

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

Isadora Terumi Noda Dilelli

Método de propagação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*
em escala laboratorial

Araraquara

2024

Isadora Terumi Noda Dilelli

Método de propagação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*
em escala laboratorial

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
a Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como parte dos requisitos para
obtenção do título de Pós graduação em
Tecnologia Cervejeira.

Orientador: Prof. Dr. Ossamu Hojo
Prof. Dr. Sabrina Ciane Condi

Araraquara
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

D576m	Dilelli, Isadora Terumi Noda Método de propagação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em escala laboratorial / Isadora Terumi Noda Dilelli. – Araraquara: [s.n], 2024 58 f. : il. Trabalho de conclusão de curso (Lato Sensu – Tecnologia Cervejeira) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química Orientador: Ossamu Hojo Coorientadora: Sabrina Ciane Condi 1. Leveduras. 2. Cerveja. 3. Laboratórios. 4. Propagação. 5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

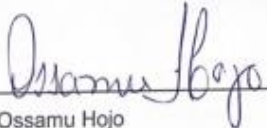
Isadora Terumi Noda Dilelli

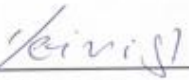
Método de propagação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho" como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Especialista em Tecnologia
Cervejeira.

Araraquara, 19 de abril de 2024

Banca examinadora


Prof. Dr. Ossamu Hojo


Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli


Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Junior

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho primeiramente à Deus e à minha família, em especial minha avó, Isaura Pereira Dilelli e ao meu falecido avô, Nicola Sérgio Dilelli, que sempre acreditaram no meu potencial tanto na vida acadêmica, tanto como pessoal. Serei eternamente grata também ao meu pai, Eduardo, e minha mãe, Cidinha, por todo o incentivo necessário nesses meses desafiadores de pós-graduação. Agradeço também em especial meu namorado Rodrigo, por me acompanhar nesta trajetória sempre com muita paciência e amor.

Obrigada Universidade Estadual Paulista por permitir conhecer colegas incríveis, e ao mesmo tempo trazer intensos aprendizados. Em especial, ao professor e coordenador do curso de pós-graduação Leinig Antonio Perazolli, por ter acreditado em mim desde o primeiro dia de inscrição deste curso.

Agradeço aos professores por toda a energia depositada durante estes meses. Agradeço também ao meu orientador Ossamu Hojo e a minha co-orientadora Sabrina Ciane Condi pelo conhecimento e tempo investido!

Este tipo de vivência deve ser valorizada e contada com muita alegria, apenas gratidão a todos os envolvidos!

RESUMO

A cerveja surgiu na humanidade há mais de 7 mil anos, sendo considerada um alimento na maioria de sua existência. Com a evolução da ciência, a fermentação tornou-se um alvo de estudo, sendo aplicada a diversas áreas da sociedade, em especial na indústria de alimentos, aumentando a demanda de leveduras mundialmente. No Brasil, a maioria dos produtores de cerveja adquirem o fermento por importação, o que torna o processo ainda mais custoso. Desse modo, devido à falta de conhecimento do processo de propagação, o mercado brasileiro encontra-se carente de leveduras comerciais. Devido esta problemática, o estudo tem como objetivo replicar leveduras *S. cerevisiae* a partir de leveduras secas em meio de cultura simples com aeração e realizar análises para verificação de aumento da biomassa, viabilidade das células replicadas, porcentagem de brotamento e população de leveduras por mL. O meio de cultura empregado para replicação foi o extrato de malte DME (Dry Malt Extract) Dry Brew, composto exclusivamente de malte pilsen, rico em açúcares fermentescíveis. A reidratação da levedura foi feita utilizando água estéril. O propagador empregado foi um erlenmeyer de vidro borossilicato de volume de 2000 mL e um agitador magnético para auxiliar a aeração e estimular a respiração aeróbia das leveduras. Com o meio de cultura já em temperatura ambiente (25°C), foi deixado em agitação contínua por 24 horas. As análises do meio de cultura realizados foram pH e teor de açúcares dissolvidos, apontando respectivos valores de 4,7 e 9 °Brix, com densidade igual a 1,036. Já os resultados das análises da propagação apresentaram 91,98% de viabilidade celular, população de leveduras 6,6 milhões/mL, 10,89 % de taxa de brotamento e 16,81 g de aumento de biomassa. Após analisar os resultados, observa-se que o estudo foi conduzido de maneira adequada, evidenciando dados consistentes sobre pH, taxa de brotamento e crescimento das leveduras. Foi possível verificar também que a adição de suplementos ao meio de cultura é crucial para manter a viabilidade celular das leveduras. Portanto, os resultados obtidos estão em concordância com estudos anteriores, fornecendo uma base sólida para compreender os processos de replicação celular em laboratório.

Palavras-chave: leveduras; cerveja; propagação; *Saccharomyces cerevisiae*; laboratório.

ABSTRACT

Beer emerged among humanity more than 7 thousand years ago, being considered a food for most of its existence. With the evolution of science, fermentation has become a target of study, being applied to different areas of society, especially in the food industry, increasing the demand for yeast worldwide. In Brazil, most beer producers purchase yeast by import, which makes the process even more costly. Therefore, due to the lack of knowledge about the propagation process, the Brazilian market is lacking commercial yeasts. Due to this problem, the study aims to replicate *S. cerevisiae* yeasts from dry yeast in simple culture medium with aeration and carry out analyzes to verify the increase in biomass, viability of replicated cells, budding percentage and yeast population per mL. The culture medium used for replication was DME (Dry Malt Extract) Dry Brew malt extract, composed exclusively of pilsner malt, rich in fermentable sugars. Yeast rehydration was done using sterile water. The propagator used was a 2000 mL borosilicate glass Erlenmeyer flask and a magnetic stirrer to aid aeration and stimulate aerobic respiration of the yeast. With the culture medium already at room temperature (25°C), it was left to stir continuously for 24 hours. The analyzes of the culture medium carried out were pH and dissolved sugar content, indicating respective values of 4.7 and 9 °Brix, with a density equal to 1.036. The results of propagation analyzes showed 91.98% cell viability, yeast population 6.6 million/mL, 10.89% budding rate and 16.81 g increase in biomass. After analyzing the results, it is observed that the study was conducted appropriately, showing consistent data on pH, budding rate and yeast growth. It was also possible to verify that the addition of supplements to the culture medium is crucial to maintain yeast cell viability. Therefore, the results obtained are in agreement with previous studies, providing a solid basis for understanding cell replication processes in the laboratory.

Keywords: yeast; beer; propagation; *Saccharomyces cerevisiae*; laboratory.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2. Revisão bibliográfica	13
2.1 Introdução	13
2.2 O processo para obter a cerveja	13
2.2.1 Maltagem	14
2.2.2 Brassagem	15
2.2.2.1 Moagem	15
2.2.2.2 Mosturação	16
2.2.2.3 Filtração	18
2.2.2.4 Fervura	19
2.2.2.5 Resfriamento	20
2.2.3 Fermentação	21
2.2.3.1 Produtos da fermentação	22
2.2.4 Maturação	25
2.2.5 Filtração	26
2.3 Leveduras	26
2.3.1 Formas de produção de ATP	28
2.3.2 Carboidratos de reserva presentes na levedura	30
2.3.3 Aumento da biomassa de leveduras	31
2.3.4 Nutrição da levedura	31
2.3.5 Fatores que influenciam na propagação de leveduras	34
3.1 Objetivos gerais	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 . MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Levedura e meio de cultura	36
4.2 Propagador	37
4.3 Análises do meio de cultura	38
4.4 Testes de propagação	38

4.4.1 Contagem do número de células e viabilidade celular	39
4.4.2 Teste de aumento de biomassa	40
4.5 Cálculos.....	41
4.5.1 Viabilidade celular	41
4.5.2 População de leveduras.....	41
4.5.3 Células em brotamento	42
4.5.3 Aumento da biomassa.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO E SUGESTÃO PARA FUTUROS ESTUDOS.....	46
REFERÊNCIAS:	47

1 INTRODUÇÃO

A cerveja surgiu na humanidade há mais de 7 mil anos, sendo considerada um alimento na maioria de sua existência. É provável que a descoberta da cerveja deu-se por acaso, uma vez que na pré-história o ser humano cultivava e armazenava grãos em recipientes. Isso facilitava a hidratação e posterior ressecamento desses grãos, dando origem ao malte, que possui sabor mais adocicado e é de mais fácil digestão. Caso este malte formasse uma espécie de sopa (mosto), iria construir um ambiente ideal para o desenvolvimento de microrganismos que realizam a fermentação, produzindo álcool e gás carbônico, dando origem a cerveja. (Morado, 2017)

Desde sempre a qualidade da cerveja foi uma preocupação. Com a produção cervejeira tornando-se um hábito popular na Europa, durante o século XIII surgiu a Lei da Pureza, promulgada em 1516 pelo Duque Guilherme IV da Bavária, durando até 1987. Essa lei buscava padronizar a bebida de modo que a cerveja fosse feita obrigatoriamente de água, malte de cevada e lúpulo. A levedura não era referida na lei pois a fermentação era considerada uma dádiva dos deuses, já que os conhecimentos sobre os microrganismos eram limitados. (Morado, 2017)

Até então, a fermentação da cerveja era feita de forma empírica. Foi assim que no ano de 1680, Leeuwenhoek pela primeira vez observou no microscópio células de leveduras presentes no mosto da cerveja. Posteriormente, em 1876 Louis Pasteur escreveu o artigo ``Études sur la bière`` (Estudos sobre a cerveja), explanando o processo fermentativo, o qual ocorre de forma anaeróbica, onde as leveduras convertem açúcar em etanol e dióxido de carbono. Além desse estudo, Pasteur corroborou para a elucidação do processo de pasteurização, esclarecendo como a presença de outros microrganismos causavam uma fermentação de baixa qualidade. (Filho, 2016)

Com a descoberta da fermentação, as leveduras tornaram-se alvo de estudo. Mais tarde no século XIX, Emil Hansen no laboratório de Carlsberg (Copenhague), elaborou a técnica de isolamento da cultura de *Saccharomyces cerevisiae*. Este foi um marco histórico, contribuindo amplamente para a qualidade da fermentação cervejeira. O estudo científico das leveduras não ficou limitado apenas a fermentação.

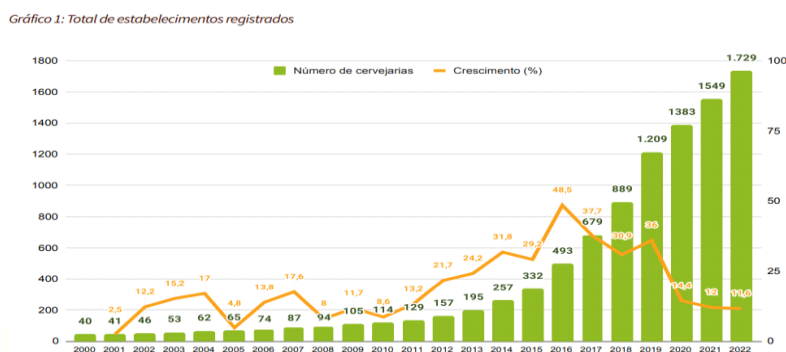
A primeira codificação genética foi feita em 1996 numa célula de levedura, abrindo as portas para o sequenciamento do genoma humano 10 anos mais tarde. (Oliver, 2020, p. 412)

Já no Brasil, a história da cerveja tem início no século XVII com os Holandeses, uma vez que os portugueses não apreciavam a bebida. Mais tarde, em 1808 as importações inglesas tomam conta do mercado, que posteriormente refletiu em queda devido ao início da produção nacional de cerveja (Santos, 2003).

As primeiras indústrias brasileiras de cerveja surgiram por volta de 1870 e 1880, entretanto, encontravam dificuldades no controle da temperatura fermentativa e na obtenção de matéria prima devido ao clima tropical brasileiro. Assim, em 1880 os modelos de refrigeração artificial chegaram ao país, permitindo uma otimização em todo processo cervejeiro (Santos, 2003). Isso colaborou para que duas indústrias entrassem em ascensão, a *Companhia Cervejaria Brahma* e a *Antarctica Paulista*, que posteriormente se fundiram dando origem a *Ambev*, em 1999. Com a fusão dessas duas grandes empresas, a Ambev ganhou o título de empresa que mais possui marcas de cerveja no mundo (Silva, 2016).

De acordo com o Sindcerv (Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja), atualmente o Brasil é o terceiro maior fabricante de cerveja no ranking mundial. Segundo o MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária) o número de cervejarias registradas, até o ano de 2022, é de 1729. Por meio da Figura 1 verifica-se o total de estabelecimentos no período de 2002 a 2022.

Figura 1: Total de estabelecimentos registrados.



Fonte: Ministério da Agricultura e Pecuária. Anuário da Cerveja 2022.

Observa-se na Figura 1 que o número de registros permaneceu praticamente constante desde 2021, com a média de 11 a 12% de crescimento (MAPA, 2022).

Consequentemente, a demanda de leveduras cervejeiras aumentou, e devido à falta de conhecimento do processo de propagação, o mercado brasileiro encontra-se carente de leveduras comerciais. Na maioria dos casos a obtenção do produto é por importação, o que torna o processo ainda mais custoso (Condi, 2022).

Devido esta problemática o estudo tem como objetivo realizar e descrever a propagação de leveduras comerciais, a fim de baratear o processo de produção cervejeira.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Introdução

De acordo com a legislação brasileira, a cerveja é uma bebida originada da fermentação pela levedura dos grãos malteados de cevada com adição de lúpulo. Além do grão de cevada, a cerveja pode ser constituída parcialmente de adjuntos como milho, arroz, trigo, entre outros (Brasil, 2009).

Resumidamente a cerveja pode ser categorizada em dois tipos: *lagers* (baixa fermentação) e *ales* (alta fermentação). A cerveja do tipo *lager* é a mais popular no Brasil, sendo produzida pela *Saccharomyces uvarum* (*S. carlsbergensis*) (Oliveira, 2011). Esse tipo de levedura possui uma fermentação mais lenta decorrente da baixa temperatura empregada (7 a 13°C), chegando de 7 até 10 dias de fermentação.

Já as cervejas *ales* são derivadas da *Saccharomyces cerevisiae*, e fermentam rapidamente (2 a 7 dias) a temperaturas mais elevadas, de 15 a 24°C.

Essa diferença de processos faz com que as *lagers* possuam um perfil sutil e sem turbidez quando comparadas as *Ales*, que são de características mais complexas (Oliver, 2020)

2.2 O processo para obter a cerveja

A produção de cerveja começa com a maltagem, onde grãos como a cevada são germinados e secos, transformando-se em malte. Após este processo, inicia-se a brassagem que consiste em realizar rampas de temperaturas específicas a fim de ativar as enzimas presentes no malte e transformar o amido do grão em açúcares fermentáveis. Para que esta etapa ocorra da melhor forma os grãos são misturados com água de qualidade e temperatura específicas. O líquido resultante, chamado mosto, é fervido e adicionado lúpulo para fornecer amargor e aroma. Após o resfriamento, o mosto é fermentado com levedura, convertendo os açúcares em álcool e dióxido de carbono. Após a fermentação, a cerveja é maturada para refinar seu sabor e aspecto, e então filtrada e carbonatada antes da pasteurização para prolongar sua vida útil. (Morado, 2017)

2.2.1 Maltagem

A maltagem é um processo que submete o grão de cereal a diversas etapas, sendo seu produto o malte, o qual geralmente é remetido ao malte de cevada. A cevada (*Hordeum vulgare*), é o grão mais utilizado para processo de fabricação de cerveja, podendo ser consumido também para a alimentação animal. Para um bom malte cervejeiro é necessário que a cevada tenha elevado poder germinativo (superior a 95%) e uma alta concentração de amido e proteínas (Stormovski, 2018).

Os tipos de cevadas são as hexásticas (seis fileiras de grãos) e as dísticas (duas fileiras), e diferem-se em teor de amido e concentração enzimática (poder diastático).

As cevadas hexásticas contam com maior concentração de proteínas/enzimas e menor concentração de amido, sendo mais utilizadas para cervejas elaboradas com adjuntos como o milho pois estes possuem baixo poder enzimático.

Já as cevadas dísticas carregam maior teor de amido e menor poder diastático, o que facilita sua malteação (Hornink, 2022).

Embora a cevada seja a principal matéria prima utilizada para malteação, o milho e o trigo também podem ser submetidos a este processo, sendo nomeados adjuntos.

A maltagem consiste basicamente em seis etapas: limpeza e classificação do grão, maceração, germinação, secagem e crivagem (Oliveira et.al, 2017).

As duas primeiras etapas são feitas para retirar sujidades ou fragmentos estranhos, e unificar os tamanhos dos grãos.

A maceração da cevada consiste no umedecimento do grão a fim de fornecer água ao embrião.

Posteriormente inicia-se a germinação, onde ocorre o aparecimento das radículas, sendo necessário um rigoroso controle de temperatura, umidade, oxigênio e CO₂. Neste ponto, as enzimas presentes se ativam, dando características únicas de poder diastático a cada tipo de malte.

A secagem interrompe o processo germinativo e preserva as enzimas. É importante o controle rigoroso da temperatura nesta etapa pois ela irá conferir cor e aroma característicos de cada malte (Oliveira et.al, 2017).

Os maltes produzidos recebem a classificação conforme sua cor, podendo ser maltes base ou especiais.

Os maltes bases geralmente são de cor clara, o que confere um alto poder diastático e sabor mais suave.

Já os maltes especiais recebem um tratamento térmico mais brando, o que possibilita a reação de Maillard, conferindo uma coloração escura, sabor marcante e baixo poder diastático, uma vez que em altas temperaturas as enzimas são desnaturadas (Hornink, 2022).

2.2.2 Brassagem

O processo de brassagem compreende várias fases que possuem a principal finalidade de transformar o amido do malte em açúcares fermentescíveis, tornando a fermentação viável. Desse modo, a levedura será capaz de digerir e transformá-los em álcool e dióxido de carbono. Além desses produtos, outros metabólitos são excretados pelo microrganismo e dependerão diretamente da composição do mosto, agregando sabor e aroma essenciais a cerveja (Oliver, 2020).

As etapas envolvidas são moagem, mosturação, filtração do mosto, fervura e resfriamento (Morado, 2017).

2.2.2.1 Moagem

A moagem possui o propósito de quebrar o grão de malte, e aumentar a área de contato do grão com a água, favorecendo as reações enzimáticas. Caso a moagem seja em excesso ou ineficiente, poderá acarretar problemas na mosturação e até mesmo no produto final (Hornink, 2022).

Ela pode ser realizada por dois tipos básicos de moedores: com rolos ou em moinhos do tipo martelo. Na moagem com rolos a casca é pouco fragmentada, já no tipo martelo a casca é desintegrada quase por completo. O tipo de moinho usado influenciará diretamente na filtração empregada (Morado, 2017).

2.2.2.2 Mosturação

Após a moagem o malte é adicionado em água, obtendo-se o mosto, que é rico em proteínas, açúcares e sais minerais. A água é uma das matérias primas que mais impactam na qualidade total da cerveja pois interfere não só na eficiência da mosturação, mas também no resultado final da bebida (Hornink, 2022).

A mosturação consiste no processo de cocção dos grãos em temperatura e pH controlados, para que as enzimas presentes no próprio malte consigam sacarificar o amido do grão e disponibilizar outros nutrientes presentes no malte. Nesta etapa é empregado as rampas de aquecimento para que catalisadores como β -glucanase, protease, β -amilase e α -amilase consigam atingir maior atividade (Aboumrads, 2015).

Antes de tudo, para que as enzimas consigam atuar no amido, é necessário que ocorra três etapas: gelatinização, liquefação e sacarificação (Busch, 2015).

A gelatinização ocorre com o aumento da temperatura e promove a quebra do amido, tornando o mosto altamente viscoso nesta etapa. A temperatura de gelatinização depende da origem do amido. Por exemplo, o amido do arroz possui uma temperatura de gelatinização maior que o da cevada, podendo levar uma sacarificação defeituosa devido ao baixo poder diastático do arroz (Farini, 2016).

Com a gelatinização do amido, a etapa de liquefação fica facilitada.

Na liquefação o amido se solubiliza na água, permitindo assim a atuação da α -amilase no polímero. A α -amilase faz a hidrólise do amido em dextrinas, que por sua vez não são fermentescíveis, podendo conferir dulçor e "corpo" a cerveja caso não seja hidrolisada.

Finalmente, a β -amilase atuará nas dextrinas e irá gerar açúcares de cadeia menor como glicose, maltose e maltotriose, as quais são digeríveis pelas leveduras (Aboumrads, 2015)

As enzimas peptidases e proteases atuam nas proteínas, que por sua vez são transformadas em aminoácidos de baixo e alto peso molecular.

Basicamente enquanto as proteases ajustam o grau de turbidez da cerveja quebrando as proteínas em cadeias menores, as peptidases fornecem FAN (Free Amino Nitrogen), proteínas de baixo peso molecular importantes durante a fermentação (Aboumrads, 2015).

O excesso de proteínas pode conferir turbidez a cerveja, entretanto, sua escassez pode acarretar numa espuma de baixa estabilidade. A atuação dessas enzimas é importante para garantir uma fermentação de alta eficiência, pois o alto teor de FAN irá fornecer os aminoácidos essenciais necessários para o desenvolvimento da levedura (Busch, 2015)

Os betas glucanos são produtos formados pela degradação da parede celular hemicelulósicas do malte e frequentemente são responsáveis por trazer problemas coloidais a cerveja, dificultando sua filtração e escoamento (Busch, 2015). Para isso a ação das β -glucanases são desejáveis, uma vez que melhoram a viscosidade da cerveja. Essas enzimas atuam em uma temperatura de 35 - 45°C (Aboumrads, 2015).

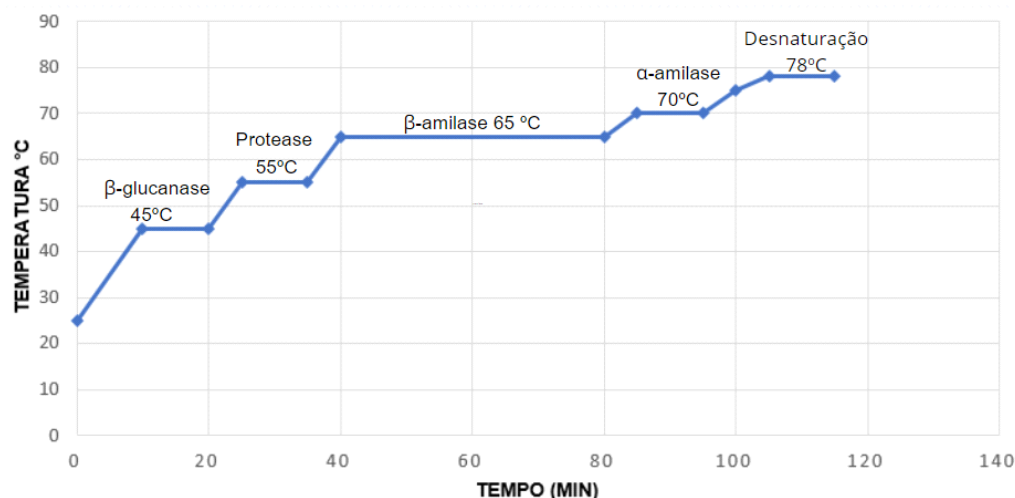
O pH e a temperatura são fatores primordiais na atuação dessas enzimas durante a mosturação, sendo que cada uma delas possui uma faixa ótima de pH e temperatura para sua atividade.

O pH basicamente é a concentração de íons numa solução, e caso não esteja em níveis ideais poderão desnaturar as enzimas, pois esses íons possuem a capacidade de alterar seu nível de polarização estrutural e funcional da enzima.

Já a temperatura possui uma forte correlação ao tempo pois geralmente a temperatura ótima de atuação enzimática é próxima a de degradação.

Portanto, ao realizar o processo de mostura deve-se equilibrar o tempo de cada temperatura, a fim de manter a enzima mais ativa o possível, sem desnaturá-la (Sammartino, 2015). Na Figura 2 há um exemplo de rampa de temperatura que pode ser empregada durante a mosturação.

Figura 2: gráfico de temperatura e descanso para (β -glucanase, protease, β -amilase, α -amilase e desnaturação enzimática).



Fonte: Aboumradi et.al (2015) adaptada.

De acordo com o estudo de Aboumradi et.al, a rampa de temperatura da Figura 2 foi empregada para cervejas que possuem adjuntos não maltados, como o estilo *Witbier*. Sendo assim, cada rampa de mostura deve ser adaptada para o estilo de cerveja e malte utilizado.

2.2.2.3 Filtração

A etapa de filtração na brassagem tem a finalidade de retirar a parte sólida do mosto, transformando-o em uma mistura homogênea. Variantes como a viscosidade do mosto, velocidade do fluido e o coeficiente de permeabilidade do leito interferem diretamente na eficiência da operação. Uma boa filtração garantirá uma cerveja livre de turvação e elementos como complexos proteicos e polifenóis (Boaventura, 2009).

Caso a moagem tenha sido realizada com o moinho de rolos, a filtração mais indicada seria a tina-filtro, a qual utiliza a própria casca do malte como leito filtrante (Morado, 2017). Já o moinho do tipo martelo implicaria na utilização do filtro prensa, composto por várias placas com lonas filtrantes, o que permite uma filtragem de maior rendimento (Filho, 2022).

Após a filtragem, é feita a lavagem no bagaço de malte com água secundária a 75 °C, a fim de extrair açúcares restantes do malte (Bortoli, 2013). É importante que a temperatura da água não seja alta pois poderá remover polifenóis retidos na casca, agregando sabores indesejáveis na cerveja (Morado, 2017).

2.2.2.4 Fervura

A fervura é crucial pois traz estabilidade física e microbiológica ao mosto. Além disso é nesta etapa que o lúpulo é adicionado, agregando sabores e aromas complexos a bebida (Morado, 2017). A fervura age também na evaporação do dimetil-sulfeto (DMS), que traz sabor de legume cozido a bebida.

O lúpulo (*Humulus Lupulus L.*) é uma planta derivada da família *Cannabaceae*, sendo cultivado a séculos atrás devido a sua alta capacidade medicinal. Primeiramente, o lúpulo era adicionado a cerveja com o propósito de realizar seu efeito conservante, entretanto, ao passar do tempo foi sendo utilizado também para conferir amargor e aroma a bebida. A característica organoléptica conferida pelo lúpulo é causada pela presença das resinas moles da planta, como alfa e beta ácidos. Ademais, os óleos essenciais são extremamente voláteis e atribuem aroma a cerveja. (Fagherazzi et al., 2017)

No mercado há uma grande variedade de lúpulos, com mais de 100 tipos, a planta atende as mais diversas exigências desde o realçar de aromas cítricos, picantes ou florais até amargores sutis ou marcantes. Caso desejado a prevalência do amargor, deve-se adquirir um lúpulo com teor de α -ácidos maior que 10%, enquanto para lúpulos aromáticos teor de α -ácidos menor que 5% (Coelho Neto, D. M. et al., 2020).

A incorporação do lúpulo pode ocorrer em diversos momentos da fervura, sendo este tempo influenciado pela receita e do lúpulo adquirido. Se o intuito for realçar o amargor, é recomendado adicionar o lúpulo logo no início da fervura a fim de favorecer a isomerização dos α -ácidos. Se o aroma for o esperado, sugere-se adicioná-lo ao final da fervura, pois isso conservaria seus compostos voláteis. (Coelho Neto, D. M. et al., 2020).

Ao atingir a temperatura de 100 °C o mosto passa a entrar em ebulição, evaporando a água em excesso, e paralelamente elimina microrganismos

competidores, coagula proteínas e desnatura as enzimas restantes do processo de mosturação (Bortoli, 2013).

Geralmente a fervura tem duração de 1 hora e pode variar conforme o estilo da bebida caso as reações de Maillard sejam desejadas. A reação de Maillard ocorre devido a alta presença de carboidrato no mosto, o que leva a formação de melanoidinas (agregam coloração ao mosto), maltol (atribui gosto caramelado) e funareol (que pode remeter a características do morango) (Coelho Neto et al., 2020).

Ao final da fervura é feita a técnica de *Whirlpool*, caracterizado pela agitação do mosto em força centrípeta, fazendo com que as partículas sólidas se acumulem. Essas partículas dão origem ao *Trub*, segundo resíduo da produção cervejeira, composto por proteínas coaguladas e sedimentos do lúpulo (Delforno, 2022).

2.2.2.5 Resfriamento

Essa etapa é realizada logo após a fervura, fazendo com que o mosto fique apropriado para o recebimento da levedura. Caso o resfriamento não seja feito de forma rápida e adequada poderá formar substâncias indesejadas e até mesmo causar contaminações microbiológicas (Morado, 2017).

O resfriamento lento do mosto pode favorecer a multiplicação de bactérias e fungos indesejáveis, comprometendo assim todo o processo (Fontoura, 2020). Esse resfriamento lento provoca também a retenção de DMS no mosto, pois como sua produção se dá pelo aumento da temperatura (e ele não será mais evaporado), todo o DMS ficará retido no mosto (Mello, 2017).

O resfriamento deve ser feito até pelo menos 26°C, podendo ser feito por trocadores de calor para escalas de produção maiores, ou banho em água gelada para pequenos volumes. Um exemplo de trocador de calor é o *chiller*, uma serpentina que pode ser feita de alumínio, aço ou cobre. O fluido refrigerante de seu interior fica circulando constantemente, o que favorece a condução térmica do mosto, além de sua estrutura ser extremamente eficiente (Fontoura, 2020).

Com isso, a fim de tornar o mosto um ambiente favorável para as leveduras, é preciso fazer sua oxigenação controlada. No início da fermentação a presença do

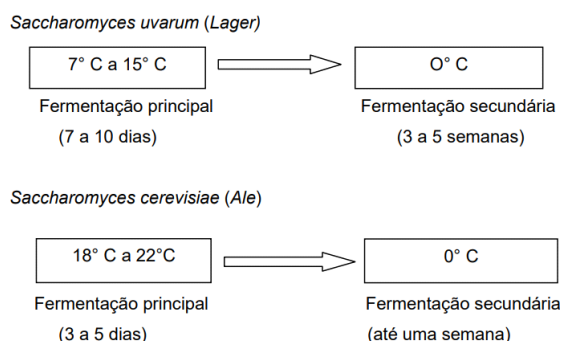
oxigênio é crucial pois auxiliará na replicação celular, diminuindo assim o tempo do processo fermentativo (Morado, 2017).

2.2.3 Fermentação

Depois do resfriamento o mosto estará apropriado para a inoculação das leveduras no tanque de fermentação. A escolha da cepa deve atender as exigências da bebida a ser produzida. Nas indústrias cervejeiras o tipo de levedura empregada dependerá do estilo a ser produzido, sendo que a levedura se adapta ao passar do tempo. Portanto, duas fábricas utilizando a mesma cepa de levedura, produzirão cervejas diferentes, uma vez que ela evolui ao meio que está introduzida (Bortoli, 2013).

Para cervejas *Ales* utiliza-se a *S. cerevisiae*, e para as do tipo *Lagers* geralmente é aplicada a *S. carlsbergensis*, sendo esta última uma hibridização da *S. cerevisiae* com outras leveduras. Além da diferente temperatura empregada, elas se diferenciam em alguns outros aspectos, entre eles, o gene MEL, que é responsável pela codificação da enzima extracelular α -galactosidase (melibiase). Por possuírem o gene MEL, as *S. carlsbergensis* são aptas a quebrar o dissacarídeo melibiose (glicose-galactose) (Bortoli, 2013).

Figura 4: Tempo de fermentação dos tipos lager e ale.



Fonte: Bortoli, 2013.

O volume ou massa a ser inoculada dependerá do número de células e da viabilidade celular presente na massa do fermento. Nesse estágio o controle de

temperatura, pressão, oxigênio e teor de açúcares são essenciais para a qualidade da bebida (Fontoura, 2020).

A aeração do mosto no início do processo é crucial, pois favorecerá o aumento da massa de leveduras, acelerando do processo. Sabe-se que a levedura é um microrganismo anaeróbio facultativo, ou seja, pode produzir ATP (Adenosina Trifosfato) pela via aeróbica ou anaeróbica. Na via aeróbica, o oxigênio combinado com a glicose gera um saldo de 38 ATP, água, massa celular e calor. Já na via anaeróbica seu saldo é de 2 ATP, etanol, CO₂ e calor, sendo, portanto, menos lucrativo energeticamente para a levedura quando comparado a via aeróbica (Nascimento, 2011).

Pode-se elencar a fermentação em três etapas. A fase lag é quando as leveduras se adaptam ao ambiente e encontram-se com baixa conversão de açúcares. Entretanto, nessa etapa já começam a consumir o oxigênio e aminoácidos dissolvidos no mosto. A seguir inicia-se a fermentação, dado pelo nome de fase exponencial, onde as leveduras irão se multiplicar e utilizar açúcares como glicose, maltose, frutose e maltotriose, excretando produtos e subprodutos conferentes de sabores característicos da cerveja. Por fim, institui-se a fase estacionária, que é quando os nutrientes do mosto são reduzidos e a taxa de conversão fica baixa. É nessa fase que as leveduras irão flocular para o fundo do tanque e entrar em estado de quase dormência (Costa, 2019).

Os açúcares fermentáveis possuem uma ordem de absorção pela levedura. Primeiramente, os açúcares menores são absorvidos, como a sacarose e a glicose. Em sequência a maltose é incorporada e por último a maltotriose (Lei, 2016). Caso a absorção desses açúcares seja incompleta o mosto ficará mais vulnerável a contaminações microbiológicas, além de representar perdas econômicas a indústria cervejeira. Ademais, o alto teor de maltotriose deve ser evitado pois faz com que a fermentação ocorra de forma lenta, levando o processo a um menor saldo de produtos (Costa, 2019).

2.2.3.1 Produtos da fermentação

Os principais produtos são o etanol e o CO₂, porém importantes subprodutos também são formados decorrentes do metabolismo da célula, como por exemplo álcoois superiores, glicerol, ésteres e ácidos (Fontoura, 2020).

Para obter o melhor desempenho das leveduras Ale (fermentação alta), é aconselhável manter a temperatura entre 15 °C e 25 °C, enquanto para as leveduras Lager (fermentação baixa), a faixa ideal é de 9 °C a 15 °C. A baixa temperatura empregada favorece a menor formação de compostos indesejados, uma vez que sua taxa de conversão é diminuída. (Morado, 2017).

A formação dos álcoois superiores auxilia na composição de aromas intencionais ou não, podendo ser influenciada conforme a composição do mosto, pH, temperatura, oxigenação e cepa empregada. A principal via de síntese desses álcoois é durante a via de metabolização dos aminoácidos, onde ela será desviada, formando oxo-ácidos. Posteriormente esses oxo-ácidos serão reduzidos a álcoois superiores (Nascimento, 2011).

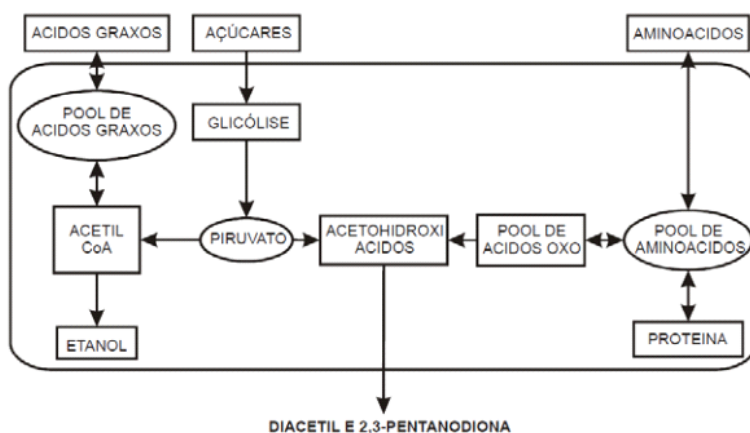
Em estudo realizado por Pereira et al. (2015), observou-se que a adição de suplementos nitrogenados (sulfato de amônio, peptona de caseína e pool de aminoácidos) demonstraram diferentes variações de formação de álcoois superiores, sendo que quanto maior o teor de nitrogênio, maior será a formação destes compostos.

Os ésteres são caracterizados por compor aromas frutados na cerveja, entretanto, podem agregar aromas ruins como o aroma de esmalte. Sua estrutura é formada pela combinação de álcool e acetil-CoA. Cada tipo de éster formado dependerá do álcool de origem. Por sua vez, a produção dos álcoois deriva da espécie de levedura utilizada. Além do tipo de levedura, variantes como teor de extrato, temperatura e concentração de células influenciará na síntese do composto (Nascimento, 2011).

As dicetonas vicinais representam uma constante preocupação aos cervejeiros pois atribuem sabor amanteigado como exemplo o diacetil (2,3-butanodiona). O aumento do diacetil está relacionado com a produção de aminoácidos valina e isoleucina. Sua rota de produção excreta alfa-aceto hidróxi-ácidos, que serão descarboxilados, dando origem ao diacetil. Na fermentação primária é inevitável a formação dessas moléculas, uma vez que a levedura não absorve esses aminoácidos mesmo estando presentes em concentrações favoráveis. A rota de formação de diacetil pode ser observada na Figura 3. (Nascimento, 2011).

Isso ocorre porque a membrana celular possui seletividade pela ordem de assimilação de aminoácidos. Os aminoácidos do grupo A (como glutamina, ácido glutâmico, arginina e serina) são assimilados rapidamente pela levedura logo no início da fermentação. No grupo B (valina, leucina e isoleucina) essa absorção ocorre de forma lenta, o que leva a síntese desses aminoácidos obrigatoriamente, formando assim os alfas-aceto hidróxi-ácidos. Posteriormente, o grupo C e D só é assimilado após o esgotamento dos aminoácidos do grupo A (Silva, 2013).

Figura 3: Formação do diacetil pela levedura.



Fonte: Nascimento, 2011.

Todavia, a redução do diacetil ocorre tardiamente na fermentação. Quando os nutrientes do meio são esgotados, a levedura começa a utilizar alternativas para a produção de ATP, como por exemplo, o próprio diacetil. Desse modo, através de enzimas redutases, o diacetil é transformado em acetoína e em seguida gera 2,3-pentanediona e 2,3-pentandiol. Essas moléculas não impactarão no aroma e sabor da cerveja como o diacetil (Nascimento, 2011).

Em relação a formação de aldeídos o mais analisado é o acetaldeído, conferente de aroma de maçã verde e espumante. A formação de acetaldeído pode ocorrer de diversas maneiras. Uma delas é durante a produção de ATP onde o piruvato é descarboxilado, originando o acetaldeído e tardiamente o etanol. Ademais, caso ocorra a oxidação de álcoois com o passar do tempo, a concentração de acetaldeído poderá

aumentar consideravelmente. Seu excesso na bebida acarreta pontos negativos pois pode causar no consumidor cefaleia, ressaca e alterações no sistema nervoso central (Silva, 2013).

A estruturação de compostos sulfurados pela levedura pode ser esperada, uma vez que o SO₂ camufla sabores de aldeídos e do E-2nonenal (sabor de papelão). Apesar disso, outros possuem desvantagens, levando a odores extremamente desagradáveis como por exemplo o H₂S (característico de contaminações microbiológicas ou de autólise de leveduras). Sua elaboração está relacionada com o teor de nutrientes do mosto, pressão do tanque, temperatura e concentração de oxigênio (Wuttke, 2018).

Pode-se observar que a produção de compostos pela levedura depende de diversos fatores como pH, pressão, temperatura, número de células e teor de oxigênio e nutrientes dissolvidos no mosto. Logo, é imprescindível a constante análise desses parâmetros para o controle de todo o processo, objetivando o equilíbrio desses compostos.

2.2.4 Maturação

Ao término da fermentação, as leveduras floculam e sedimentam para o fundo do tanque, sendo necessária sua retirada. Com isso, a temperatura diminui e inicia-se o processo de maturação da cerveja (Moretto, 2022).

A maturação possui a finalidade de refinar os sabores da cerveja, melhorar a turvação e carbonatar a cerveja. Pode-se realizar a maturação em tanques ou em barris de madeira, onde a temperatura empregada vai depender do estilo escolhido (Moretto, 2022).

O incremento de especiarias pode ser feito, como por exemplo lascas de madeiras e ingredientes conferentes de aromas. A adição de lúpulo durante a maturação (denominado *dry hopping*) é uma técnica comum feita pelos cervejeiros com a finalidade de adicionar frescor e sabores mais acentuados para a cerveja (Morado, 2017).

A presença de oxigênio é um fator de grande importância pois pode causar a oxidação de compostos gerados durante a fermentação. Devido essa problemática,

deve-se garantir a ausência do oxigênio em todos os equipamentos logo após a fermentação (Moretto, 2022).

2.2.5 Filtração

A filtração confere um aspecto límpido a cerveja pois remove resíduos de proteínas e leveduras não decantadas. Em alguns estilos, a filtração pós maturação não é empregada, como por exemplo em cervejas de trigo, que buscam uma turvação intencional (Morado, 2017).

Geralmente a filtração é feita com a terra diatomácea, um produto mineral composto pela fossilização de algas celulares, que são ricas em sílica. Ela possui um alto potencial filtrante e se apresenta como um pó fino e esbranquiçado, sendo sua dosagem feita conforme o volume de bebida a ser filtrado. Outro produto recorrido é a perlita, que também é um composto mineral originado de rochas vulcânicas (Morado, 2017).

Ao final da filtração pode ser feito a carbonatação caso o teor de CO₂ na bebida não seja satisfatório. Em seguida a cerveja estará pronta para o envase em barris, latas ou garrafas e posterior pasteurização, garantindo assim uma vida de prateleira melhor para a bebida (Morado, 2017).

2.3 Leveduras

As leveduras estão inseridas no Reino Fungi, o qual possui 5 filos Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota. As leveduras estão catalogadas no filo Ascomycota, sendo conhecido como o maior filo do Reino Fungi por possuir mais de 64 mil espécies classificadas. Elas são seres unicelulares, eucariontes e heterotróficos, ou seja, dependem do meio externo para captar nutrientes para a produção de ATP. Sua reprodução pode ocorrer de forma sexuada ou assexuada (brotamento ou gemulação) (Santos, 2015).

A forma de reprodução mais comum é a assexuada durante o processo de replicação, formando-se brotos idênticos a célula-mãe. Uma única levedura é capaz de gerar até 24 células-filhas, deixando uma cicatriz na superfície da levedura. Caso o

meio esteja desfavorável, isto é, pobre em nutrientes e oxigênio, a levedura optará pela reprodução sexuada por ascósporos (Santos, 2023).

As características morfológicas das leveduras variam conforme a espécie. A levedura mais utilizada comercialmente é a *S. cerevisiae* e sua identificação pode ser realizada por microscopia analisando sua morfologia. Ela se apresenta como uma célula ovóide e sem flagelos, podendo apresentar entre 1 e 5 μm de comprimento e 5 a 30 μm de largura. Ilustradas na Figura 4, observa-se que suas colônias são polidas e claras com bordas regulares (Santos, 2023).

Figura 4: Colônias de *S. cerevisiae* em meio de cultura.



Fonte: elaborada pela Autora (2024).

Também é possível fazer a identificação de leveduras pelas suas características bioquímicas e fisiológicas. Um exemplo seria a análise de assimilação e fermentação de diferentes substratos, uma vez que cada cepa possui capacidade de processar nutrientes específicos (Camargo, 2013).

A estrutura das leveduras é composta por membrana plasmática circundada pela parede celular, mitocôndria, núcleo, vacúolo e retículo endoplasmático. A parede celular auxilia na estruturação e proteção da célula e é composta de polissacarídeos. Já a membrana plasmática seleciona elementos que poderão ser transportados para o

interior da célula. A mitocôndria é uma organela crucial para o processo de obtenção de energia, pois realiza a respiração celular. O vacúolo medeia funções metabólicas e conserva substâncias utilizadas pela célula. O núcleo, por sua vez, armazena o material genético que contribui para o metabolismo e reprodução celular (Santos, 2023).

2.3.1 Formas de produção de ATP

A glicólise é uma via clássica chamada também de via Emden Meyerhof Parnas (EMP). Ela ocorre no citoplasma da levedura e realiza a quebra da molécula de glicose em duas moléculas de piruvato, gerando ATP. A glicólise é uma via comum da fermentação e da respiração celular, onde o destino do piruvato vai depender da concentração de oxigênio do meio. Caso ele esteja indisponível, o piruvato será transformado em lactato, já se houver oxigênio, ele será encaminhado para as mitocôndrias e oxidado a Acetil-CoA (Chandel, 2021).

São basicamente 10 etapas envolvidas no processo da glicólise, que ocorrem sem a necessidade de oxigênio, gerando um saldo de 2 ATP. A primeira fase conhecida como 'investimento energético' gasta 2 moléculas de ATP com a finalidade de quebrar a glicose em duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato. Feito isso, a segunda fase inicia, gerando 4 moléculas de ATP e 2 moléculas de piruvato, obtendo-se assim um ganho de 2 ATP ao final do ciclo (Chandel, 2021).

Além desses compostos a glicólise é capaz de formar produtos intermediários de outras rotas como via de geração de lipídeos, glicogênio e amino açúcares (Chandel, 2021). Ademais, cofatores enzimáticos como o zinco são essenciais para o funcionamento dessa via, por isso a suplementação dos meios de crescimento deve receber uma atenção extra (Russell, 1987).

A concentração de açúcar no ambiente e a presença de oxigênio são os dois principais fatores ambientais que exercem forte influência na fisiologia metabólica das leveduras. O piruvato originado pela glicólise irá ser destinado para a produção de Acetil-CoA (acetil coenzima A). Por sua vez, a Acetil-CoA pode ser produzida pela via piruvato desidrogenase (PDH) ou pela via de desvio da piruvato desidrogenase (PDH-

bypass). A via PDH ocorre dentro da mitocôndria, já a PDH-bypass no citosol da célula (Rodrigues et. al, 2005).

Desse modo, a Acetil-CoA gerada irá ser o link entre a glicólise e o ciclo de krebs (ou ciclo do ácido tricarboxílico TCA), que ocorre na mitocôndria. O TCA inclui uma série de reações bioquímicas envolvendo oito enzimas no total. O oxigênio desempenha um papel crucial no ciclo de Krebs, pois atua na cadeia transportadora de elétrons (Rodrigues et. al, 2005).

No final deste ciclo, será originado produtos como ATP, NADH e FADH₂ (transportadores de elétrons), CO₂ (liberado como subproduto da descarboxilação de moléculas) e moléculas intermediárias que serão utilizadas para outras vias metabólicas, como a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e outros compostos. Com isso, os transportadores de elétrons NADH e FADH₂ gerados nos passos anteriores fornecem elétrons para a cadeia transportadora, produzindo uma quantidade significativa de ATP através da fosforilação oxidativa. (Rodrigues et. al, 2005).

Em contrapartida, caso o oxigênio não esteja disponível no meio, a levedura optará para a fermentação alcoólica. Paralelamente ao processo aeróbio, a fermentação também necessita de um aceptor de elétrons. A fermentação pode ocorrer decorrente de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose) (Oliveira, 2011).

A partir do piruvato gerado na glicólise, um grupo carboxila é retirado e excretado como dióxido de carbono, transformando o piruvato em acetaldeído. Após isso o NADH irá se regenerar, doando elétrons ao acetaldeído, obtendo-se assim o NAD⁺ e etanol. Nesse processo é gerado 2 ATP a cada molécula de glicose (Oliveira, 2011).

O efeito Pasteur ocorre quando a levedura gera ATP na presença de oxigênio, levando a uma considerável diminuição no consumo de açúcares em comparação com a fermentação. Já o efeito Crabtree caracteriza-se pela limitação da respiração aeróbica mesmo na presença de oxigênio. Isso ocorre pois altas concentrações de glicose realizam a supressão das enzimas respiratórias. Dados evidenciam que valores maiores que 2 g/l de glicose estimulam a ativação de enzimas como descarboxilase

pirúvica e desidrogenase alcoólica, aumentando assim a fermentação alcoólica (Alves, 1994).

2.3.2 Carboidratos de reserva presentes na levedura

Durante o ciclo de vida da levedura uma parcela dos açúcares absorvidos no mosto é convertida em compostos que garantirão o funcionamento de seu metabolismo. O glicogênio e a trealose são exemplos desses compostos, atuando como reserva de carboidratos caso os nutrientes do meio sejam insuficientes. (Ferreira, 1999).

A viabilidade celular está ligada diretamente com a reserva de açúcares, portanto, é essencial que o inóculo de levedura esteja com uma boa quantidade de trealose. Desta maneira, a viabilidade celular deve estar alta, pois caso os açúcares do mosto sejam esgotados, a levedura produzirá ATP pelo catabolismo de trealose, evitando assim a autólise da levedura durante o processo de fermentação (Pulzatto, 2000).

São diversos os motivos que podem levar a levedura a consumir suas reservas de carboidratos. A escassez de nutrientes, atrelada ao aumento da temperatura e nível de etanol são fatores que podem desencadear o consumo de trealose e glicogênio (Ferreira, 1999). Além disso, ao consumir os carboidratos endógenos durante a fermentação, a produção de etanol torna-se mais vigorosa. Entretanto, deve-se realizar análises de viabilidade celular, pois caso as reservas acabem, poderá ocorrer a autólise (Pulzatto, 2000).

A fim de assegurar uma vida útil maior ao fermento, o estoque de açúcares deve ser elevado. Para garantir a eficácia do armazenamento, é crucial reutilizar a levedura dentro do período de 24 a 48 horas após a coleta, já que o glicogênio é rapidamente consumido nesse intervalo. A velocidade desse consumo depende de diversos fatores, como a linhagem da levedura e as condições de utilização (Oliveira, 2011).

2.3.3 Aumento da biomassa de leveduras

Pela sua elevada utilização industrial, a propagação de fermento é um setor em ascensão. Somente em 2020, este mercado movimentou US\$ 3.9 bilhões e deve atingir US\$ 8.1 bilhões até 2028, sendo a Europa a principal representante deste mercado (Exactitude Consultancy, 2022).

Embora a levedura *S. cerevisiae* se reproduza nos mais diversos meios, ela é extremamente sensível a variações no ambiente de crescimento, e dependendo da espécie da levedura, opta-se por determinada rota metabólica e de reprodução. Como visto, a taxa de oxigênio e açúcares é determinante em como essa levedura irá se comportar. Para uma boa taxa de replicação, o meio deve estar rico em nutrientes em concentrações adequadas para não causar estresse osmótico (Russell, 1987).

Para que uma boa propagação seja feita, a forma de estocagem do fermento empregada é crucial, e deve permitir a preservação da fisiologia da levedura. A criopreservação em nitrogênio líquido com crioprotetor glicerol é um excelente meio de armazenamento, permitindo que a cultura seja mantida por mais de 6 meses, embora exija protocolos rígidos. Neste processo é importante que a cultura seja resfriada cuidadosamente por 2 horas, até atingir -30°C , e só então ser emergida em nitrogênio líquido a -196°C , garantindo assim que a viabilidade celular e a estabilidade genética sejam preservadas. A higienização dos propagadores também é outro fator determinante para uma eficiente propagação. Para isso, os equipamentos devem ser projetados de forma a facilitar a limpeza e esterilização por vapor e CIP (Quain, 2006).

2.3.4 Nutrição da levedura

Os açúcares possuem papel essencial pois fornecem carbono, nitrogênio e hidrogênio, além de prover energia para a célula. O carbono é essencial, constituindo mais de 50% do peso seco da levedura (Russell, 1987). Na Figura 5 observa-se quais as possíveis fontes de carbono assimiláveis pela *S. cerevisiae*.

Figura 5: fontes de carbono utilizadas pela *S. cerevisiae*

D-glucose	sucrose
D-galactose	raffinose
mannose	trehalose
fructose	deoxyribose
melibiose	maltotriose
melezitose	starch(?)
glycerol	D-glucitol
D-mannitol	DL-lactate
ethanol	succinate
D-glucono-1-5-lactone	Me- α -D-glucoside

Fonte: Russell, 1987.

Ainda em relação aos nutrientes, o nitrogênio também é crucial para a replicação da levedura pois está envolvido na síntese de aminoácidos e nucleotídeos. As fontes de nitrogênio capazes de serem metabolizadas são variadas, podendo partir de moléculas inorgânicas, aminoácidos, peptídeos, misturas de aminoácidos (como caseína hidrolisada), ureia e bases nitrogenadas. Todavia, como discorrido no item **2.2.3.1**, algumas moléculas terão prioridade de absorção. Isso acontece porque a levedura prioriza a fontes de nitrogênio mais eficientes, usando como critério de absorção a taxa de repressão causada e concentração de metabólitos gerados. Por exemplo, uma fonte de nitrogênio melhor, como o glutamato, exclui a utilização de fontes mais pobres, como a prolina, dentro das células (Russell, 1987).

Outro composto importante é o fósforo, atuando na composição dos reservatórios energéticos, síntese de lipídeos e regulação metabólica. Ele é bem absorvido na forma de dihidrogenofosfato. Já o potássio é encontrado em grandes quantidades na levedura devido sua importância fisiológica. O potássio age como regulador de cátions intracelulares, atua como cofator enzimático para diversas enzimas como piruvato quinase, aldeído desidrogenase e ATPase de membrana, além de ser uma parte integrante da estrutura do RNA (Russell, 1987).

Assim como o potássio, o magnésio também atua como cofator enzimático em mais de 100 enzimas. Ele possui participação fundamental na parte estrutural, estando

presente nos ribossomos, membranas e ácidos nucleicos. Ele geralmente é absorvido através de cloreto de magnésio e sulfato de magnésio. Para que haja um bom crescimento celular, os níveis de magnésio devem estar satisfatórios assim como o de zinco, posto que ele também funciona como cofator enzimático de várias enzimas envolvidas no processo de replicação (Russell, 1987). A quantidade ideal de zinco é de 0.5 ppm por litro (Casselman, 2005).

Outros componentes como cloro, sódio, bário e ferro também são importantes para uma boa nutrição celular. Para um bom rendimento, é interessante a presença de vitaminas como inositol, tiamina, piridoxina, pantotenato e biotina, por exemplo. Entre as diversas funções das vitaminas, algumas delas servem como cofatores enzimáticos, auxiliando a metabolização de diversos produtos. Outro caso seria a tiamina, que influencia na competência respiratória, formação de ácidos graxos, esterol e lipídios, na glicólise e produção de etanol (Russell, 1987). Na Figura 6 é possível verificar algumas das vitaminas utilizadas pela *S. cerevisiae* e suas respectivas concentrações desejáveis no meio.

Figura 6: Vitaminas utilizadas pela *S. cerevisiae*

	Requirement (mg l ⁻¹)
inositol	125
Ca-pantothenate	6.25
pyridoxine HCl	6.25
thiamine HCl	5
nicotinic acid	5
biotin	1

Fonte: Russell, 1987.

Em suma, a presença de nutrientes e compostos inorgânicos é imprescindível para um bom crescimento celular, entretanto, caso esses itens estejam em demasia, o efeito inibitório poderá ocorrer.

2.3.5 Fatores que influenciam na propagação de leveduras

Sabe-se que a espécie *S. cerevisiae* é tolerante a pH reduzidos, elevadas temperaturas e alta concentração de etanol no meio. Entretanto, quando se objetiva a replicação, o excesso de etanol pode atrapalhar o processo e até mesmo favorecer contaminações por bactérias acéticas (MENDES et al., 2013). Portanto, assim como na fermentação o controle da temperatura, oxigenação, pH e composição do mosto é fundamental para um bom rendimento do processo (Ezaka et al., 2021).

A temperatura empregada no processo varia de acordo com a espécie de interesse, sendo empregado faixas de 20 a 30°C em sua maioria. Todavia, se os demais parâmetros não estiverem favoráveis, a faixa de temperatura tolerável pela levedura pode ser diminuída (Ezaka et al., 2021). Ao elevar a temperatura do meio, uma proliferação acelerada poderá ocorrer, porém, isso prejudica a viabilidade das células geradas. Por exemplo, leveduras do tipo Lager costumam ser mais sensíveis a temperaturas maiores que 30°C, pois causa uma baixa produção de ácidos graxos insaturados, formando membranas celulares frágeis (Condi, 2022).

A oxigenação do meio deve ser realizada a fim de melhorar a velocidade de crescimento da massa celular, já que o saldo energético por mol de glicose é maior quando comparado ao processo anaeróbio. O oxigênio pode ser introduzido através de um agitador magnético ou por uma bomba de ar com filtro estéril. Como discorrido no item **2.3.1**, somente o oxigênio não é determinante para uma respiração aeróbica, já que elevadas concentrações de glicose levam ao efeito Crabtree. Em suma, as concentrações ideais de açúcares são de 2-3% (p/v) (Condi, 2022).

A faixa de pH utilizada é geralmente de 4 a 6, podendo variar conforme a espécie da levedura. Ao decorrer do processo, o pH poderá ser reduzido devido a excreção de ácidos pela levedura. Essa queda do pH pode ser favorável, auxiliando a prevenção de contaminações bacterianas, já que a maioria dos microrganismos não resistem ao pH ácido (Casselman, 2005).

Além dos fatores ambientais, a viabilidade e vitalidade da levedura são parâmetros que devem ser considerados para um bom rendimento na propagação. O estresse da levedura está ligado diretamente com sua viabilidade. Por exemplo, as

reservas de trealose, além de servirem de reserva energética, protegem a célula de fatores causadores de estresse (auxiliando a regulação osmótica) (Cherubin, 2003).

3 . OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Realizar método de propagação de levedura *S. cerevisiae*.

3.2 Objetivos específicos

- Replicar levedura *S. cerevisiae* a partir de leveduras secas em meio de cultura simples com aeração.
- Realizar análises para verificação de aumento da biomassa, viabilidade das células replicadas, porcentagem de brotamento e população de leveduras por mL.

4 . MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e equipamentos utilizados no presente estudo foram balança analítica, autoclave, agitador magnético, pHmetro, sacarímetro, microscópio óptico, tubos de ensaio, beakers, pipetas, erlenmeyer de vidro borossilicato, câmara de Neubauer e lamínula.

4.1 Levedura e meio de cultura

Foi utilizado fermento seco (Fleischmann) constituído de células de levedura *S. cerevisiae*, contendo 10g de massa seca. O meio de cultura empregado foi o extrato de malte DME (Dry Malt Extract) Dry Brew, composto exclusivamente de malte pilsen, rico em açúcares fermentescíveis.

Primeiramente, foi feito o preparo do meio de cultura DME, usando a proporção de 1:10, conforme descrito em White et.al, 2020 (p. 158-175). Pesou-se em balança analítica 100,2643 g de DME, e diluído em 1000 mL de água destilada. A solução foi autoclavada, a fim de garantir a segurança microbiológica do processo.

Para a reidratação da levedura foi necessário utilizar água estéril, também na proporção 1:10. Portanto, ao utilizar 10g de leveduras seca, foi gasto 100mL de água. Esta etapa requiere cuidado e delicadeza, devendo trabalhar em campo estéril, e em temperatura controlada da água de reidratação. Próximo a chama de bico de bunsen, a levedura foi polvilhada sobre a água na temperatura de 39°C, deixando hidratar por 15 minutos. Após, foi agitado delicadamente, até formar creme, o qual ficou em repouso por mais 45 minutos. O processo pode ser observado na Figura 7. (White et.al, 2020 (p. 158-175).

Figura 7: processo de reidratação de leveduras secas.



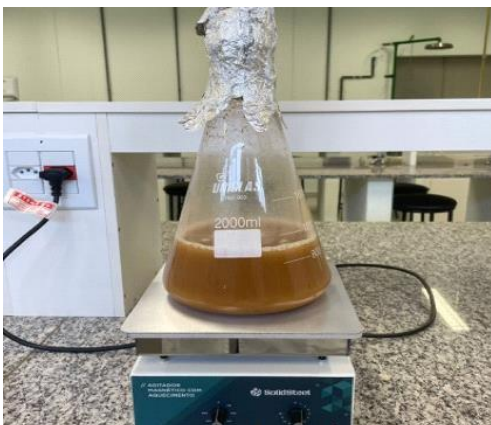
Fonte: elaborada pela autora (2024).

4.2 Propagador

A propagação de leveduras a partir de um pequeno número de células deve começar com pequenos volumes, a fim de evitar que contaminações ocorram e prejudiquem todo o processo subsequente. Na propagação em escala laboratorial tem-se como objetivo aumentar o número de células de forma saudável e aeróbio. Para isso, é empregado um propagador de fácil higienização, e que permita o controle de temperatura e aeração do meio (Condi, 2022).

Desse modo, para que todos os requisitos fossem atendidos, foi utilizado como propagador um erlenmeyer de vidro borossilicato de volume de 2000 mL e um agitador magnético. Durante todo o período de propagação, foi deixado papel alumínio com algodão no gargalo do erlenmeyer, para evitar que partículas estranhas e sujidades adentrassem no propagador. Na Figura 8 pode-se observar o propagador em funcionamento. (White et.al, 2020).

Figura 8: propagador com agitador magnético



Fonte: elaborada pela autora (2024).

Após preparo do creme de levedura, este foi inoculado no meio de cultura já em temperatura ambiente e deixado em agitação contínua por 24 horas.

4.3 Análises do meio de cultura

Foram realizadas análises de pH e teor de açúcares. Para isso, foi retirado uma alíquota de 30 mL antes da inoculação do creme de leveduras.

Para a análise de pH foi utilizado um aparelho digital pHmetro, devidamente calibrado.

Já para a análise de açúcares, foi utilizado um refratômetro, que forneceu valores em grau brix da solução analisada.

4.4 Testes de propagação

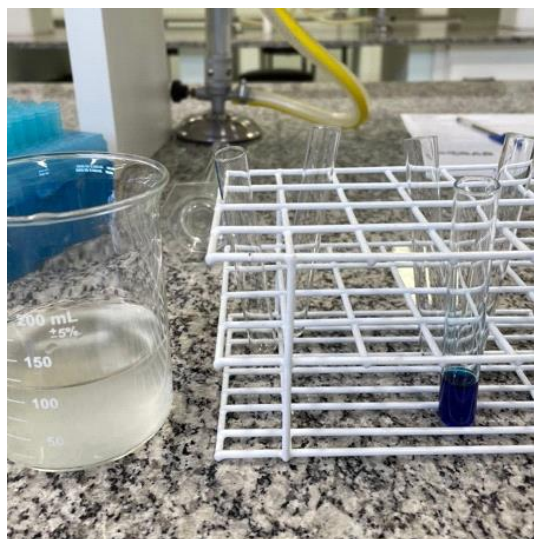
Para avaliar a rentabilidade do processo, é essencial realizar testes de propagação. Nesse aspecto, foram realizadas análises de contagem do número de células, viabilidade celular e cálculo do aumento da biomassa pós propagação.

4.4.1 Contagem do número de células e viabilidade celular

Para realizar a contagem do número de células e a viabilidade celular, primeiramente foi feita uma diluição simples de 9 mL de água destilada em 1 mL de amostra. Na Figura 9 é possível verificar a diluição da amostra.

Após homogeneização, foi feita a mistura de partes iguais de 1 mL da diluição e azul de metileno 2% em tubo de ensaio. O azul de metileno age como um importante reagente para a análise da viabilidade celular, uma vez que possui a capacidade de penetrar células fisiologicamente inativas, incapazes selecionar elementos que irão permear a membrana celular (Antonini, 2010).

Figura 9: Diluição da amostra.

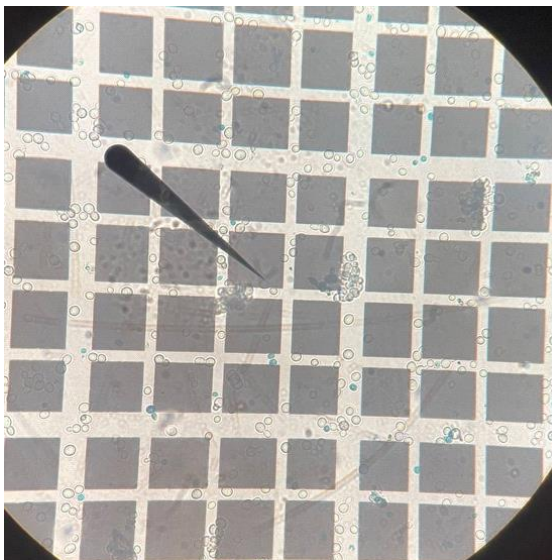


Fonte: elaborada pela autora (2024).

Em seguida, foi pipetado a solução em câmara de Neubauer e analisado em microscópio óptico em objetiva de aumento 100x, podendo ser averiguado na Figura 10.

Após localização das células, foi realizada a contagem das células presentes nos quatro retículos centrais dos 25 quadrículos, diferenciando as células coradas de azul.

Figura 10: Foto de câmara de Neubauer de leveduras *S. cerevisiae* em teste de viabilidade celular.



Fonte: elaborada pela autora (2024)

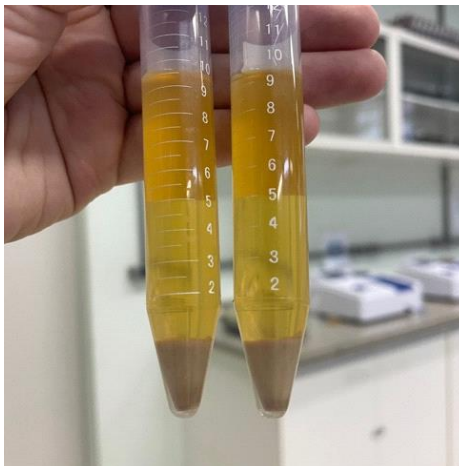
Foi então registrado o número de células vivas, células em brotamento e células mortas.

4.4.2 Teste de aumento de biomassa

Para cálculo de aumento de biomassa, foi necessário retirar uma amostra de 10 mL do propagador e transferi-lo para tubo de centrifugação.

Após balancear o peso dos tubos, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 4.000 rpm. Ao final do processo, obteve-se as amostras, sendo possível analisar na Figura 11.

Figura 11: amostra centrifugada.



Fonte: elaborada pela autora (2024).

Desse modo, foi retirado o sobrenadante e pesado a massa de leveduras em balança analítica.

4.5 Cálculos

4.5.1 Viabilidade celular

Para o cálculo de viabilidade celular foi considerado o número total de células viáveis e não viáveis, sendo utilizada a Equação (1)

Equação (1)

$$\%Cél. Viáveis = (Total\ de\ células\ viáveis / Total\ cél. Viáveis + não\ viáveis) \times 100\%$$

A equação 2 foi utilizada para o cálculo

4.5.2 População de leveduras

Foi também calculado a população de leveduras por mL, utilizando a contagem total de células. A equação 2 foi utilizada para o cálculo.

Equação (2)

Populaçãolev./mL

$$= (População\ de\ Leveduras\ Total\ de\ cel.\ Viáveis \times 4000 \\ /total\ de\ retículos\ contados) \times 1000 \times Diluição\ final$$

4.5.3 Células em brotamento

O cálculo da contagem de células em processo de brotamento revela a proporção de leveduras ativas se reproduzindo, e foi determinada usando a Equação (3)

Equação (3)

Brotamento(%)

$$= (Total\ de\ células\ viáveis\ sem\ brotamento / Total\ de\ células\ viáveis) \times 100$$

4.5.3 Aumento da biomassa

O rendimento do aumento de biomassa foi determinado pela Equação (4), utilizando fator de correção de 0,25, uma vez que o centrifugado não foi submetido ao método de secagem (Pulzatto, 2000).

Equação (4)

$$Aumento\ biomassa\ (em\ gramas) = (peso\ centrifugado \times 1000 / 10) - 10 \times 0,25$$

%Aumento biomassa

$$= Aumento\ biomassa(em\ gramas) \\ / peso\ inoculado(em\ gramas) \times 100$$

Apresentou o resultado

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A solução de DME produzida foi analisada, e o pH de 4,7 foi apresentado, sendo considerado como ideal, conforme descrito por Casselman em 2005. Além disso, no

estudo conduzido por Mendes (2013), foram encontrados valores de pH próximos ($5,9 \pm 0,9$) utilizando meio agroindustrial (caldo de cana de açúcar e extrato de leveduras).

Em relação a concentração de açúcares no meio, foi entregue o resultado de 9 °Brix, com densidade igual a 1,036.

Os resultados obtidos nas análises de viabilidade celular, porcentagem de brotamento, população de leveduras por mL e aumento da biomassa de leveduras realizadas após a propagação celular, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Resultados das análises pós propagação

% Cél. Viáveis	População lev./mL	Brotamento (%)	Aumento biomassa (em gramas)
91,98%	6,6 milhões/mL	10,89 %	16,81 g

Fonte: elaborada pela autora (2024)

Para garantia de uma taxa de viabilidade celular satisfatória, além do meio, a genética é um fator decisivo sobre a eficiência e adaptabilidade da levedura. Para uma seleção estratégica da linhagem do microrganismo, Antonini (2012) recomenda realizar estudos minuciosos de seleção nas dornas de fermentação, e priorizar cepas que possuem características de baixa formação de espuma, altos níveis de trealose e glicogênio e baixa formação de glicerol durante os testes de fermentação.

Além da genética, a composição do mosto e o teor de oxigênio dissolvido é essencial para uma boa produtividade. O autor Mendes, (2013), realizou estudos sobre o aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semi contínuo, e concluiu que propagações feitas com aeração e suplementação em escala semi contínua, promove um melhor desempenho em quesitos de viabilidade e produção de biomassa.

No estudo citado, o processo descontínuo com aeração obteve resultados de $96 \pm 8\%$ de viabilidade celular, enquanto no presente estudo, obteve-se um valor de 91,98% de viabilidade. A discrepância observada pode ser atribuída a uma variedade de fatores, entretanto em especial a ausência de suplementação do meio de cultura.

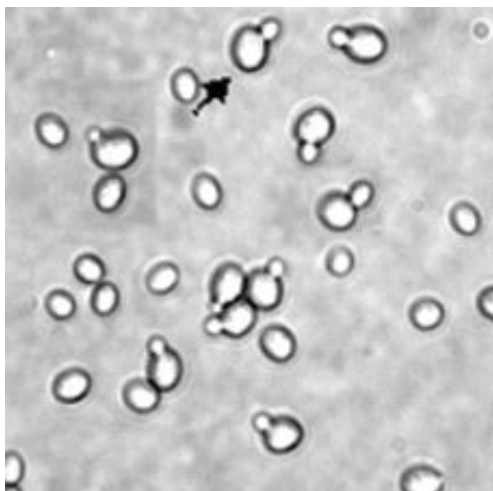
Ademais, o teste de viabilidade realizado com o corante azul de metileno é amplamente utilizado por cervejeiros, atuando como um bom indicador de atividade celular da levedura. Todavia, de acordo com os autores Reed e Nagodawithana (1991), este método pode não ser preciso quando aplicado a uma baixa população de leveduras.

Outros fatores que podem reduzir a viabilidade celular durante a replicação ou fermentação são as concentrações tóxicas de alumínio e potássio. O alumínio secretado pela levedura, modifica-se, por sua vez, em uma forma prejudicial (Al^{+3}) devido a acidez do mosto, impactando negativamente nos níveis de trealose e viabilidade celular. Este cenário pode ser revertido com a dosagem de magnésio no meio (Antonini, 2012).

Em relação ao brotamento, observou-se a taxa de 10,89 % de brotamento, indicando as células que estão em atividade de replicação. Na fase de replicação, os ácidos nucleicos atingem concentrações elevadas, devido a necessidade de produção de material genético para a célula filha. Nesse caso, a quantidade de RNA pode representar até um terço da quantidade total de proteínas, sendo de 50 a 100 vezes maior do que a quantidade de DNA (Pulzatto, 2000).

A gemulação ou brotamento é o método mais comum de crescimento vegetativo em leveduras. Durante este processo, a célula parental desenvolve o broto em sua superfície externa, e ao se desenvolver, o núcleo da célula mãe se divide, transferindo um dos núcleos para o broto. Conforme o material da parede celular é produzido, o broto desprende-se da célula parental, resultando na separação eventual, podendo ser verificado na Figura 12 (Antonini, 2012).

Figura 12: células em brotamento.



Fonte: Antonini, 2012.

Para produção de cerveja e vinho, os níveis de inoculação empregados geralmente estão na faixa de $2-10 \times 10^6$ células por mililitro (Reed e Nagodawithana, 1991). O valor observado na contagem de células por mL na análise deste estudo, foi de 6,6 milhões/mL.

Devido ao longo tempo de fermentação nos tanques de cervejarias, as células se replicam, podendo ser recicladas conforme a viabilidade celular ótima. Apesar disso, ressalta-se a importância da etapa laboratorial de cultivo, pois caso a quantidade inoculada de células não seja suficiente, a proliferação de microrganismos competidores será facilitada (Reed e Nagodawithana, 1991).

A análise de aumento da biomassa de leveduras no presente estudo não foi submetido ao processo de secagem em estufa, método comumente observado em estudos que visam determinar a porcentagem de matéria seca. Devido isso, foi preciso utilizar o fator de correção de 25% sobre o centrifugado de leveduras (Pulzatto, 2000). Feito isso, apurou-se o resultado de 16,81 gramas de massa seca de novas células, tendo, portanto, um rendimento de 168,1% sobre o peso inoculado.

De acordo com Pulzatto (2000), a biomassa de levedura seca é composta basicamente de proteínas, ácidos nucleicos (nucleotídeos), lipídeos, cinzas, carboidratos e vitaminas. Por exemplo, leveduras de panificação apresentam

aproximadamente 25% de matéria seca, sendo que o teor de proteína bruta, pode variar de 40 a 56% do valor total da matéria seca. A concentração dessas substâncias poderá variar conforme o meio de crescimento, principalmente quando se trata de proteínas e lipídeos. (Pulzatto, 2000).

Vale evidenciar que neste estudo suplementos como nitrogênio e íons essenciais, (como por exemplo o zinco), não foram adicionados, com o intuito de simular uma propagação simples, utilizando somente o extrato de malte. Este fator pode ter influenciado numa baixa viabilidade celular.

Apesar do estudo atual ter apresentado resultados satisfatórios em termos de rendimento, produtores de cachaça de pequena escala têm recorrido ao uso do fubá como suplemento, buscando aumentar a quantidade de proteínas e açúcares fermentáveis no meio, obtendo assim maiores quantidades de biomassa. Outro produto que pode ser utilizado como suplemento é o extrato de leveduras, atuando como um ótimo fornecedor de nutrientes essenciais, podendo obter resultados satisfatórios no aumento de biomassa (MENDES, T. A. O. et al.).

6. CONCLUSÃO E SUGESTÃO PARA FUTUROS ESTUDOS

Com base nas análises realizadas, averigua-se que o estudo foi executado de forma satisfatória, demonstrando resultados consistentes em relação ao pH, taxa de brotamento e aumento da biomassa de leveduras.

Em relação a viabilidade celular, é coerente que a suplementação do meio de cultura é imprescindível para uma boa saúde das leveduras. Em trabalhos futuros será interessante realizar estudos aprofundados sobre a suplementação do meio de propagação de leveduras e como ele pode afetar a rentabilidade do processo.

Sendo assim, fica evidente que os valores obtidos em estudo se alinham com referências prévias, e fornecem uma base sólida para entender os processos de replicação celular realizadas em escala laboratorial.

REFERÊNCIAS:

ANTÔNIO, William Faria. **Influência de diferentes estirpes da *Saccharomyces Cerevisiae* na fermentação da cerveja**. 2021. Tese (Bacharel em Farmácia) - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, [S. l.], 2021.

ALVES, DENISE MARIA GÂNDARA. **FATORES QUE AFETAM A FORMAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS BEM COMO OUTROS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**. 1994. Dissertação (Engenheira Agrônoma Mestre em Ciência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, [S. l.], 1994. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-20210917-161601/publico/AlvesDeniseMariaGandara.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

ANTONINI, Sandra Regina Ceccato. **Microbiologia da fermentação alcoólica**. [S. l.]: EDUFSCAR, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/277125475_Microbiologia_da_fermentacao_alcoolica_a_importancia_do_monitoramento_microbiologico_em_destilarias. Acesso em: 1 abr. 2024.

BARCELLOS, YVIE CAROLINNE MEDEIROS *et al.* **Análise e Simulação das Operações de Mosturação e Fermentação no Processo de Produção de Cervejas**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenheiro Químico) - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/bitstream/handle/1/1624/Projeto%20Final%20-%20Yvie%20e%20Jean.pdf?sequence=1>. Acesso em: 6 mar. 2024.

BERRY, D. R. *et al.* **Yeast Biotechnology**. [S. l.: s. n.], 1987.

BEKATOROU, Argyro. Production of Food Grade Yeasts. **Food Technol. Biotechnol.**, [s. l.], p. 407–415, 2006.

BOAVENTURA, Joana. **Optimização do Processo de Filtração de Cerveja**. 2009. Tese de Mestrado (Mestrado Integrado em Engenharia Química) - Universidade do Porto, [S. l.], 2009. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/60254/1/000136497.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

BORTOLI, Daiane A. da S. *et al.* Leveduras e produção de cervejas - Revisão. **Diálogos**, [S. l.], p. 45-58, 1 jan. 2013.

BONACCORSI, Mauro Manzali. **Guia de estilos de cervejas BJCP 2015**. [S. l.: s. n.], 2016.

Brasil. Presidência da República. Decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm. Acesso em: 6 mar. 2024.

BUSCH, J. More Beer. 2015. Disponível em: <https://www.morebeer.com/articles/advancedmasching>>. Acesso em: 8 jan. 2024.

CAMARGO , JANINA ZANONI. **ESTUDO DA FIOLOGIA DE DIFERENTES LEVEDURAS INDUSTRIAIS E ISOLADAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE**. 2001. Dissertação de mestrado (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) - UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS, [S. l.], 2001. Disponível em: <https://repositorio.ufgd.edu.br/jspui/bitstream/prefix/863/1/JaninaZanoniCamargo.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

Casselman, R. (2004). Yeast Propagation and Maintenance : Principles and Practices by MB. : California: The maltose falcons. <https://www.semanticscholar.org/paper/Yeast-Propagation-and-Maintenance-%3A-Principles-and-Raines/Casselman/e5e8ea0b5a6e5bc0d41a3cec881e26a84d0e4d6c>

COELHO NETO, D. M. *et al.* Conceitos Químicos Envolvidos na Produção da Cerveja: Uma Revisão. **Rev. Virtual de Química**, [s. l.], p. 120-147, 10 fev. 2020.

CAMPOS, Anna Clara Silva. **Estudo sobre o desenvolvimento de cervejas utilizando fermentação consorciada entre bactérias do ácido láctico e levedura isolada de alambique de cachaça**. 2017. Dissertação (Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, [S. l.], 2017.

CONDI, Sabrina Ciane. **Variáveis aplicadas à propagação de leveduras de Qualidade para produção de cerveja: Uma revisão**. 2022. Tese (Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental) - Universidade Estadual de Maringá, [S. l.], 2022.

CHERUBIN, Rudimar Antônio. **Efeitos da Viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. Tese (Curso Agronomia) -

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, [S. /], 2003. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-10092003-144216/publico/rudimar.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

COSTA, PEDRO SGOBBI PARANHOS. **ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DE CERVEJAS ALE E LAGER**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de graduação em Biotecnologia.) - Universidade Federal de Uberlândia, [S. /], 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/27832/4/EstudoFermentaçãoCervejas.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

DIAS, Ingrid da Silva. A História do surgimento da Microbiologia: Fatos Marcantes. **A História do surgimento da Microbiologia: Fatos Marcantes**, [S. /], p. ., 30 mar. 2016. Disponível em: <https://www.microbiologia.ufri.br/a-historia-do-surgimento-da-microbiologia-fatos-marcantes/>. Acesso em: 4 abr. 2024.

ELIFE. The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. **The natural history of model organisms**, [s. /], 1 abr. 2015.

EZAKA, E. *et al.* Effects of Environmental factors on the Growth and Proliferation of Yeasts. **Nigerian Journal of Biotechnology**, [S. /], p. Vol. 38 No. 1, 28 jul. 2021. DOI 10.4314/njb.v38i1.20. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/njb/article/view/211342>. Acesso em: 6 mar. 2024.

FAGHERAZZI, Mariana Mendes *et al.* A cultura do lúpulo: botânica e variedades. **REVISTA AGRONOMIA BRASILEIRA**, [s. /], v. 1, 31 out. 2017. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/laboratoriodematologia/agronomiabrasileira/rab201712rdoi.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2024.

FARINI , Bruna Wadt *et al.* “JANDB – Desenvolvimento de uma “Cerveja” de Malte de Arroz”. **Revista da Graduação**, [S. l.], p. 1-21, 19 dez. 2019. Disponível em: <https://revistaseletronicas.pucrs.br/index.php/graduacao/article/view/26122>. Acesso em: 6 mar. 2024.

FERREIRA, L.V. *et al.* Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Sci. Technol** , [s. l.], 1 jan. 1999. DOI <https://doi.org/10.1590/S0101-20611999000100008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/f75GzSBFhM9dfbKTnsZQQNk/?lang=pt>. Acesso em: 6 mar. 2024.

FONTOURA, JOSÉ FELIPE GARCIAS. **PROJETO DE UM SISTEMA DE RESFRIAMENTO DE MOSTO CERVEJEIRO PARA MICROCERVEJARIAS**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Produção) - Universidade Federal do Pampa, [S. l.], 2020. Disponível em: https://dspace.unipampa.edu.br/bitstream/riu/6061/1/TCC_Jose_Felipe_Garcias_da_Fontoura.pdf. Acesso em: 6 mar. 2024.

GOLDAMMER, Ted. **The Brewer's Handbook**. 3. ed. [S. l.]: Apex, 2022.

Gomaa, Ahmed. 2018. Application of Enzymes in Brewing. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/323252887_Application_of_Enzymes_in_Brewing. DOI 10.5281/zenodo.3336203. Acesso em: 6 mar. 2024.

HANDEL, Navdeep S. Glycolysis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, [s. l.], 2021. DOI 10.1101/cshperspect.a040535. Disponível em:

<https://cshperspectives.cshlp.org/content/13/5/a040535.full.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

HONGJIE, Lei *et al.* Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations. **The Society for Biotechnology**, [S. l.], p. 583-588, 18 jun. 2016. DOI 10.1016/j.jbiosc.2016.05.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27329414/>. Acesso em: 6 mar. 2024.

HORNINK, Gabriel Gerber. **Princípios da produção cervejeira e as enzimas na mosturação**. 1. ed. rev. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=v2FwEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA7&dq=mosturação+&ots=xWwClS7FuZ&sig=IGZaY2voXFvjDhyl5plqYWJleF0#v=onepage&q=mosturação&f=false>. Acesso em: 6 mar. 2024.

IN, Man-Jin. Downstream Process for the Production of Yeast Extract Using Brewer's Yeast Cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [S. l.], p. 85-90, 2015.

LEI, Hongjie. Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 122, ed. 5, p. 583-588. 2016.

LOPES, Mario Lucio *et al.* Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], 25 out. 2016.

MALTA, Hélia Lucila. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. 2006.

Dissertação/Tese (PósGraduação em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia na Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2006. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/MBSA-6XWFAD/1/diss_versao_final.pdf. Acesso em: 6 mar. 2024.

MELLO, LIVIA SILVA SIMÕES *et al.* **ESTUDO DE CERVEJAS ÁCIDAS**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Engenharia Química, oferecido pelo departamento de Engenharia Química e de Petróleo da Escola de Engenharia da Universidade Federal Fluminense) - Bacharelado, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/bitstream/handle/1/5729/TCC%20-%20L%C3%ADvia%20e%20Vinicius.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 1 abr. 2024.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA – MAPA. **Anuário da Cerveja**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/anuario-da-cerveja-2022/>. Acesso em: 6 mar. 2024.

MORADO, Ronaldo. **Larousse da cerveja**. [S. l.: s. n.], 2017.

MORETTO, João Luiz Mendes Lima. **Maturação de cervejas – o estado da arte**. 2022. Trabalho de Conclusão do Curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, [S. l.], 2022. Disponível em: https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/234042/TCC_V5%20Joao%20Luiz%20M%20L%20Moretto.pdf?sequence=1. Acesso em: 6 mar. 2024.

NASCIMENTO, Júnior. **ESTUDO DO EFEITO DA AERAÇÃO DO MOSTO NAS CARACTERÍSTICAS DO PROCESSO CERVEJEIRO**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Química) - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Escola de Engenharia de Lorena, [S. l.], 2011. Disponível em: <https://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/monografias/2011/MEQ11006.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

OLIVEIRA, Nayara Aline Muniz. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja**. 2011. Tese (Especialista em Microbiologia Ambiental e Industrial) - Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2011.

OLIVEIRA, Roger Assis. **Secagem por atomização da biomassa de levedura proveniente da indústria de cervejaria: análise da qualidade do produto**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Paulo, DIADEMA, 2018.

PAULA, Arlete Rodrigues Vieira *et al.* Cerveja e sociedade. **Contextos da Alimentação**, [S. l.], v. 4, n. 2, 2016. Disponível em: https://www3.sp.senac.br/hotsites/blogs/revistacontextos/wp-content/uploads/2016/03/73_CA_artigo_revisado.pdf. Acesso em: 6 mar. 2024.

PULZATTO, Márcia Edilamar. **Fatores que influem na obtenção de biomassa de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) da fermentação alcoólica**. 2000. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MENDES, Tiago Antônio de Oliveira *et al.* Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 81-89, 1 abr. 2013.

PEREIRA, A. F. *et al.* ADIÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO E DE DUAS LINHAGENS DE LEVEDURA NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA. **Revista de Engenharia Química e Química - REQ**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2015. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/13948/1/23-186-1-PB.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

RAMOS, Giselle Rossi Vasconcelos *et al.* Caracterização química do autolisado de levedura de alambique e avaliação da aceitabilidade do pão de queijo adicionado do autolisado desidratado. **Revista de Nutrição**, [s. l.], p. 473-484, 1 jun. 2011.

RAINES-CASSELMAN, M.B. Yeast Propagation and Maintenance: Principles and Practices.

REBELLO, Flávia De Floriani Pozza. Produção de cerveja. **Revista Agrogeoambiental**, [S. l.], p. 109-119, 1 dez. 2009.

RODRIGUES, FERNANDO *et al.* Sugar Metabolism in Yeasts. **An Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism**, Clinical Mycology Group, Life and Health Sciences Research Institute, Health Sciences School, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal, p. 101-122, 23 jul. 2005. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/6231/1/Ch06.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

RUSSELL , David R Berry. **Yeast Biotechnology**. [S. l.: s. n.], 1987.

SAMMARTINO, Mark. Enzymes in Brewing. **Enzymes in Brewing** , MBAA TQ, v. 52, n. 3, p. 156-164, 16 jul. 2015. Disponível em:
<https://pt.scribd.com/document/458110370/Enzymes-in-Brewing1>. Acesso em: 6 abr. 2024.

SANTIN, Ana Paula. **Estudo da secagem e da inativação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 1996. Dissertação (Mestre em Engenharia Química no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, FLORIANÓPOLIS, 1996.

SANTOS, Elisandro Ricardo Drechsler. **Material Complementar ao livro Sistemática Vegetal I: Fungos**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em:
<https://antigo.uab.ufsc.br/biologia//files/2020/08/Fungos.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SANTOS, S. P. Os Primórdios da Cerveja no Brasil. Ateliê Editorial. 1 ed, Cotia, 2003.

SANTOS, Dayane de Souza. A obtenção da levedura seca através do método SPRAY-DRYER. 2023. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Química Tecnológica e Industrial) - Universidade Federal de Alagoas, [S. l.], 2023.

SALIMBENI, JULIANA FARIA *et al.* **CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA E SUA INFLUÊNCIA SENSORIAL PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) - Universidade

São Francisco, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://lyceumononline.usf.edu.br/salavirtual/documentos/2862.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SCAGLIONI, Priscila Tessmer. **Ensino e Pesquisa no Campo da Engenharia e da Tecnologia de Alimentos 2**. [S. l.]: Atena, 2021.

SINDICERV. **O setor em números**. Disponível em: <https://www.sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros/>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SHINYA, Thaís Yumi. **Bioprocessos para produção de biomassa de levedura e Enriquecimento nutricional de resíduos agroindustriais**. 2017. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, [S. l.], 2017.

SILVA, DENISE CASTRO. **ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E ORGANOLÉPTICO DA LEVEDURA *Dekkera bruxellensis* VISANDO À ELABORAÇÃO DE CACHAÇAS DIFERENCIADAS**. 2013. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, [S. l.], 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/13305/1/Dissertação%20Denise%20Silva.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SILVA, Felipe *et al.* Polipeptídios e proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja e Métodos analíticos utilizados no seu estudo. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 29, p. 1326-1331, 2006.

SILVA, Carlos Alberto. **A cerveja no Brasil de 1851 a 1900**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.cervesia.com.br/artigos-tecnicos/cerveja/historia-da-cerveja/7-a-cerveja-no-brasil-de-1851-a-1900-seculo-xvii-a-xix.html>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SOUZA, Rosenilda Santo. et al. Correlação entre a redução da carga microbiológica e a inativação da enzima invertase na etapa de pasteurização da cerveja. *Revista Mundi*, [s. l.], 15 jan. 2017.

STECKELBERG, Cláudia. **Caracterização de leveduras de Processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição Celular e características cinéticas**. 2001. Tese de Doutorado (Título de Doutor em Engenharia Química.) - UNICAMP, [S. l.], 2001.

STORMOVSKI, ELENIZE MARIA. **QUALIDADE DE SEMENTES DE CEVADA DESTINADAS AO PROCESSO DE MALTEAÇÃO**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia) - UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/bitstream/prefix/1994/1/STORMOVSKI.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SILVA, Hamir Gonçalves *et al.* Estudo da reutilização de leveduras imobilizadas sobre a qualidade da cerveja Cream Ale. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], p. 43083-43095, 29 abr. 2021.

SANTOS, Célia Regina Bastos. “Caracterização do mosto para a produção de cerveja.”.

VIEGAS, Marcelo Caldeira. **Otimização de sistema de fermentação alcoólica Contínua utilizando reatores tipo torre e Leveduras com características**

floculantes. 2003. Tese de Doutorado (Doutor em Engenharia Química) - UNICAMP, [S. l.], 2003.

WHITE, CHRIS *et al.* **LEVEDURA GUIA PRÁTICO PARA A FERMENTAÇÃO DE CERVEJA**. [S. l.: s. n.], 2020.

WUTTKE, Autora: Caroline. **Estudo de caso: Avaliação da formação de SO₂ na etapa de fermentação em uma cervejaria do RS**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA) - Bacharelado, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/174427/001062959.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 31 mar. 2024.

YAMADA, Eunice A. *et al.* Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Protein Concentrate: Preparation, Chemical Composition, and Nutritional and Functional Properties. **J. Agric. Food Chem.**, [s. l.], p. 3931-3936, 2005.

YEAST TECHNOLOGY Gerald Reed Universal Foods Corporation Milwaukee, Wisconsin Tilak W. N **agodawithana** Universal Foods Corporation Milwaukee, Wisconsin

YEAST market by Type (Baker's Yeast, Brewer's Yeast, Wine Yeast, Probiotics Yeast), by Application (Food and Feed), by Region (North America, Europe, Asia Pacific, South America, Middle East and Africa), Global Trends and Forecast from 2019 to 2028. [S. l.], 1 mar. 2022. Disponível em: <https://exactitudeconsultancy.com/pt/reports/2403/yeast-market/>. Acesso em: 6 mar. 2024.