

ESTUDO DA SUBSTITUIÇÃO DA AERAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO POR AZEITE DE OLIVA

Thiago Notari Wild

Aluno da Faculdade de Engenharia¹

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 6681. Partenon. Porto Alegre/RS. CEP 90619-900

RESUMO

Estudos recentes mostram que fermentações com técnicas de adição de ácidos graxos e aeração de mosto produzem cervejas semelhantes. Em virtude disso, necessita-se verificar concentrações de ácidos graxos para que essa afirmação continue válida. Esse estudo analisou diferentes dosagens de azeite de oliva em fermentações, de pequena escala, e comparou com a técnica de aeração de mosto. Análises físico-químicas – como pH, atenuação de substrato e viabilidade celular – afirmam que a técnica estudada realmente é válida, mostrando resultados semelhantes ou superiores às técnicas tradicionais. Foi estimada também a possibilidade de diminuir custos de produção com a adição de azeite de oliva em relação à adição de oxigênio hospitalar. As amostras obtidas nos dois processos foram analisadas sensorialmente e não foram observadas diferenças negativas para aroma ou sabor. Contudo, o estudo mostrou que a adição de ácidos graxos insaturados ainda é uma técnica bastante empírica e necessita de estudos mais aprofundados.

PALAVRAS-CHAVE: Cerveja. Fermentação. Adição de ácidos graxos insaturados. Aeração de mosto cervejeiro. Azeite de oliva.

ABSTRACT

Recent studies show that fermentations with addition of fatty acid techniques and wort aeration produce similar beers. As a result, it is necessary to check fatty acid concentrations for that statement remains valid. This study examined different doses of olive oil in small-scale fermentations and compared it with the wort aeration technique. Analytical analysis – such as pH, substrate mitigation and viability – asserts that the studied technique is valid showing similar or superior results comparing to traditional techniques. It was also estimated whether it is possible to reduce production cost with the addition of olive oil comparing with the addition of hospital oxygen. Sensory analyses of the samples were made and no negative differences were detected in flavor or taste. However, the study has shown that the addition of unsaturated fatty acids is a fairly empiric technique and requires further study.

KEYWORDS: Beer. Yeast. Fermentation. Unsaturated fatty acid addition. Wort aeration. Olive oil.

¹ Orientação: Prof. Claudio Luis Crescente Frankenberg, Curso de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da PUCRS

1. Introdução

A quantidade de oxigênio dissolvido no mosto cervejeiro (mistura açucarada destinada à fermentação alcoólica), apesar de ser necessária, é de difícil controle. Concentração abaixo do desejado pode causar defeitos de crescimento e baixa velocidade de fermentação; em contrapartida, aeração excessiva causa aumento de biomassa indesejável e redução de etanol. Uma alternativa é a adição de lipídeos no mosto, especialmente ácidos graxos insaturados (MOONJAI et al., 2002).

Segundo Kunze (1999), em cervejarias modernas é essencial evitar o contato do oxigênio com a cerveja. A única exceção a isso é a injeção de oxigênio no mosto resfriado antes da fermentação. Dados de Parker (2008) afirmam que são injetados 180 litros de oxigênio puro em 1,6 hectolitros de mosto para ter concentração adequada dissolvida.

Em entrevista ao site Globo, Pequenas Empresas e Grandes Negócios (2013), André Junqueira – presidente da Associação das Microcervejarias do Paraná (Procerva-PR) e dono da Cervejaria Morada Cia. Etílica – afirma que a carga tributária, para o setor de cerveja artesanal, atinge 60% do valor do produto. Em um cenário de alta tributação, no qual as microcervejarias estão inseridas, o maior desafio é baixar o custo de produção para obter maior lucro frente aos concorrentes.

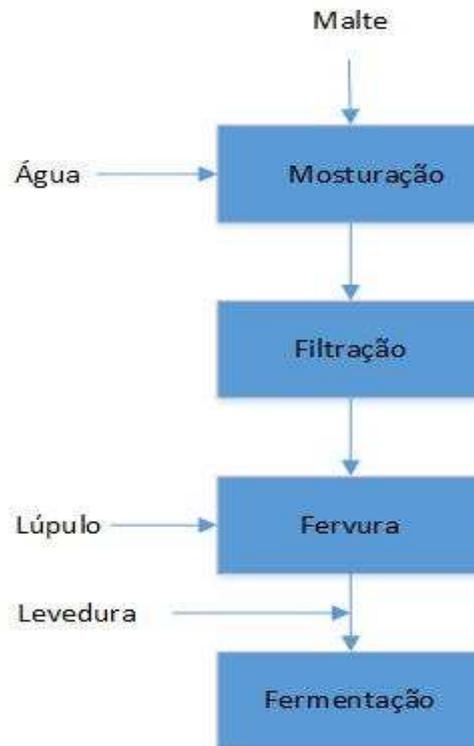
Esse estudo teve como, principal, objetivo avaliar processos fermentativos que substituem a aeração do mosto por azeite de oliva como ácido graxo insaturado. Análises físico-químicas e sensoriais foram realizadas para entender os efeitos dessa técnica estudada, previamente, por Hull (2005). Além disso, foi verificado, de forma básica, se a substituição é viável economicamente para o setor de microcervejarias.

2. Referencial teórico

2.1. Produção de cerveja

O processamento da cerveja acontece, basicamente, em três etapas: produção do mosto, através da mosturação de grãos de cereais moídos (malteados ou não malteados), filtração e fervura; fermentação, abrangendo a maturação; pós-fermentação, consistindo na estocagem, carbonatação e envase da cerveja já pronta (BOULTON; QUAIN, 2001). O fluxograma representado na Figura 1 ilustra o processamento das duas primeiras fases citadas, que são objeto de estudo deste trabalho.

Figura 1: Processo de produção de cerveja



Fonte: Adaptado de Baxter; Hughes (2001).

2.2. Leveduras

São fungos cuja forma predominante é unicelular. Têm diferentes formas, podendo essas ser esféricas, ovóides, cilíndricas ou triangulares. A temperatura ideal para o seu crescimento varia entre 25°C e 30°C. As leveduras podem se reproduzir assexuadamente (brotamento ou fissão nuclear) ou por esporos sexuais (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A *Saccharomyces* trata-se de um grupo de leveduras heterogêneo, com células que se multiplicam por brotamento multilateral ou por formação de pseudomicélio. Essas espécies, entre outras finalidades, produzem bebidas, como a cerveja, porém também estão ligadas a alterações indesejáveis em alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

2.3. Fermentação

A fermentação é qualquer processo metabólico que libera energia de uma molécula orgânica principalmente carboidratos. Não requer oxigênio ou um sistema de transporte de

elétrons e utiliza uma molécula orgânica como aceptor final de elétrons (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

A fermentação alcoólica, realizada no processamento da cerveja, começa na formação de duas moléculas de ácido pirúvico e duas moléculas de ATP a partir de uma molécula de glicose. Em seguida, as moléculas de ácido pirúvico são convertidas em moléculas de acetaldeído e liberam duas moléculas de CO₂. Assim, as duas moléculas de acetaldeído são reduzidas por duas moléculas de NADH desidrogenase (nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase) para formar duas moléculas de etanol. Essa fermentação pode ser realizada tanto através de leveduras como de bactérias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000). A Figura 2 mostra os passos (metabolismo celular) para a obtenção do etanol.

Figura 2: Obtenção do etanol



Fonte: Adaptado de Baxter; Hughes (2001).

Os aminoácidos, presentes no mosto, são usados para o crescimento celular. A fermentação, também, produz compostos voláteis, sulfurosos, álcoois superiores e ésteres, variando de cepa² para cepa. Após o fermento (levedura) ter consumido todo o açúcar, que ele possa metabolizar, a levedura flocula em conjunto e sedimenta para o fundo do fermentador (BAXTER; HUGHES, 2001).

² Cepa ou estirpe é um termo biológico que se refere a um grupo de descendentes com um ancestral comum que compartilham semelhanças morfológicas ou fisiológicas (USHER, 1996).

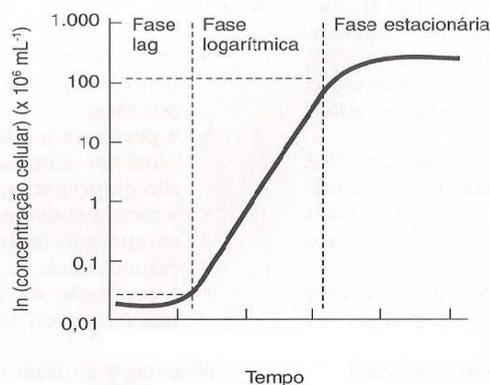
Os microrganismos de interesse, para a fermentação da cerveja, são, principalmente, as leveduras do tipo *Saccharomyces* (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Em relação à forma de fermentação, é dito que existem dois tipos: a fermentação de topo, na qual a levedura *Saccharomyces cerevisiae* atua formando um filme no topo do fermentador, cervejas feitas a partir dessa levedura são conhecidas como *Ale*; a outra forma é a fermentação de superfície, feita pela levedura *Saccharomyces pastorianus*, cuja característica é a fermentação pelo fundo do reator, cervejas feitas a partir dessa levedura são conhecidas como *Lager* (BOULTON; QUAIN, 2001).

2.4. Crescimento microbiano

Para haver crescimento adequado dos microrganismos alguns fatores são importantes, tais como: disponibilidade de fontes de carbono, nitrogênio e qualquer nutriente específico para o desenvolvimento microbiano; pH do substrato e temperatura adequada para incubação (FELLOWS, 2006).

De forma simplificada, é dito que o crescimento das células conforme White; Zainasheff (2010), em um mosto cervejeiro, segue três fases: fase lag (adaptação); fase log (de crescimento exponencial) e fase estacionária. A Figura 3 ilustra essas fases de crescimento.

Figura 3: Fases do crescimento de microrganismos.



Fonte: Fellows (2006).

De forma mais detalhada, segundo White; Zainasheff (2010), as características das fases de crescimento são:

- a) Fase lag: logo que inoculado o fermento, começa a adaptação ao meio no qual foi inserido (mosto). Apesar de não haver atividade de crescimento das células nessa fase, é possível observar que há consumo de oxigênio, minerais e aminoácidos para produção de proteínas e enzimas necessárias para a reprodução. A duração dessa fase é

influenciada, principalmente, pelo pH, taxa de inóculo de levedura, temperatura e oxigênio dissolvido;

- b) Fase log: após a célula se adaptar ao meio e sintetizar as proteínas e as enzimas necessárias para a reprodução celular, começa a fase exponencial, onde o substrato vai ser consumido para produzir, principalmente, biomassa, etanol e CO₂. Nessa fase, verifica-se que máxima taxa de crescimento das células. Termina quando o fermento não é mais capaz de se reproduzir, em virtude de não conseguir quebrar algumas cadeias de açúcares ou por intoxicação alcoólica, por exemplo;
- c) Fase estacionária: nessa fase a levedura cessa a produção de biomassa. Nas cervejarias, normalmente nesta fase a temperatura do fermentador é reduzida após a atenuação de substrato ser completa para que comece a maturação e floculação das leveduras suspensas.

2.5. Importância do oxigênio

Pequena quantidade de oxigênio dissolvido no começo da fase lag resulta em fermentação “arrastada”, atenuação incompleta e baixo crescimento celular. Oxigênio é necessário para que a levedura sintetize esteróis e ácidos graxos insaturados. Esses lipídios são essenciais para as membranas celulares (HAUKELI; LIE 1976). Esteróis mantêm estrutura lipídica das membranas celulares e regulam a permeabilidade de fluido (DIAZ-HELLIN et al. 2014).

A *Saccharomyces cerevisiae* tem a rara habilidade de crescer rapidamente com poucas quantidades de oxigênio dissolvido (VISSER et al., 1990).

É considerado entre 8 e 10 ppm de oxigênio dissolvido, no começo da fermentação, o mínimo, para que a levedura possa ter boa vitalidade e crescimento celular (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

2.6. Adição de ácidos graxos insaturados

O controle da aeração de mosto é difícil, tornando-se um motivo para achar uma alternativa a este método, como a adição de ácidos graxos insaturados (MOONJAI et al., 2002).

Ácido graxo insaturado é um importante componente da membrana lipídica, como, por exemplo, ácido palmitoleico e ácido oleico (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). O ácido oleico presente no azeite de oliva é um composto de cadeia carbônica (C18:1) igual a um dos ácidos

graxos insaturados que a *Saccharomyces cerevisiae* produz (DEPRAETERE et. al., 2003 *apud* HULL, 2005).

Moonjai et al. (2002) percebeu que a adição de ácido linoleico aumentou a formação de ésteres durante a fermentação, podendo deixar sabores indesejáveis na cerveja. Contudo, o estudo, em pequena escala, mostrou que a fermentação com adição de ácido graxo insaturado se aproximou da fermentação com aeração do mosto, concluindo que o método pode, com estudos mais aprofundados, ser utilizado como alternativa.

Hull (2005), em uma experiência realizada na *New Belgium Brewing Company* nos Estados Unidos, mostrou que a adição de azeite de oliva, como ácido graxo insaturado, na levedura antes da inoculação gera fermentações normais. Apesar dos resultados mostrarem que a fermentação demorou mais tempo e que ocorreu maior formação de éster em comparação à aeração do mosto, o painel de provadores, através de análises sensoriais, preferiu as cervejas com adição de azeite de oliva.

2.7. pH na fabricação da cerveja

Segundo O'Rourke (2002), o pH tem grande impacto na velocidade da reação, solubilidade e carga eletrostática de muitas moléculas, sendo que isso influencia na qualidade da cerveja (estabilidade coloidal) e na produção (atividade enzimática). O Quadro 1 exemplifica valores de pH para determinados processos.

Quadro 1: pH para produção de cerveja

Processo	pH
Mosturação	5,6 ± 0,2
Pré-fermentação	5,4 ± 0,2
Pós-fermentação	4,0 ± 0,2

Fonte: Adaptado de O'Rourke (2002)

A transformação do mosto para cerveja é acompanhada por uma diminuição de pH. Esta alteração é uma consequência do metabolismo da levedura, envolvendo a excreção de vários ácidos orgânicos e de prótons em resposta à assimilação de açúcares. O mínimo valor de pH é alcançado antes da atenuação do mosto ser completa. Frequentemente, há um aumento no pH da metade para o final da fermentação. Por esses motivos, o pH não é uma medida útil, a ser monitorada, para o desempenho global da fermentação (BOULTON; QUAIN, 2001).

3. Metodologia

Os experimentos do estudo foram realizados no Laboratório de Processos Ambientais (LAPA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, utilizando um mosto elaborado, previamente, de forma caseira.

A metodologia básica consistiu em analisar o desenvolvimento de cinco fermentações ao mesmo tempo. Os parâmetros analisados foram pH, concentração de substrato, tempo de fermentação, número de células e viabilidade celular. Os cinco reatores (elaborados com garrafas PET) foram preparados com diferentes condições de processo (Figura 4). Três reatores foram dosados com diferentes concentrações de azeite de oliva. Um reator teve, somente, o mosto areado e o outro reator não sofreu processo de aeração nem adição de azeite de oliva (Quadro 2). A fim de inocular o fermento e iniciar o processo de fermentação, alguns procedimentos foram realizados antes, tais como: preparação do mosto, propagação de células, contagem de células, aeração do mosto ou adição de azeite de oliva.

Figura 4: Foto dos reatores em funcionamento



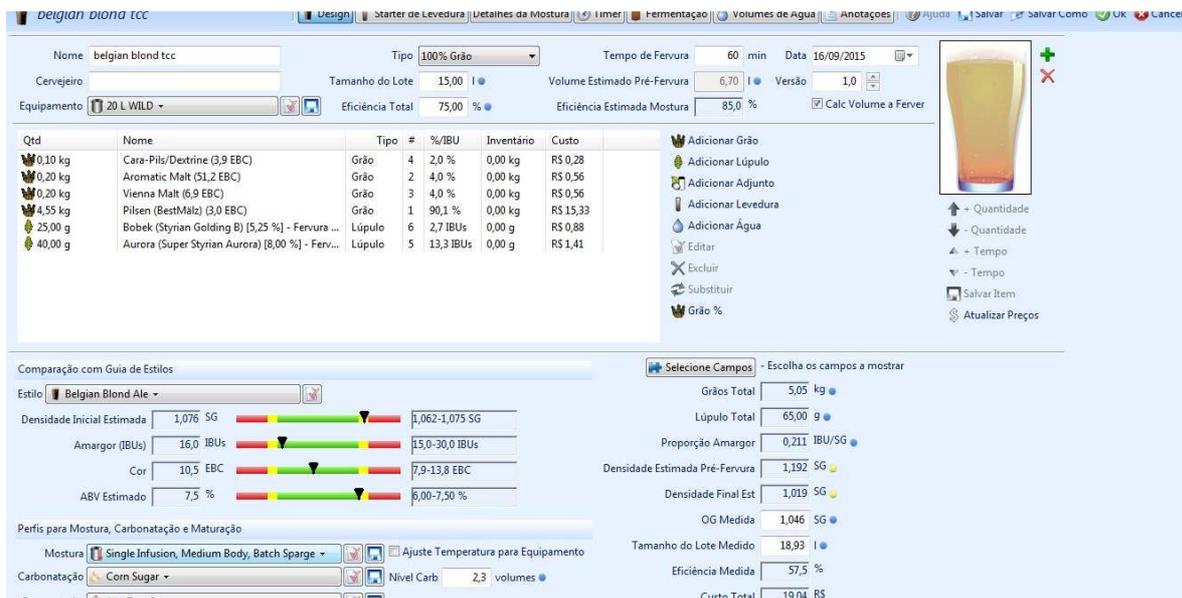
Quadro 2: Caracterização dos reatores

Reatores	
R1	Sem adições
R2	Adição de oxigênio
R3	Adição de 0,1 mL de azeite de oliva
R4	Adição de 0,5 mL de azeite de oliva
R5	Adição de 1,0 mL de azeite de oliva

3.1. Preparação do mosto

O mosto foi produzido seguindo métodos descritos por Palmer (1999) para cervejas feitas, somente, a partir de grãos. O controle da preparação foi realizado pelo teste do iodo, que consiste em pingar o mosto, durante a sacarificação, em uma solução de tintura de iodo (2%), assim pode-se determinar a ocorrência ou não da quebra do amido. Depois de pronto, o mosto foi congelado para melhor conservação, sendo que sua receita foi baseada em Dorribusch (2010) para o estilo Belgian Blond Ale e em seguida foi usado o simulador Beersmith (Figura 5) para adequar a receita.

Figura 5: Receita Belgian Blond Ale no BeerSmith



3.2. Propagação de células

A propagação de células serve para garantir que haverá quantidade necessária de células para fermentar o mosto no qual o microrganismo vai ser inserido. Para fazer isso foi necessário DME (extrato de malte em pó), água, nutriente de levedura, levedura e um agitador de mesa. Desta forma a propagação foi determinada seguindo a metodologia descrita por White; Zainasheff (2010), sendo realizada a multiplicação celular (Figura 6) por cerca de um dia a 21°C.

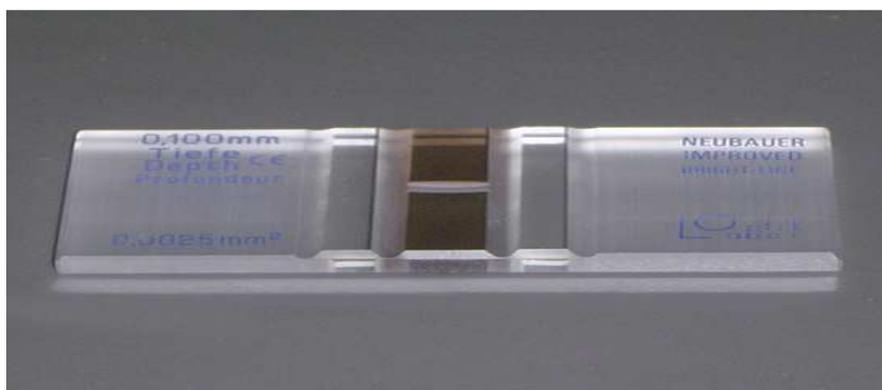
Figura 6: Propagação celular



3.3. Contagem de células

A contagem de células serviu para dosar a quantidade adequada de fermento para cada reator. Para isso foi feita análise microscópica da amostra propagada utilizando uma câmara de Neubauer (Figura 7) e solução de azul de metileno (0,04%) para verificar as células viáveis.

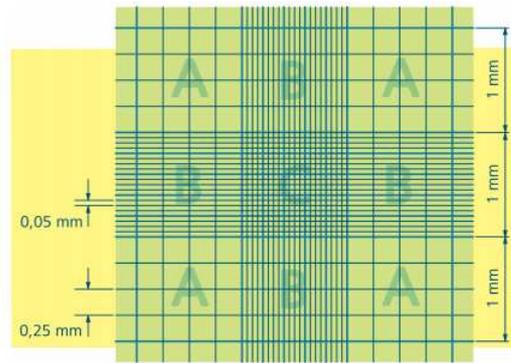
Figura 7: Câmara de Neubauer



Fonte: Prolab (2015).

A câmara de Neubauer é uma lâmina de microscopia de 0,1 mm de altura, onde existe uma câmara (representada na cor marrom na Figura 7) gravada no vidro. Os suportes laterais, na lâmina, garantem estabilidade para a lamínula. Nessa câmara há marcações, divididas em quadrantes, para facilitar a contagem das células. Observando o gabarito de uma câmara de Neubauer (Figura 8), percebe-se que existem três tipos de dimensões diferentes de quadros de contagem (A, B e C) permitindo que sejam contadas células de diferentes tamanhos. (LUCARINI; SILVA; BIANCHI, 2002).

Figura 8: Gabarito de uma câmara de Neubauer



Fonte: Vieira; Fernandes (2002).

O método da contagem celular seguiu os procedimentos indicados por White; Zainasheff (2010). Para facilitar a contagem, foram diluídas amostras em concentrações de 1:100 ou 1:1000, com água destilada, a fim de que as células ficassem mais espalhadas e não sobrepostas. Além da contagem de células, foi também analisada a viabilidade do fermento, ou seja, quantidade de células vivas em relação a células totais utilizando o método de coloração por azul de metileno.

O método de coloração por azul de metileno consiste em misturar 1 ml de solução de azul de metileno (0,04%) com 1 ml de amostra e esperar cerca de 2 minutos antes de analisar no microscópio. Células mortas, por não conseguirem metabolizar o corante aplicado, ficam de coloração azul escuro; células vivas continuam transparente ou azul claro (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

3.4. Aeração do mosto e adição de azeite de oliva

Seguindo orientação de White; Zainasheff (2010), para adicionar oxigênio no mosto foram usados uma pedra difusora, um filtro esterilizador (0,2 μ m) e um compressor de ar de aquário por 20 minutos.

Hull (2005), em sua tese, dosou a concentração máxima, de 1mg de azeite de oliva a cada 25 bilhões de células. Adaptando ao volume de mosto dos cinco reatores que estavam sendo desenvolvidos, a concentração usada por Hull acarretaria em dosagens insignificantes e de difícil mensuração de azeite, sendo, assim, difícil a precisão dessa quantidade. Por isso, foram extrapoladas dosagens acessíveis para a adição de azeite de oliva.

3.5. Fermentação

Os reatores (Figura 4), utilizados na fermentação foram garrafas PET, previamente esterilizadas, de 2 litros com exceção do R1 que tinha volume de 1,25 litros. Eles foram projetados para que não permitissem a entrada de ar durante a fermentação, em função da respiração anaeróbia. Por esse motivo, foi instalada uma mangueira em contato com água, garantindo somente a saída de gás carbônico. Nos reatores de 2 litros foram adicionados 1,5 litros de mosto e no reator de 1,25 litros foi adicionado 1,0 litro de mosto. A levedura utilizada foi a M-27 fornecida por Mangrove Jack's e foi adicionada de forma proporcional a quantidade de mosto para cada reator através de cálculos realizados no simulador BeerSmith. A inoculação ocorreu a 21°C e a fermentação oscilou entre 21 e 24°C em ambiente climatizado. Diariamente, foram coletadas amostras para determinar a quantidade de substrato consumida, pH, número de células das amostras e temperatura da reação. Considerou-se a fermentação terminada quando a máxima quantidade de substrato possível foi consumida. Para mensurar a quantidade e substrato, ao longo do processo, foi utilizado refratômetro (Schmidt+Haensch GmbH & Co. eloptron) e para medir o pH foi usado pHmetro (Nova técnica Mod NT PH2) calibrado na faixa ácida.

3.6. Análise de dados

Para verificar-se a existência de diferença significativa entre resultados obtidos de cada reator, foram realizadas análises de variâncias (ANOVA) e, quando necessário, havendo diferença significativa entre as médias, foi realizado o teste Tukey para verificar entre qual ou quais médias existe diferença.

3.7. Análise econômica

Utilizando dados de Parker (2008), citados previamente, e orçando o valor do oxigênio hospitalar com a empresa Porto Soldas, foi possível estimar qual o custo, de oxigênio, para uma produção de 1,6 hectolitros de cerveja a fim de aproximar às bateladas industriais. Para calcular quanto custaria a adição de azeite de oliva, foi realizada uma aproximação linear.

3.8. Análise sensorial

As amostras foram analisadas quanto ao sabor, aroma e retenção de espuma. A análise foi empírica em função das pessoas que degustaram não possuírem nenhum tipo de

especialização certificada na área de *Sommelier* de cerveja. Em relação à retenção de espuma, a análise foi somente de forma visual.

4. Resultados e discussões

4.1. pH

O Quadro 3 apresenta os valores de pH obtidos ao longo do período de realização do experimento e a Tabela 1 observa-se a ANOVA referente a comparação das médias do pH dos cinco reatores.

Quadro 3: pH ao longo do tempo

Dia	R1	R2	R3	R4	R5
0	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50
1	4,34	4,30	4,33	4,30	4,31
2	4,12	4,12	4,19	4,07	4,06
3	4,00	4,02	4,12	4,00	3,97
6	4,17	4,21	4,22	4,13	4,12
7	4,21	4,31	4,31	4,23	4,20
8	4,21	4,28	4,30	4,20	4,15
9	4,21	4,25	4,20	4,13	4,09

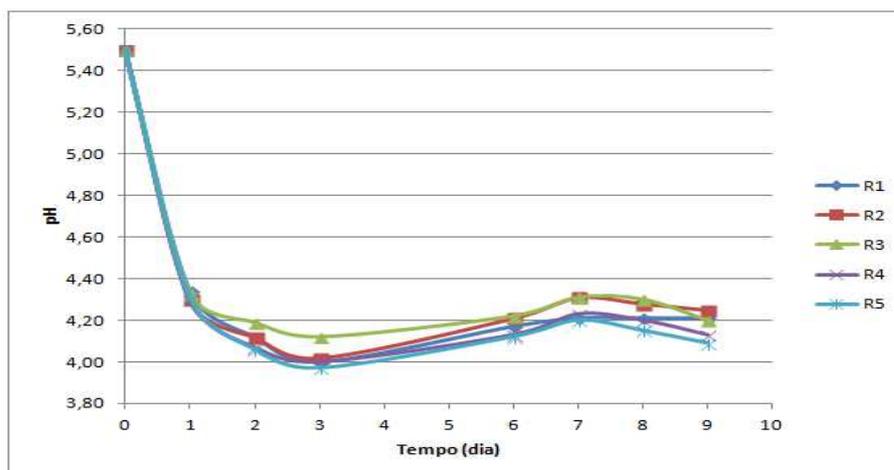
Tabela 1: ANOVA do pH

Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,048665	4	0,012166	0,053879	0,994331	2,641465
Dentro dos grupos	7,903175	35	0,225805			
Total	7,95184	39				

Pode-se notar que a análise de variância não mostrou diferença significativa entre as médias dos métodos usados, visto que o valor-P foi maior do que a significância utilizada (0,05). A Figura 9, apresenta graficamente os dados apresentados no Quadro 3.

Analisando a Figura 9, afirma-se que o comportamento, ao longo do tempo, é idêntico ao descrito por Boulton; Quain (2001). Além disso, percebe-se que todas as amostras estão adequadas na faixa desejada de pH, segundo O'Rourke (2002). Uma vez que os resultados não são significativamente diferentes e estão na faixa adequada de pH, é possível afirmar que o azeite de oliva não altera a capacidade da levedura de acidificar a cerveja.

Figura 9: Gráfico: tempo x pH



4.2. Concentração de substrato

Os valores da concentração de substrato ao longo do tempo nos cinco reatores estudados estão apresentados no Quadro 4, sendo que a análise de variância das médias de cada reator encontra-se na Tabela 2.

Quadro 4: Concentração ao longo do tempo (g/mL)

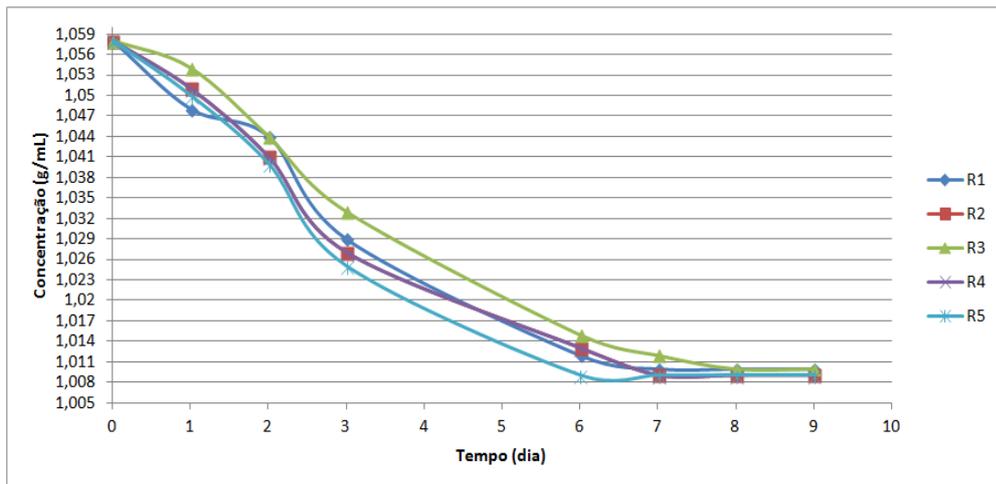
Dia	R1	R2	R3	R4	R5
0	1,058	1,058	1,058	1,058	1,058
1	1,048	1,051	1,054	1,051	1,050
2	1,044	1,041	1,044	1,041	1,040
3	1,029	1,027	1,033	1,027	1,025
6	1,012	1,013	1,015	1,013	1,009
7	1,010	1,009	1,012	1,009	1,009
8	1,010	1,009	1,010	1,009	1,009
9	1,010	1,009	1,010	1,009	1,009

Tabela 2: ANOVA da concentração de substrato

Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	49,5	4	12,375	0,029973	0,998183	2,641465
Dentro dos grupos	14450,5	35	412,8714			
Total	14500	39				

A ANOVA, apresentada na Tabela 2, não mostra diferença significativa em relação aos métodos utilizados, visto que o valor-P foi maior que o da significância (0,05). A Figura 10, reinterpreta os dados do Quadro 4 plotados ao longo do tempo.

Figura 10: Gráfico: tempo x concentração de substrato

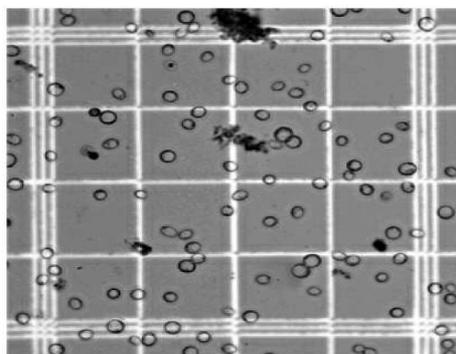


Apesar de não ter tido uma diferença considerável entre as médias analisadas pela ANOVA, observa-se, através da Figura 10 e do Quadro 4, que o R5 atenua a concentração de substrato em tempo menor. É visível que o R1 e o R3 não completam a atenuação até 1,009 g/ml como os demais reatores. O aumento da concentração de azeite de oliva nos reatores influenciou no desempenho da fermentação diminuindo o tempo. Os reatores R4 e R2 mostraram exatamente a mesma atenuação durante o período.

4.3. Concentração celular e viabilidade celular

As células foram contadas na diagonal da câmara Figura 11, pois estavam bem distribuídas e em seguida foi utilizada a Equação (1) para totalizar a quantidade de células, sendo células brancas vivas e células escuras mortas, conforme técnica de coloração com azul de metileno. A Figura 11, mostra de forma esquemática a observação realizada nas câmaras de Neubauer.

Figura 11: Área de contagem



Fonte: White; Zainasheff (2010).

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \text{células contadas} \times 4 \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \quad (1)$$

Com os valores determinados (Quadro 5) e pela Equação (1) foi feita uma análise de variância para determinar se as médias para cada reator tiveram diferença significativa. Como nos casos anteriores, foi realizada uma ANOVA (Tabela 3), para verificar-se a existência ou não de diferenças entre as médias.

Quadro 5: Concentração celular ao longo do tempo (bilhões de células/mL)

Dia	R1	R2	R3	R4	R5
0	0,1072	0,1072	0,1072	0,1072	0,1072
1	384	212	120	108	156
2	176	188	404	172	96
3	148	156	172	124	160
6	88	132	100	112	128
7	42	104	76	68	72
8	124	132	72	104	104
9	102	112	84	108	114

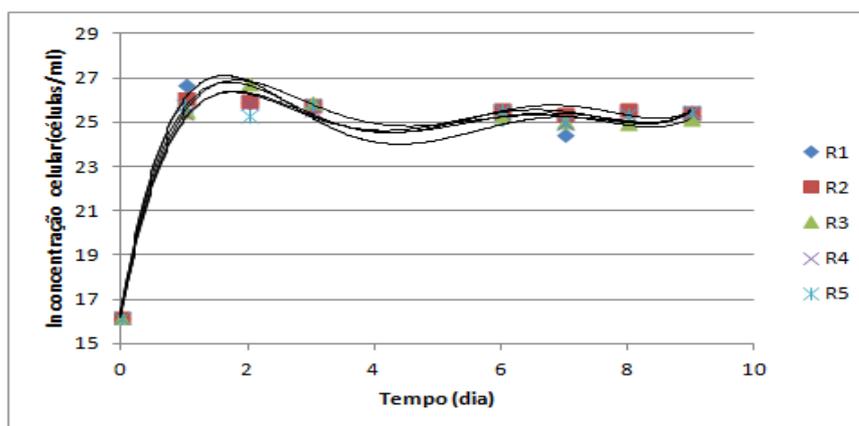
Tabela 3: ANOVA da concentração celular

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	8073,6	4	2018,4	0,283538	0,88666	2,641465
Dentro dos grupos	249151,55	35	7118,616			
Total	257225,15	39				

Sendo o valor-P maior que a significância (0,05), percebe-se que não há diferença significativa entre os métodos realizados. Os dados (Quadro 4) foram linearizados e plotados em gráficos (Figura 12) para identificar as fases da fermentação e entender o comportamento ao longo do tempo.

Devido ao intervalo de tempo de coleta, não foi possível determinar a fase lag nas fermentações. Nota-se que o crescimento celular foi maior no primeiro dia nos reatores sem azeite de oliva. A rápida multiplicação celular que ocorreu no R1, no primeiro dia, segue o comportamento descrito por Visser et al. (1990) o que explica, também, o grande consumo de substrato representado na Figura 10 para o mesmo intervalo.

Figura 12: Gráfico: tempo x concentração celular



Utilizando a Equação (2), foi identificada a viabilidade do fermento ao longo do tempo para cada reator (Quadro 6) e feita uma ANOVA (Tabela 4) para determinar se há diferença entre as médias.

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{células\ totais - células\ mortas}{células\ totais} \times 100 \quad (2)$$

Quadro 6: Viabilidade celular ao longo do tempo (%)

Dia	R1	R2	R3	R4	R5
0	95,04	95,04	95,04	95,04	95,04
1	96,96	92,98	93,75	93,1	95,12
2	88	94	95	97,72	96
3	86	88,63	87,75	96,87	97,56
6	81,48	86,84	86,2	93,33	96,96
7	87,5	81,25	86,36	94,44	94,73
8	86,11	89,18	85,71	92,86	96,29
9	84,84	87,07	85,88	91,89	95,02

Tabela 4: ANOVA da viabilidade

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	372,57984	4	93,14496	6,5027232	0,000506	2,641465
Dentro dos grupos	501,33975	35	14,323993			
Total	873,91959	39				

A análise de variância mostrou que existe diferença significativa entre os métodos realizados, pois o valor-P foi menor que a significância (0,05). Em virtude disso, foi realizado o teste Tukey (Quadro 7) para determinar entre quais métodos existe diferença.

Quadro 7: Teste Tukey para viabilidade celular

Médias de tratamento		
R1	88,24	c
R2	88,99	bc
R3	90,71	abc
R4	94,40	ab
R5	95,84	a

Foram identificados três padrões de média entre os métodos realizados no Quadro 7. É visível que a adição de azeite de oliva formou o padrão tipo “a” e que o aumento da concentração deste aumentou a média de viabilidade celular.

O conjunto viabilidade celular e número de células foi determinante para a atenuação da concentração de substrato (Quadro 4) durante a fermentação. A alta viabilidade celular do R5 compensou com o fato de ter menor reprodução celular, em relação a R2, por exemplo, para atenuar mais rápido que os demais reatores. R4 em relação a R2 teve a mesma atenuação de substrato ao longo do tempo, indicando que o conjunto viabilidade celular e número de células das duas são praticamente iguais. A baixa relação de viabilidade celular e número de células dos reatores R1 e R3 foi o motivo das duas fermentações não atenuarem completamente.

4.4. Análise econômica

Foi avaliado quanto custaria o oxigênio hospitalar utilizando os dados de Parker (2008) *apud* White; Zainasheff (2010) para 1600 litros de cerveja. Em seguida, foram extrapoladas linearmente as concentrações de azeite de oliva de R3, R4 e R5 para o mesmo volume de cerveja. O Quadro 8 apresenta o custo dos insumos a serem comparados e o Quadro 9 mostra os insumos extrapolados para 1600 litros de cerveja.

Quadro 8: Custo de insumos

Insumo	Quantidade (L)	Valor (R\$)	Revendedor
Azeite de oliva	0,5	12,38	Zaffari
Oxigênio hospitalar	7000	105,00	Porto Soldas

Para as concentrações utilizadas no estudo, fica evidente (Quadro 9) que a técnica não representa diminuição de gastos para a fabricação de cerveja. Por essa razão, foi, também, adaptada a concentração, utilizada por Hull (2005), de azeite de oliva para entender se o método, em concentrações mais baixas, é interessante economicamente.

Quadro 9: Custo dos insumos para 1600 litros de cerveja

Insumo	Quantidade (L)	Valor (R\$)
Oxigênio hospitalar	180	2,70
Azeite de oliva (R3)	0,106	2,62
Azeite de oliva (R4)	0,53	13,12
Azeite de oliva (R5)	1,06	26,25
Azeite de oliva (Hull)	7,80E-04	0,02

4.5. Análise sensorial

A análise sensorial, feita por quatro pessoas, foi unânime em relação aos parâmetros avaliados. O Quadro 10 mostra a comparação entre as amostras, indicando da melhor para a de menor aceitabilidade.

Quadro 10: Análise sensorial

Sabor	R5 > R4 > R3 = R2 > R1
Aroma	R5 > R4 = R3 = R2 > R1
Tempo de retenção de espuma	R2 > R1 > R5 = R4 = R3

Apesar de que as amostras com azeite de oliva mostraram superioridade nos quesitos de sabor e aroma, a formação da espuma foi muito baixa ou quase inexistente – deixando a cerveja com aparência de estar sem gás ou de refrigerante.

5. Conclusão

A adição de ácidos graxos insaturados pode ser vista como substituição da aeração do mosto. Como visto nas análises físico-químicas, as concentrações do R4 e R5 promoveram melhor desempenho de fermentação ou igual à R2. Sensorialmente, as amostras com azeite de oliva, principalmente a R5, apresentaram superioridade nos quesitos de sabor e aroma.

Economicamente, a técnica utilizada no estudo não é interessante para as microcervejarias à primeira vista. Apesar da concentração de R5 ter custo mais elevado, essa demorou menos tempo para fermentar, podendo aumentar o número de produções no mesmo intervalo de tempo que R2. A concentração de azeite de oliva, estudada por Hull (2005), mostrou ser possível reduzir custos usando azeite de oliva como ácido graxo na fermentação.

Em contra partida às vantagens, a concentração elevada de azeite de oliva influenciou, demasiadamente, na espuma da cerveja sendo o tempo de retenção muito baixo. A retenção de

espuma é essencial para não aparentar ser refrigerante ou de estar sem carbonatação, ou seja, as concentrações estudadas não são interessantes para a fabricação de cerveja.

A partir desse estudo, percebe-se outra possibilidade de experimento utilizando ácidos graxos nas leveduras. De certa forma, as concentrações de azeite de oliva permitiram que a viabilidade celular fosse mantida em altas proporções, especialmente R4 e R5. Logo, seria interessante avaliar a estocagem de leveduras utilizando técnicas diversas e comparar com a adição de azeite de oliva. Em virtude disso, poderia ser reaproveitado mais fermento, caso as avaliações dessas técnicas fossem feitas em diferentes gerações e utilizando parâmetros como viabilidade ao longo do tempo, número de células e custos das técnicas.

Agradecimentos

Ao orientador Cláudio Luis Crescente Frankenberg pelo auxílio durante o período do estudo, à Fernanda do Laboratório de Processos Ambientais (LAPA) pelo auxílio e ao Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade de Biociências pela disponibilidade de materiais necessários para o experimento.

REFERÊNCIAS

BAXTER, E. D.; HUGHES, P. S. **Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects**, Royal Society of Chemistry, 2001.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation**. Blackwell Science, 2001.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2. ed. Porto Alegre : Artmed, 2006.

DIAZ-HELLIN; GÓMEZ-ALONSO; BORRULL; ROZÈS; CORDERO-OTERO; UBEDA-IRANZO, 2014. **Membrane Lipid Variability in Saccharomyces cerevisiae Wine Strains Rehydrated in the Presence of Metabolic Activators**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/263778776_Membrane_Lipid_Variability_in_Saccharomyces_cerevisiae_Wine_Strains_Rehydrated_in_the_Presence_of_Metabolic_Activators>. Acessado em 19 nov. 2015.

DORRIBUSCH, Horst. **The Ultimate Almanac of World Beer Recipes**. Cervesia Communications, West Newbury, USA, 2010;

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

GLOBO, 2013. Revista Pequenas Empresas e Grandes Negócios. Disponível em: <<http://revistapegn.globo.com/Noticias/noticia/2013/09/microcervejeiros-lutam-por-tributacao-diferenciada.html>>. Acessado em 03 set. 2015.

HAUKELI, D.; LIE, S., 1976. **Effect of lipids and oxygen on yeast growth and the biosynthesis of acetoin during fermentation.** Journal of the Institute of Brewing. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1976.tb03742.x/epdf>>. Acessado em 19 de nov. 2015

HULL, G., 2005. **Olive Oil Addition to Yeast as an Alternative to Wort Aeration.** Disponível em: <<http://www.brewcrazy.com/hull-olive-oil-thesis.pdf>>. Acessado em 03 set. 2015.

KUNZE, W., 1999. **Technology Brewing and Malting.** Disponível em: <<http://www.scribd.com/doc/260641162/Wolfgang-Kunze-Technology-Brewing-and-Malting#scribd>>. Acessado em 19 nov. 2015.

LUCARINI A.; SILVA L.; BIANCHI R. 2002. **Um sistema para a contagem semi-automática de microorganismos.** Disponível em: <<http://fei.edu.br/~rbianchi/publications/RevistaFEI2004-a.pdf>>. Acessado em 5 de out. 2015.

MOONJAI, N.; VERSTREPEN, K.; DELVAUX, F.; DERDELINCKX, G; VERACHTERT, H., 2002. **The effects of linoleic acid supplementation of cropped yeast on its subsequent performance and acetate ester synthesis,** Journal of the Institute of Brewing. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00545.x/epdf>>. Acessado em 17 set. 2015.

O'ROURKE, T., 2002. **The role o pH in brewing.** Disponível em: <<http://www.ibd.org.uk/learning/learning-resources/technical-and-training-material/94/technical-training-material/?group=41>>. Acessado em 06 nov. 2015.

PALMER, J., 1999. **How to brew.** Disponível em: <www.howtobrew.com>. Acessado em 05 out. 2015.

PARKER, N., 2008. **Are Craft Brewers Underaerating Their Wort?.** Master Brewers Association of the Americas. Disponível em: <<http://www.researchgate.net/publicliterature.PublicLiterature.search.html?type=keyword&search-keyword=Are+Craft+Brewers+Underaerating+Their+Wort%3F>>. Acessado em 19 de nov. 2015

PROLAB, 2015. Prolab. Disponível em: <<http://www.prolab.com.br/produtos/vidrarias-para-laboratorio/camaras-de-contagem>>. Acessado em 14 out. 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE C. I. **Microbiologia**, 10^a. ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2000.

USHER, G. **The wordsworth dictionary of botany**. 4^a. ed., Wordsworth Editions, 1996.

VIEIRA; FERNANDES, 2002. **Microbiologia Aplicada**. Disponível em: <http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico_acucar_alcool/microbiologia_aplicada.pdf>. Acessado em 19 nov. 2015.

VISSER, W.; SCHEFFERS, A.; VEGTE, W. DIJKEN, J., 1990. **Oxygen Requirements of Yeasts**. American Society for Microbiology. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/56/12/3785.full.pdf>>. Acessado em 19 nov. 2015.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**, Brewers Publications, 2010.