viabilidade celular pelo período de tempo de 180 dias.

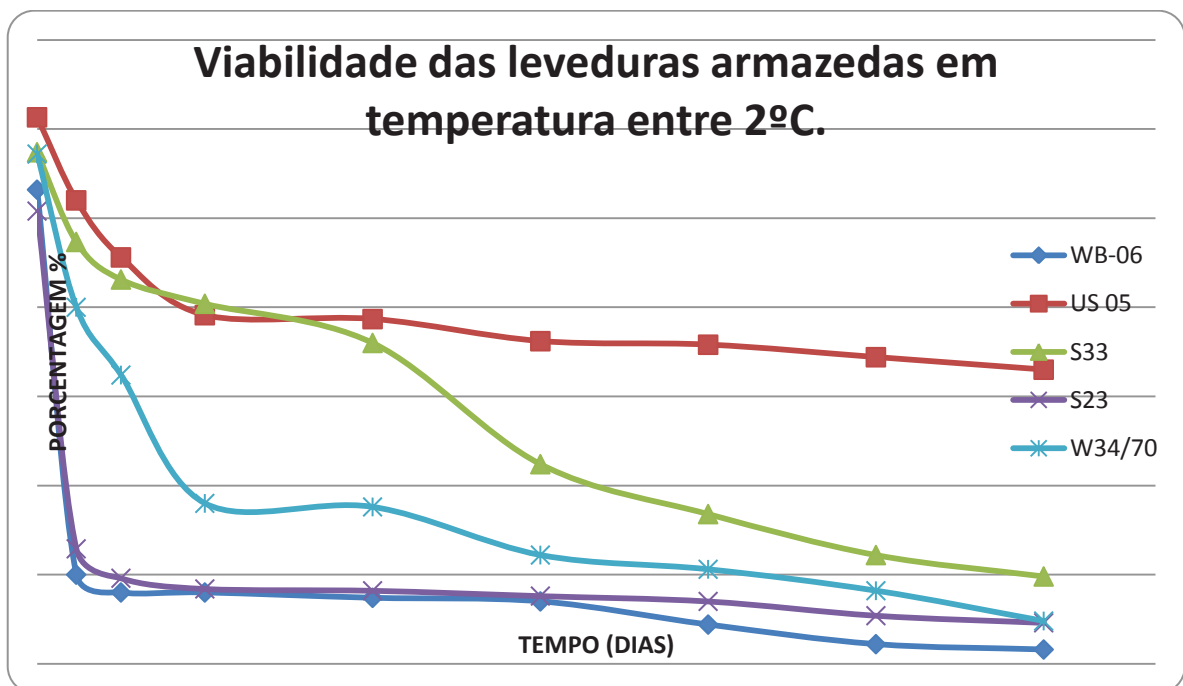


Gráfico1: Perda da viabilidade das leveduras armazenadas na temperatura de 2°C.

Fonte: Autoria própria

Podemos observar em todas as leveduras estudadas que nos primeiros 7 a 15 dias, há uma brusca queda na viabilidade e conforme passa o tempo, a perda de viabilidade é baixa, o que indica que há poucas mudanças de armazenar por 30 ou 180 dias.

A levedura WB-06 iniciou com 86,6% de viabilidade e terminou com 60,8%. A curva é bem semelhante a da levedura S23 que começou com 85,4% de viabilidade e terminou com 62,3%. Mesmo sendo de diferentes famílias (ales e lagers) é possível notar a semelhança. A levedura S33 começou o experimento com 88,7 % e no final de 180 dias a viabilidade está com 64,9%. Podemos observar que as leveduras W34/70 e US-05 em seus primeiros dias tiveram um comportamento bem

semelhante, mas depois a W34/70 teve uma queda mais acentuada. A mesma iniciou com 88,6% e terminou com 62,4%. A US-05 é a que mais resistiu a essa condição, começando com 90,6% de viabilidade e ao final do experimento aparece com 76,5%.

Foram procurados trabalhos que se assemelhassem com este, entretanto nada foi encontrado para fazer uma comparação ou discutir esses dados. Um fator interessante nestes dados é o comportamento da levedura US-05 que teve uma tolerância maior a essas condições. É possível, porém não possa ser afirmado, que esta cepa tenha uma característica própria de resistir a intempéries deste tipo ou este lote pode ser diferente dos demais, entretanto é preciso um estudo mais aprofundado para confirmar essas habilidades.

Os resultados do experimento com as leveduras congeladas podem ser observadas nas tabelas abaixo, onde as leveduras foram contadas pelo método de UFC para obtenção dos dados.

A princípio, as leveduras congeladas seriam contadas em microscópio, entretanto, as primeiras contagens já revelavam que haviam poucas células vivas ou nenhuma. Assim, decidiu-se usar a metodologia que Siradi (2009) usou, a técnica de UFC para verificar a viabilidade das leveduras, portanto poucos dados foram possíveis de obter e comparar com o trabalho do autor. O mesmo utilizou leveduras de vinho em seu experimento e em 3 meses conseguiu resultados entre 5,62 e 7,46 (logUFC/ml). É uma diferença considerável comparado aos resultados obtidos neste trabalho, a morte celular dos experimentos de autor foi muito menor.

Tabela 2: log UFC/ml da levedura WB-06

	Diluição			
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
3 meses	4,17	4,13	-	-
6 meses	3,35	-	-	-

Fonte: Autoria própria

Tabela 3: log UFC/ml da levedura S33

	Diluição			
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
3 meses	3,95	3,7	-	-
6 meses	-	-	-	-

Fonte: Autoria própria

Tabela 4: log UFC/ml da levedura US-05

	Diluição			
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
3 meses	4,8	4,77	4,69	-
6 meses	4,13	4,1	-	-

Fonte: Autoria própria

Não foi possível obter dados das leveduras S23 e W34/70, pois as mesmas não resistiram ao congelamento. O simples fato da levedura ter sido congelada na fase estacionária pode ter prejudicado o estudo. Existe uma possibilidade destas leveduras *Saccharomyces pastorianus* não se adaptarem ao congelamento por ter um metabolismo diferente das *Saccharomyces cerevisae* ou as cepas utilizadas neste experimento foram atípicas e fora dos padrões do fabricante, entretanto um estudo mais aprofundado seria necessário para desvendar tal fenômeno.

A explicação para o fato das leveduras não terem sobrevivido tão bem não baixas temperaturas com as de Siradi (2009) é que o glicerol deveria ter sido adicionado à levedura em sua fase exponencial, não em sua fase de estacionária. Josh (2017) diz em sua metodologia que a levedura para ser congelada, deve ser coletada em sua fase exponencial, lavada em solução salina 0,9% e depois ser adicionado o glicerol.

Os motivos para o glicerol ser adicionado na fase exponencial, é que o etanol age com um criossensibilizador na célula e o efeito de criopreservação cai. Estes dados são fornecidos pelos experimentos de Lewis et al (1993) que menciona em

seus estudos que etanol serve como crioprotetor, mas apenas para congelamentos rápidos com queda de 3°C por minuto, entretanto, para congelamentos lentos o etanol acaba tendo esse efeito de sensibilização. O congelamento tem que ser de forma lenta para que o glicerol possa ser absorvido pela célula, evitando a formação de cristais de água dentro das células. Adicionando o glicerol na fase exponencial, a quantidade de etanol é reduzida e o efeito de criossensibilização é muito menor e o método se torna mais eficiente.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados do presente trabalho, foi possível fazer uma manutenção de cepas de levedura cervejeira com um baixo custo, obtendo resultados satisfatórios com o uso da temperatura de geladeira. O método mostrou-se muito viável, principalmente se a quantidade de leveduras for relativamente grande, pois pode-se conservar uma batelada inteira para uma outra fermentação. Ele apresentou também, ser uma forma viável de manutenção de cepa em longo prazo, devido a sua facilidade e também durabilidade sem renovação da mesma.

O método de preservação por congelamento -20°C nestas condições, mostrou-se pouco viável, pois algumas leveduras destes experimentos, não mostraram uma adaptação a esta forma de armazenamento. Algumas inclusive não resistiram às baixas temperaturas e nenhum dado delas foi possível obter.

O método de congelamento utilizando o glicerol como agente crioprotetor deve ser empregado na fase exponencial da levedura, onde as concentrações de etanol são baixas e o mesmo não vai agir como agente criossensibilizador das leveduras, tornando o método mais eficiente.

Mais estudos neste segmento auxiliariam os cervejeiros e microcervejarias, reduzindo os gastos de produção utilizando um método simples, viável e de baixo custo para manterem suas cepas.

6 REFERÊNCIAS

ALMEIRA, A.R. **Compostos Bioativos do Bagaço de Malte: Fenólicos, Capacidade Antioxidante In Vitro E Atividade Antibacteriana.** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA – CURITIBA, 2014

AQUARONE, E.; LIMA, U.A; BORZANI, W. - **Biotechnologia Alimentos e bebidas produzidos por fermentação** Ed. EDGARD BLUCHER Ltda. São Paulo, Vol. 5, 1983.

AQUARONE, E.; BORZANI W.; SCHMIDELL W.; LIMA; A. U. **Biotechnologia Industrial.** 4 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2008.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análise e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria.** Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Econômica Rural Centro de Ciências Agrárias – Campus de Araras, 2004.

BIERLAND. Disponível em: www.bierland.com.br/bierland/historia-da-cerveja.html. Acessado dia 18 abril de 2016.

BKYEAST. Disponível em: <https://bkyeast.wordpress.com/2012/10/15/yeast-rehydration>. Acessado dia 17 de junho de 2017.

BRANYIK, T. et al. **Continuous beer fermentation using immobilized yeast cell bioreactor systems.** Biotechnology Progress, v. 21, n. 3, p. 653-663, 2005.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. **Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 3ª parte – A Maturação.** Revista Analytica N°27. São Paulo Fevereiro/Março 2007.

CARVALHO, L. G. **Dossiê Técnico. Produção de cerveja.** Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, mar. 2007. Disponível em:

<<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTc=> >. Acesso em 28 de agosto de 2016.

CARVALHO, M; G. B.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. **Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º parte – as leveduras**. Revista Analytica, v. 25, p. 36-41, 2006.

CARVALHO, W.;CANILHA, L.; SILVIA, S.S. **Uso de Biocatalizadores Imobilizados: Uma alternativa para a condução de bioprocessos**. Revista Analytica - N°23, 2006.

CERVEJAS DO MUNDO. **História da cerveja - Brasil**. 2010 Disponível em: <http://www.cervejasdomundo.com/Brasil.htm>. Acesso dia 16 abril de 2016.

CERVESIA. Disponível em: <http://www.cervesia.com.br/historia-da-cerveja/72-a-historia-da-cerveja-no-brasil.html>. Acessado dia 16 de abril de 2016.

CERVBRASIL. Disponível em: cervbrasil.org.br/arquivos/anuariofinal2014.pdf. Acessado dia 17 abril de 2016.

CURI, R. A. **Produção de Cerveja Utilizando Cevada Como Adjunto de Malte**. Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas Campus de Botucatu. Botucatu – SP Dezembro – 2006

DOCSLIDE. Disponível em <http://docslide.com.br/documents/contagem-manual-de-plaquetas-pelo-metodo-de.html>. Acessado dia 15 de janeiro de 2017.

EMBRAPA. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da cevada**. Infoteca, 2012

EMBRAPA. **Avaliação da qualidade de produtos à base de Trichoderma**. 2012

FERMENTIS – disponível em <http://www.fermentis.com/>. Acesso dia 19 abril de 2016

FERMENTIS. Disponível em: < http://www.fermentis.com/wp-content/uploads/2012/06/TT_Booklet_Portugais.pdf>. Acesso em 11 de abril de 2017.

HUANG, Y.; TIPPMANN, J.; BECKER, T. **Kinetic Modeling of Hop Acids during Wort Boiling**, International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, Vol. 3, No. 1, 2013.

JOSH. Making Freezer Stocks and Submitting to Benchling. Disponível em <<http://smolkelab.weebly.com/making-freezer-stocks.html>> Acesso em 01 de maio de 2017.

JORGE, E .P. M; **Processamento de Cerveja Sem Álcool**. Universidade Católica de Goiás Departamento de Matemática e Física Engenharia de Alimentos; Goiânia, 2004.

KIRIN BEER UNIVERSITY. Disponível em: http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2014/1224_01.html. Acessado dia 16 de abril de 2016.

LEWIS, J. G.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. **Role of Growth Phase and Ethanol in Freeze-Thaw Stress Resistance of Saccharomyces cerevisiae**. Department of Biochemistry, Microbiology, and Nutrition, University of New England, Armidale, New South Wales 2351, Australia

MATOS, R. A. G. **Cerveja: Panorama do Mercado, Produção Artesanal, e Avaliação de Aceitação e Preferência**. Universidade Federal de Santa Catarina Centro de Ciências Agrárias Curso de Agronomia - Florianópolis – SC, 2011

MONTEIRO, A. **Curso Operador Cervejeiro**. Companhia Brasileira de Bebidas. Goiânia, 2001.

PESSOA, P. T. **Sustentabilidade Ambiental na Indústria Cervejeira um Estudo de Caso**. Universidade Federal do Ceará Centro de Tecnologia Departamento de Engenharia Química. Fortaleza – CE 2011.

PINTO, A. R. M. **Avaliação do Processo de Secagem no Fabrico de Malte**. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar - Processamento de Alimentos. Instituto Superior de Agronomia Universidade Técnica de Lisboa, 2013.

PINTO, L. C.; LOPES, M. V.; FILHO, C. D. C.; ALVES, L. V. A.; BENEVIDES, c. M. J. **Determinação do Valor Nutritivo de Derivados de Levedura de Cervejaria (*Saccharomyces spp*)**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.15, n.1, p.7-17, 2013

REBELLO, F. F. P. **Produção De Cerveja**. Revista Agrogeoambiental, 2009

SEBRAE. **Microcervejarias no Brasil**. Disponível em < [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/\\$File/7503.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/$File/7503.pdf). > Acessado em 09 de maio de 2017.

SIDARI, R.; CARIDI A. **Viability of Commercial Wine Yeasts during Freezer Storage in Glycerol-Based Media**. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Forestali e Ambientali, Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria, 2009.

SOUZA, F.R; **Viabilidade Técnico-econômica de Minidestilarias de etanol**. Porto Alegre – Rio Grande do Sul, 2007.

ORAN, H.; **How to Grow Hops**. The Canadian Organic Grower, 2011.

WYEAST. Disponível em < <http://www.wyeastlab.com/hbrew/hbyewash.htm> >. Acesso em 12 de setembro de 2016.