

# PRODUÇÃO DE CERVEJA COM RECICLO DE LEVEDURAS

Bruna Christofolletti

Etec Cel. Fernando Febeliano da Costa - brunachristofolletti1204@gmail.com

Isabelly Cristina Costa

Etec Cel. Fernando Febeliano da Costa

Gisele Gonçalves Bortoleto

Fatec Piracicaba

Josinei Venâncio Cordeiro

Etec Cel. Fernando Febeliano da Costa

Daniela Defavari do Nascimento

Fatec Piracicaba - daniela.nascimento01@fatec.sp.gov.br

## 1. Introdução

As cervejas são classificadas por 3 características: Pelo teor de álcool e extrato primitivo, pelo malte ou de acordo com o tipo de fermentação. Existem várias cepas de leveduras para fabricação de cervejas, e cada uma produz um perfil diferente de sabor. Por exemplo, algumas cepas Belgas produzem aromas frutados, que cheiram como cerejas, já algumas cepas alemãs produzem fenóis (função orgânica caracterizada por anéis aromáticos ligados a hidroxilas) com um aroma destacado de cravo e/ou banana. Estes exemplos são especiais, pois evidenciam como a escolha das leveduras pode determinar o sabor da cerveja, o resultado, são cervejas com aromas mais exuberantes, vindos não somente dos ingredientes básicos, como malte e lúpulo, mas também de vários compostos secundários formados pela levedura durante o processo de fermentação, sendo assim, uma das principais diferenças entre os diversos estilos de cerveja. Pequenas mudanças no processo de fabricação, bem como diferentes tempos e temperaturas de cozimento, fermentação, maturação, e aplicação de outros ingredientes, além dos quatro básicos (água, lúpulo, cevada e malte) são responsáveis por essa variedade de tipos [1].

No processo de fermentação do mosto cervejeiro, a principal reação é a conversão dos açúcares (substrato) em etanol e gás carbônico (CO<sub>2</sub>). Entretanto, essa reação não é a única que se sucede [2]. A cerveja é, na verdade, um coquetel de substâncias químicas que, somadas, resultam em características sensoriais relevantes ao produto.

A formação desses subprodutos, é extremamente dependente da levedura utilizada, assim como também das condições de temperatura e pressão, nas quais a fermentação é conduzida [3]. O uso de leveduras com baixa vitalidade, insuficiência de nutrientes para as leveduras no mosto, contaminação por bactérias ácido-láticas, especialmente *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, são alguns dos fatores que podem levar à produção de acetolactato e diacetil. O diacetil é uma falha na cerveja, um off flavor de sabor e aroma semelhantes ao da manteiga e pode deixar uma sensação de ranço na boca. Desta forma, se faz importante avaliar se o processo de reciclo de levedura para produção cervejeira pode levar a maior produção de acetoacetato, resultando numa cerveja com maior teor de diacetil. Desta forma, este trabalho teve como objetivo comparar através de análise de viabilidade celular, produção de etanol e de

diacetil, as cervejas produzidas com diferentes leveduras, e produzidas no decorrer de ciclos de produção com reuso das leveduras.

## 2. Metodologia

As análises microbiológicas, bem como a produção de cervejas em escala laboratorial, foram feitas nos laboratórios da FATEC em Piracicaba – “Deputado Roque Trevisan”.

As leveduras utilizadas no primeiro experimento deste trabalho, foram linhagens não comerciais “Modena”, “Alessandro” e “Indígena”. A levedura “Modena” corresponde a cepa cervejeira proveniente de cervejaria da Itália. As demais cepas são leveduras usualmente empregadas na produção de cachaça artesanal. As cervejas produzidas a partir dos ciclos destas leveduras foram subdivididas em 2 tratamentos. Tratamento 1 – Cervejas produzidas com leveduras de reciclo puro; Tratamento 2 - Cervejas produzidas com leveduras de reciclo, porém, previamente “recondicionadas” nos laboratórios da Fatec Piracicaba, sob agitação orbital de 150-rpm por 1 hora em mosto diluído a 50% com água autoclavada;

Num segundo experimento, optou-se por comparar duas leveduras comerciais, uma cervejeira, a S04 da Fermentis® e a outra, uma levedura selecionada para produção industrial de etanol, Cat1 da Fermentec®. Neste experimento, não houve tratamento dos ciclos. Apenas se recuperou 10mL do creme levedurado do fundo do fermentador, após 7 dias de fermentação a 18°C mais 7 dias de maturação a 8°C, e o aplicou em 125mL de mosto para início de novo processo de fermentação.

A reativação e multiplicação de todas leveduras, foi feita em meio YPD líquido, sob agitação orbital a 150rpm e 25°C por 16 horas. O mosto cervejeiro (tipo Soul-IPA), foi preparado conforme o padrão já pré- estabelecido pela microcervejaria parceira, em volume suficiente para o preparo de todas as cervejas, em escala laboratorial. Após o preparo e resfriamento do mosto, o mesmo foi repartido e congelado a -80°C até o uso.

Uma primeira cerveja, em escala laboratorial de 125mL, foi produzida com cada levedura reativada, em cada experimentos. Esta primeira cerveja foi fermentada por 7 dias a 18°C e maturada por mais 14 dias a 8°C. A mesma foi considerada como amostra padrão, a fim de ser comparada com as demais cervejas produzidas, justamente a partir do reuso dessas leveduras. Ao todo, foram efetuados 4 ciclos de produção de cerveja a partir do reciclo das leveduras selecionadas para cada experimento desse projeto.

As alíquotas das leveduras multiplicadas na Fatec e as que

foram usadas para a fermentação, foram rotineiramente analisadas através da medição da densidade ótica em espectrofotômetro a 600 nm de absorbância. Como parâmetro para comparação das cervejas de reciclo com a cerveja padrão, sucederam-se análises da viabilidade celular das leveduras, pela contagem das células em câmara de Neubauer.

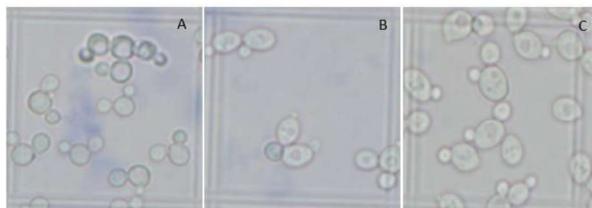
A quantidade de etanol gerada a partir dos processos de fermentação, determinada por cromatografia gasosa e a determinação do diacetil em amostras coletadas no final do processo de maturação das cervejas, feitas pelo método espectrofotométrico recomendado pela Convenção Europeia Brewery (EBC), onde o desenvolvimento da coloração é obtido através da reação com ortofenilenodiamina para obtenção da 2,3 dimetilquinoxalina, cuja absorbância medida a 335 nm é proporcional à concentração de dicetonas vicinais. Estas análises químicas foram realizadas conjuntamente com outros bolsistas PIBIT e PIBIC-EM, sob orientação da coorientadora e parceira deste projeto.

### 3. Resultados e Discussões

As três cepas de leveduras usadas no preparo das cervejas “padrão” (R0) foram rotineiramente analisadas após reativação em meio YPD líquido quanto a sua viabilidade, através de coloração com azul de metileno, em câmara de Neubauer, e observação em microscópio óptico. A micrografia apresentada na figura 1, demonstra o padrão de alta viabilidade celular que foi sempre seguido para dar início aos ciclos de fermentação das cervejas. Desta forma, padronizou-se usar como inóculos R0 células 100% viáveis (células inviáveis, se estivessem presentes, apareceriam nas micrografias como coloração azul escuro). Ainda na figura 1, pode ser salientada a presença de brotos, indicativo de pleno vigor das células.

**Figura 01** – Micrografia das leveduras coradas com azul de metileno após reativação em meio YPD para produção das cervejas “padrão” (R0) em escala laboratorial. Leveduras apresentam-se com coloração azul clara indicando viabilidade de 100%. As setas evidenciam multiplicação das leveduras por brotação.

A) Alessandro; B) Indígena e; C) Modena.



Fonte: autores

Antes da adição das leveduras aos mostos cervejeiros, sempre procedeu-se a leitura de densidade ótica em espectrofotômetro a 600nm, das soluções celulares para garantir que proporção semelhante fosse adicionada em cada fermentador. Tomou-se como padrão estabelecido em projetos anteriores da orientadora, a adição de 125µL de solução celular de levedura com D.O.600nm ≈ 0,650, para cada 125mL de mosto cervejeiro a ser fermentado.

Após 7 dias de fermentação, procedeu-se a centrifugação

do mosto fermentado, recuperando-se o sobrenadante (cerveja) e esta mantida para maturação por mais 15 dias. A levedura recuperada pela centrifugação foi usada para ser inoculada novamente em novo mosto para novo ciclo de produção de cerveja. No entanto, após cada ciclo de fermentação, portanto, antes de cada reciclo, esta levedura foi analisada em microscópio óptico para observação e determinação de sua viabilidade celular, seguido de leitura de sua densidade ótica para garantir que, em cada reciclo, fosse adicionada quantidade similar de levedura. O mesmo procedimento foi realizado com a porção de levedura que foi recondicionada por 1 hora sob agitação 150rpm e 25°C em solução de mosto diluído a 50% (~7,8°Brix) em água autoclavada.

De acordo com as análises e acompanhamentos realizados, observa-se que conforme o progresso dos reciclos, as leveduras submetidas ao tratamento 1 apresentaram maior quantidade de células inviáveis do que as leveduras recondicionadas (tratamento 2). Durante o reciclo 2 da levedura recondicionada Alessandro, pode-se observar que a quantidade de células presentes na mesma, diminuiu drasticamente, provavelmente por algum tipo de contaminação não identificada ou por falta de controle rigoroso de fatores como temperatura, pH e presença de O<sub>2</sub> [4]. Contudo, no reciclo seguinte as células se multiplicaram e voltaram a ser observadas em quantidades similares aos demais tratamentos.

Após obtenção e análise dos resultados da determinação de etanol e álcoois superiores, realizadas pelos estagiários parceiros deste projeto, também bolsistas do CNPq e apresentados e discutidos em seus respectivos relatórios finais, parece não ter havido um padrão que se pudesse considerar serem resultado dos reciclos sucessivos [5; 6; 7; 8] ou da influência ou não da etapa de recondicionamento das leveduras entre os reciclos (tratamentos 1 e 2). Ficando evidente, desta forma, que precisamos entender mais sobre a dinâmica existente nesse processo, bem como, ser mais rigorosos no controle de cada etapa para que possamos chegar a uma conclusão confiável, conforme sugerem [4].

De posse deste resultados preliminares, optou-se por alterar a dinâmica do processo de produção das cervejas em laboratório e condução de novos reciclos, visando reproduzir em pequenos volumes e com a vidrarias de laboratório, ambiente e manuseio mais similares aos praticados nas cervejarias. No segundo experimento que foi estabelecido, foi decidido comparar apenas duas cepas de leveduras, uma comercial para produção de cervejas tipo Ale, a S04 da Fermentis®; e outra cepa, também comercial, porém selecionada para produção industrial de etanol que se mantém estável por sucessivos reciclos ao longo de uma safra de cana, a levedura Cat1 da Fermentec®. Também optou-se por trocar o sistema de liberação do CO<sub>2</sub> produzido nas etapas da fermentação e maturação que no experimento 1 foi feito com a instalação de um filtro micropore®, o qual impede a entrada de microrganismos, porém permite troca de gases e possível entrada de O<sub>2</sub> no sistema. Assim, para evitar troca de gases e permitir apenas a saída do CO<sub>2</sub> produzido foi utilizado um airlock, convencional para produção de cervejas artesanais.

Neste segundo experimento, a cerveja padrão inicial foi obtida com a inoculação de levedura seca comercial. Para 125mL de mosto IPA Soul, foram adicionados 0,07g de cada levedura. Para as demais cervejas dos 4 reciclos seguintes, não foi feito tratamento de condicionamento de leveduras, apenas se recuperou 10mL do creme de leveduras depositado no fundo do fermentador após etapa de fermentação e mais uma semana de maturação a 8oC e o mesmo já foi imediatamente inoculado em

125mL de mosto. Aliquotas de cada levedura usada nos ciclos foi coletada e analisada quanto sua viabilidade e concentração celular em microscópio óptico e por leitura de densidade óptica em espectrofotômetro, conforme descrito no item material e métodos.

As leituras da densidade óptica realizadas em espectrofotômetro a 600nm, de 50µL de creme de levedura de ciclo, dissolvida em 950µL de água tem sido bem uniforme, variando suas médias entre 0,7 e 0,9 ao longo dos 4 ciclos realizados, indicando que neste segundo experimento, as condições microbiológicas tem sido mantidas, e provavelmente evitou instabilidade fisiológica das leveduras. A viabilidade celular tem se mantido acima de 98% e presença de bactérias ou outros microrganismos contaminantes não tem sido observada.

#### 4. Conclusões

Todas as etapas previstas no cronograma, puderam ser realizadas conforme proposto.

Acompanhamento microbiológico de sucessivos ciclos de leveduras cervejeiras ou não, demonstraram que a viabilidade celular e ausência de microrganismos contaminantes pôde ser mantida tomando os devidos cuidados de assepsia.

Análises químicas que estão sendo apresentadas em maiores detalhes por outros bolsistas, demonstraram que controle adicional para evitar entrada de O<sub>2</sub> no fermentadores parece desempenhar papel crucial na adequada atenuação e maturação dos aromas e sabores ue influenciam na qualidade final de cervejas artesanais.

#### 5. Referências

[1] SINDICERV – Sindicato Nacional da Indústria da

Cerveja - Disponível em:

<http://www.sindicerv.com.br/cerveja-saude.php>. 2020.

- [2] CERRI, C.F.F. Utilização de arroz preto do tipo IAC-600 (*Oryza sativa*) como adjunto para a produção de cerveja. Universidade de São Paulo Escola de Engenharia de Lorena (Eel-Usp). Lorena – SP. 2012.
- [3] KUNZE, W. Tecnología para Cerveceros y Malteros. International. Berlin: VLB, 2006. 1ª Edição em espanhol.
- [4] CARVALHO, D.S., ZAMBIAZI, R.C. Avaliação do Processo Fermentativo de Cerveja Pilsen Pelo Uso de Diferentes Concentrações de *Saccharomyces Cerevisiae*. Alim. Nutr., Araraquara.v. 22, n. 3, p. 351-357, jul./set. 2011.
- [5] KABAKTSCHIEVA, G.; GINOVA-STOJANOVA, T.; DIMITROVA, T. The use of an enzyme solution with alpha-acetolactate decarboxylase activity, Brew Bever Ind Int, 2, 22- 24, 1994.
- [6] LANDAUD, S.; LIEBEN, P.; PICQUE, D. Quantitative analysis of diacetyl, pentanedione and their precursors during beer fermentation by an accurate GC/MS method J. Inst. Brew., 104, pp. 93-99. 1998.
- [7] PALMER, J. J. How to brew: everything you need to know to brew beer right the first time. Brewers Publications, 2006.
- [8] BAMFORTH, C. W. Beer: a Quality Perspective. Burlington: Academis Press, 2009.

#### Agradecimentos

À Fatec Piracicaba “Deputado Roque Trevisan pela disponibilização de infraestrutura e equipamentos, e ao CNPq pela concessão da bolsa ICJr.