

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“AVALIAÇÃO DO MOSTO FERMENTATIVO DE LEVEDURAS PROVENIENTES  
DE CERVEJARIAS E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE AUTÓLISE  
INDUSTRIAL”**

**André Marcon\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

**Orientadora: Profa. Dra Dulce Helena Ferreira de Souza**

**\* Vínculo empregatício: Biomin do Brasil Nutrição Animal LTDA**

**São Carlos – SP**

**2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Avaliação do mosto fermentativo de leveduras provenientes de cervejarias e  
otimização do processo de autólise industrial”**

**André Marcon**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

**Orientadora: Profa. Dra Dulce Helena Ferreira de Souza**

**\* Vínculo empregatício: Biomin do Brasil Nutrição Animal LTDA**

**São Carlos – SP**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato André Marcon, realizada em 07/02/2018:

---

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza  
UFSCar

---

Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini  
UFSCar

---

Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Iemma  
UNIARA

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Renato Raimundo Marcon e Maria Terezinha Consorti Marcon**, pelo amor e carinho dedicados a mim ao longo de toda minha vida e pelos ensinamentos baseados no trabalho, no respeito e na honestidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pela vida e saúde.

À Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza pela orientação, oportunidade e acolhimento junto a sua equipe.

À Dra. Cláudia Alves, pelos ensinamentos e apoio nas primeiras etapas do projeto.

Aos colegas de laboratório, onde fui bem recebido e acolhido e que contribuíam nas conversas sobre os desafios e questionamentos da rotina na pós graduação.

À empresa Biomin Nutrição Animal do Brasil pela confiança e oportunidade, em especial Herbert Danner (Diretor Geral), Nara Canuto Sugisawa (Supervisora), Elizabete Vanat (Coordenadora) e Mariana Caser (Coordenadora de Projetos).

Aos amigos de trabalho Neide Oliveira Barbosa Silva e Edson Oliveira pela ajuda e conversas ao longo deste período.

Aos meus pais Renato Raimundo Marcon e Maria Terezinha Consorti Marcon, pelas orações e apoio ao longo de toda minha vida.

À namorada Celeste Sánchez Romero pelo ajuda técnica e principalmente pelo amor e companhia ao longo destes 3 anos.

Aos amigos André Ricardo Machi, Cecília Lamontagna e Carlos Evangelista pela grande ajuda técnica durante este projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar.

Aos professores Drs. Emerson Rodrigues de Camargo e Pedro Sergio Fadini pela presença e rica contribuição na avaliação do seminário.

As secretarias da pós-graduação: Ariane, Cristina e Luciani pelo trabalho.

## LISTA DE TABELAS

TABELA I: Análise do teor de álcool e açúcares na matéria-prima. *N.D. Não Detectável valores menores que 0,02 g/L.....	33
TABELA II: Análise do teor de ácidos orgânico na matéria-prima.....	35
TABELA III: Análise do teor de proteína bruta na matéria-prima.....	37
TABELA IV: Análise de pH, temperatura no caminhão, massa seca e viabilidade celular na matéria-prima .....	39
TABELA V: Teste 1 - Análise do °Brix no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4) .....	43
TABELA VI: Teste 1 - Análise do teor de proteína bruta no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4) .....	43
TABELA VII: Teste 1 - Análise do teor de proteína bruta (em base úmida e sem lavagem) no Pellet dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4) .....	44
TABELA VIII: Teste 2 - Análise no °Brix no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4) .....	45
TABELA IX: Teste 2 - Análise do teor de proteína bruta no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4) .....	46
TABELA X: Teste 2 - Análise teor de proteína bruta no Pellet Lavado dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4) .....	46
TABELA XI: Teste 3 - Análise do °Brix no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4) .....	48
TABELA XII: Teste 3 - Análise do teor de proteína bruta no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4) .....	49
TABELA XIII: Teste 3 - Análise do teor de proteína bruta no Pellet Lavado dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4) .....	49
TABELA XIV: Teste de adição de autolisado com alta qualidade.....	59

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA I: Ilustra a constituição da parede celular de leveduras.....	12
FIGURA II: Ilustra como deve ser feita a contagem nas Câmara de Neubauer.....	28
FIGURA III: Proteína bruta (%) liberada no meio extracelular durante o processo de Tratamento Comum do Creme.....	51
FIGURA IV: Análise de proteína bruta (%) em base seca na matéria-prima ao longo do Tratamento Comum Creme.....	53
FIGURA V: Potencial autolítico da levedura seca <i>in natura</i> e após a autólise, com e sem lavagem.....	54
FIGURA VI: Proteína bruta (%) expressa em base seca do pellet °Brix e Proteína bruta do sobrenadante em autólise durante 48hs .....	55
FIGURA VII: Análise visual das leveduras no processo de autólise durante 48hs .....	56
FIGURA VIII: Análise de viabilidade celular com Azul de Metileno das <i>leveduras in natura</i> (A) e após 2, 6 e 48hs 48hs de autólise (B, C, D) .....	57
FIGURA IX: Análise do percentual de proteína bruta em base úmida na levedura (sobrenadante e pellet) ao longo do processo de autólise industrial .....	58

## RESUMO

AVALIAÇÃO DO MOSTO FERMENTATIVO DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE CERVEJARIAS E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE AUTÓLISE INDUSTRIAL. A levedura de cerveja, largamente utilizada na indústria de fermentação, é uma excelente fonte de proteínas, podendo assim ser utilizada por indústrias de nutrição humana e animal. A Biomin Nutrição Animal do Brasil é uma empresa de origem austríaca atuante na área de biotecnologia, que iniciou suas atividades no ano 2008 na cidade de Piracicaba – SP. Entre seus produtos o autolisado de levedura tem sua origem no processo de fabricação de cervejas, adquirido de grandes cervejarias parceiras da Biomin. Essa matéria-prima pode passar por diversos ciclos de fermentação em suas empresas de origem, e estes ciclos obviamente podem causar interferências na qualidade da matéria-prima. A detecção de baixos teores de proteína total no produto final (levedura autolisada), pela Biomin, levou ao interesse por caracterizar a matéria-prima proveniente destas cervejarias, para melhor compreender como suas variáveis poderiam interferir no processo, além de estudar as etapas do processo de tratamento comum da matéria-prima e o processo de autólise em escala laboratorial, visando identificar seus pontos falhos e promover assim sua otimização com o objetivo de melhorar a qualidade do produto final. A matéria-prima foi completamente avaliada nos laboratórios da Biomin, onde os parâmetros de pH, temperatura, sensoriais (odor e coloração), de conteúdo de massa seca, viabilidade celular, presença de resíduos, grau Brix e a determinação dos teores de proteína, álcool, ácidos e açúcares totais foram levantados. Foi evidenciado que existem pequenas diferenças entre os dois principais fornecedores principalmente quanto aos teores de álcool, ácidos lácticos, proteína bruta presente no sobrenadante e viabilidade celular, assim foi possível constatar que o fornecedor “A” possui melhor qualidade que o “B” quanto as características físico-químicas e também maior viabilidade. Porém de maneira geral a matéria-prima foi considerada com qualidade melhor do que se esperava antes dos experimentos. Houve ainda a análise do Fornecedor “C” que contribuiu com parâmetros distintos dos dois principais fornecedores. O conhecimento do teor de compostos nitrogenados presentes na levedura *in natura* (>50%) e sua variação ao longo do processo também foi registrado. Quanto aos experimentos em bancada, simulando o processo de autólise em larga escala, foi possível compreender quais etapas eram mais prejudiciais na operação realizada na empresa. Entre elas a mais impactante foi o tempo de exposição da levedura ao aquecimento antes da centrifugação. Assim, somando-se o levantamento das características da matéria-prima ao melhor entendimento das etapas do processo foi possível adotar medidas para o melhor direcionamento da matéria-prima em relação ao produto desejado e definir melhorias para o processo de produção.

Palavras-chave: *Saccharomyces*, leveduras, proteína bruta, fermentação, Processo de autólise.

## ABSTRACT

EVALUATION OF THE FERMENTATIVE WORT FROM BREWERIES' YEAST AND OPTIMIZATION OF THE INDUSTRIAL AUTOLYSIS PROCESS. Brewer's yeast, widely used in the fermentation industry, is an excellent source of protein, thus used by human and animal nutrition industries. Biomin Animal Nutrition of Brazil is an Austrian company that is renamed in the area of biotechnology, beginning its activities in 2008 in the city of Piracicaba - SP. Among its products is the autolysate yeast coming from the brewing process, acquired from large breweries in partnership with Biomin. This raw material can go through several fermentation cycles in the production companies, and these cycles can obviously cause interferences in the quality of this material. The detection of low levels of total protein in the final product (autolysed yeast), by Biomin, led to the interest of classifying the raw material from these breweries, in order to better understand its variables and how it can interfere with the process, also considering the steps of the standard treatment process of the raw material as well as the process of autolysis in a laboratory scale, in order to identify its flaws and promote optimization, aiming the quality improvement of the final product. The raw material was fully evaluated in the Biomin's laboratories, where the parameters of pH, temperature, sensory (smell and color), dry matter content, cell viability, presence of residues, Brix level and the amount of protein, alcohol, acids and sugars were verified. It was found that there are small differences between the two main suppliers, mainly regarding alcohol, lactic acid, total protein present in the supernatant and cellular viability, being able to conclude that supplier "A" keeps better quality than "B" for physical-chemistry characteristics and higher viability too. However, generally speaking, the raw materials were considered to be of better quality than the expected before the experiments. There was also the analysis of the supplier "C" that contributed with different parameters from the two main suppliers. The knowledge of the nitrogenous content present in the *in natura* yeast (> 50 percentage) and its variation throughout the process was also recorded. As for the bench tests, which simulated the process of large-scale autolysis, it was possible to understand which stages were more harmful in the operation carried out in the company. Where, among them all, the most impacting was the exposure time of the yeast to the heating before centrifugation. Finally, by matching the understanding of the raw material characteristics to the better understanding of the stages of the process, it was possible to implement actions to a better handle of the raw material towards the desired final product and to define improvements for the production process.

**Key words:** Saccharomyces, yeasts, total protein, fermentation, Process of autolysis.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1.Introdução.....	1
1.1 - Fermentação.....	3
1.2 - Fungos.....	4
1.3 - <i>Sacchamomyces</i> .....	5
2. A indústria da cerveja como produtora de matéria-prima para fábricas de ração animal.....	7
3. O processo de autólise.....	11
3.1 - Fatores que influenciam no processo de autólise.....	14
3.1.1 – Temperatura.....	14
3.1.2 - pH.....	16
3.1.3 - Etanol.....	17
4. A empresa Biomin Nutrição Animal do Brasil.....	19
4.1 – Spray Dryer.....	21
5. Objetivos da dissertação.....	22
6. Materiais e Métodos.....	24
6.1 – Análise dos parâmetros físico-químicos e biológicos da matéria-prima (creme).....	24
6.1.1- Medidas de pH e temperatura no recebimento do creme.....	25
6.1.2- Coloração e odores.....	25
6.1.3 – Massa seca.....	25
6.1.4 – Quantificação dos sedimentos.....	25
6.1.5 – Análise do °Brix.....	26
6.1.6 – Teores de álcool, ácidos orgânicos e açúcares.....	26
6.1.7- Teores de nitrogênio total (proteína bruta) .....	26
6.1.8 – Viabilidade celular.....	27
6.1.9 – Secagem com mini spray dryer.....	28
6.2 - Estudo dos parâmetros dos processos de Tratamento Comum do Creme e Autólise e sua relação com a qualidade do produto final.....	29
6.2.1 - Autólise experimentais.....	29
7. Resultados e discussões.....	32
7.1 – Análise da matéria-prima.....	32
7.1.1 - Teores de Álcool e Açúcares da Matéria-Prima.....	32
7.1.2 - Teores de Ácidos Orgânicos.....	34
7.1.3 - Teores de Nitrogênio Total (Proteína Bruta) .....	36
7.1.4 - Demais análises Físico-Químicas: pH, Temperatura no caminhão, Massa seca, Viabilidade Celular.....	38
7.1.5 – Presença de resíduos.....	40
7.1.6 – Grau Brix.....	40
7.1.7 – Análise dos resultados obtidos.....	40
7.2 – Autólises Experimentais .....	41
7.2.1 – Experimentos de autólise no creme do fornecedor A- Teste 1.....	41
7.2.2 – Experimentos de autólise no creme do fornecedor A- Teste 2.....	44
7.2.3 – Experimentos de autólise no creme do fornecedor A- Teste 3.....	47

8. Experimentos complementares.....	50
8.1 - Efeitos do aquecimento prévio e centrifugação na matéria-prima.....	50
8.2 - Potencial autolítico da levedura.....	53
8.3 - Acompanhamento do processo de autólise Industrial.....	57
9. Sugestão de Melhoria.....	59
10. Conclusões.....	60
11. Referências Bibliográficas.....	62

## 1. Introdução

Embora relatos demonstrem que a humanidade se beneficia há alguns milhares de anos de processo onde micro-organismos são utilizados, a descoberta de sua própria existência e vasta variedade é consideravelmente recente, datada de pouco mais de 300 anos. Mesmo com registros de panificação em documentos egípcios e babilônios, datados de 2300 A.C. (DZIEZAK, 1987), além de outras evidências da utilização de micro-organismos para a fermentação de bebidas alcoólicas e também para a fabricação de alimentos como pães há cerca de 8.000 anos atrás (DRAGONE et al., 2010; FERREIA et al., 2010), apenas entre 1673 e 1723 surgiram os primeiros relatos e pesquisas sobre a existência dos micro-organismos. Neste período, o mercador holandês Anton van Leeuwenhoek escreveu várias cartas para a sociedade Real de Londres descrevendo o que então chamou de “animálculos”. Seus desenhos identificados como representações de bactérias e protozoários, foram baseados nas observações feitas nos microscópios que ele mesmo fabricava. Poucos anos antes, em 1665, o inglês Robert Hooke havia relatado o que ele denominou como “pequenas caixas” ou “células”. Hooke havia observado células em uma fatia fina de cortiça, este foi o marco inicial da Teoria Celular, defendendo que todas as coisas eram compostas por células. Estas descobertas dariam força aos questionamentos sobre a Teoria da “Geração Espontânea” onde até meados do século XIX alguns cientistas e filósofos acreditavam que algumas formas de vida poderiam surgir espontaneamente da matéria morta.

Apenas por volta de 1863, o cientista francês Louis Pasteur fez uma série de experimentos onde comparava frascos com caldos nutritivos que haviam sido aquecidos visando sua total esterilização e devidamente vedados com outros frascos iguais que não haviam passado por processo de aquecimento. Pasteur constatou que os frascos vedados mantinham as características do caldo sem apresentar sinais de degradação. Estas descobertas fariam os anos entre 1857 e 1914 serem considerados os anos de Ouro da Microbiologia, com várias descobertas sobre micro-organismos nocivos causadores de doenças, suas atividades bioquímicas, melhorias em técnicas de microscopia, entre outras.

Ainda neste mesmo período Pasteur, ao tentar compreender porque os vinhos azedavam, descobriu que os agentes responsáveis pela fermentação alcoólica eram as leveduras, até aquele momento acreditava-se que o ar convertia os açúcares

em álcool. Assim, compreendeu que quando o vinho estava contaminado com outros micro-organismos como bactérias e na presença de oxigênio, o álcool era convertido em ácido acético. Desde então os avanços na microbiologia continuam até os tempos atuais em uma vasta série de pesquisas para melhor compreender a grande variedade e os vários processos aos quais os micro-organismos estão envolvidos (TORTORA et al., 2010).

Como conhecido, os micro-organismos possuem inúmeras utilidades, podendo ser utilizados desde a fermentação originada há milênios, como nos mais modernos processos biotecnológicos, onde muitos ainda estão sobre processo de investigação científica. Seu uso se fez presente em grandes momentos históricos da humanidade, como por exemplo ao final da Primeira Guerra Mundial, quando a Alemanha buscando amenizar a crise provocada na produção de alimentos, fez a incorporação de 16.000 toneladas de *Candida utilis* na complementação da alimentação alemã (CORREA, 1992).

Características como sua funcionalidade natural de decompor a matéria orgânica nos ciclos naturais promovendo o retorno de nutrientes para a natureza passou a ser melhor compreendidas a partir de 1880, quando Martinus Beijerinck e Sergei Winogradsky, os dois microbiologistas formaram a base para este conhecimento. A partir deste trabalho, até os dias atuais, inúmeras outras atividades microbianas foram melhor compreendidas e aprimoradas para atuarem em processos industriais e comerciais.

Além da fermentação, utilizada na fabricação de pães, combustíveis e bebidas fermentescíveis, também se destacam a utilização da ecologia microbiana que busca compreender como as diferentes populações microbianas interagem direta e indiretamente com plantas e animais em diferentes ambientes.

Assim, processos como tratamento de esgotos, onde micro-organismos convertem a matéria orgânica em produtos secundários como dióxido de carbono, nitratos, fosfatos, sulfatos, amônia, sulfato de hidrogênio e metano e biorremediações onde enzimas produzidas por micro-organismos podem degradar toxinas, desentupir bueiros e serem usadas em detergentes domésticos podem ser melhor aproveitados.

O controle biológico e o DNA combinante também são exemplos de como os micro-organismos podem ser utilizados. Bactérias como a *Bacillus thuringiensis* são usadas como controle biológico em lagartas, vermes e brocas que atacam vários tipos de lavouras, pois estas bactérias produzem cristais proteicos

tóxicos para o sistema digestório da lagarta que os ingerem quando pulverizados na plantação, ainda na agricultura, bactérias geneticamente alteradas estão sendo utilizadas para proteger os frutos contra insetos e outros micro-organismos prejudiciais a planta (TORTORA et al., 2010).

## 1.1. Fermentação

Ao final do século 19, entre os anos de 1880 e 1890, decorrente da continuidade dos estudos envolvendo os micro-organismos, surgiu o conceito de selecionar cepas de micro-organismos puras para iniciar processos de fermentação. E.C. Hansen, originário da Dinamarca passou a utilizar cepas de leveduras puras para a fabricação de cervejas que até aquele momento eram fabricadas com a adição de fermentos constituídos por uma mistura de bactérias e leveduras obtidos de lotes anteriores (RAINIERI, 2009). Nesta mesma década Müller-Thurgau Gesenheim (na Alemanha) também iniciou trabalhos com o conceito de leveduras puras (PRETORIUS, 2000). Estas descobertas ampliaram as opções de utilizar os micro-organismos em diferentes processos para vários produtos, como por exemplo a seleção de leveduras específicas para a fabricação de cervejas diferenciadas. Como exemplo a *Saccharomyces pastorianus* ou *Saccharomyces carlsbergensis*, utilizadas para a fabricação das cervejas modelo Lager, que representam 90% da produção mundial de cerveja. Estas leveduras se adequam melhor a fermentações em temperaturas mais baixas do que o usual, em torno de 8 a 15°C. *Saccharomyces cerevisiae* é a mais adequada para a produção de cervejas estilo Ale, devido a sua alta capacidade fermentativa entre 20 a 25 °C, característica desta cerveja.

Hoje sabe-se que os micro-organismos são uma importante fonte de proteínas, glicídios, lipídios, vitaminas e minerais. Sua grande variedade inclui algas, bactérias, fungos e dentre estes as leveduras, classe à qual pertencem as *Sacchomyces* e a *Candida*, que são largamente utilizadas em processos industriais e experimentos relacionados a pesquisa ao redor do mundo.

## 1.2. Fungos

Pertencentes ao Domínio Eukarya, o mesmo de animais, o fungos são organismos complexos e diversos, são quimioheterotróficos e portanto necessitam de carbono como fonte de energia, apresentam respiração aeróbica ou anaeróbica facultativa, e somente alguns poucos fungos são apenas anaeróbicos “(STWART & RUSSEL, 2005; WALKER, 1998; PHAFF, 1990). Fontes de carbono como glicose, frutose e maltose são consideradas preferenciais, porém seu desenvolvimento também é considerado eficaz em outras fontes como maltose, sacarose e xilana. (BERGEN, 2006; BIELY e KREMICKY, 1998; CARLSON, 1998; STEWART e RUSSEL, 1998).

Por terem características específicas, muitas delas diferentes das bactérias como melhor crescimento em pH próximo de 5, considerado ácido para bactérias, maior resistência a pressão osmótica, menor necessidade de umidade e de nitrogênio para se desenvolver, os fungos podem ser encontrados em ambientes considerados hostis para as bactérias. São extremamente importantes na cadeia alimentar, sendo capazes de decompor a matéria vegetal morta com o uso de enzimas extracelulares como as celulases, atividade que não pode ser realizada pelos animais e bactérias. São conhecidas mais de 100 mil espécies de fungos, das quais podem ser multicelulares como os cogumelos e bolores e unicelulares como as leveduras.

Amplamente distribuídas na natureza as leveduras são utilizadas em larga escala em processos industriais como para a fabricação de etanol combustível, bebidas alcoólicas, pães e enzimas. Segundo QUEROL et al. (2003) aproximadamente 20 dos 100 gêneros taxonomicamente conhecidos, entre as mais de 700 espécies de leveduras, são relevantes para a vinificação e são usadas para fabricação de pães e bebidas alcoólicas. Sua reprodução pode ser assexuada por brotamento, como em *Saccharomyces* ou por gemulação e fissão celular como em *Schizosaccharomyces* ou ainda de forma sexuada (ALEXOUPOULOS et al.,1996; KENDRICK, 2000; KURTZAMN et.al.,1998). Em processos industriais, as leveduras em condições ideais, podem se multiplicar rapidamente promovendo o aumento de biomassa. Como são anaeróbicos facultativos, fatores ambientais como a disponibilidade de glicose e oxigênio, podem agir como reguladores deste processo. Assim, as leveduras podem utilizar o oxigênio ou um composto orgânico como receptor final de elétrons, metabolizando hidratos de carbono com a formação de

dióxido de carbono e água na presença de oxigênio, ou em sua ausência, fermentar os hidratos de carbono produzindo etanol e dióxido de carbono (EHSANI, 2009).

Essa foi uma característica muito importante para a sobrevivência e evolução destes micro-organismos, uma vez que no início da formação da atmosfera como conhecemos hoje, não havia grandes demandas de oxigênio. Assim, embora não tão vantajosa quanto respiração aeróbica, a fermentação foi mantida nestes micro-organismos. Estas características e sua alta eficiência na conversão proteica, possibilitam uma variedade de diferentes tipos de substrato para seu cultivo. As leveduras são utilizadas em diversos processos industriais os quais são produzidos cervejas, vinhos e pães em grande escala e por baixo custo (BUTOLO, 1997).

Dentre as leveduras mais utilizadas em processos industriais para obtenção de alimentos e etanol ganham destaque a *Saccharomyces cerevisiae*, *pastoriana*, *S. fragilis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida utilis* e *C. Tropicalis*, e *Rhodotorula* (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000). O vasto histórico de informações obtidos ao longo de dezenas de anos de estudos científicos e a sua aplicação em processos fermentativos e biotecnológicos, fazem da *Saccharomyces cerevisiae* um dos micro-organismos mais selecionados para realização de pesquisas científicas, além de ser classificada como GRAS (reconhecida como segura, ou do inglês: "Generally Regarded as Safe") (RÉVILLION et al., 2003; GERNGROSS, 2004).

### **1.3. *Saccharomyces***

A *Saccharomyces* é um micro-organismo aeróbio facultativo e assim, durante a respiração aeróbica ou aerobiose irá, produzir CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, mas na fermentação anaeróbica ou anaerobiose utilizará a glicose para produzir etanol e CO<sub>2</sub>. Os carboidratos considerados substratos para a fermentação, podem ser endógenos, como o glicogênio e a trehalose, constituintes da própria célula ou exógenos, como a sacarose, glicose, frutose e outros, sendo estes fornecidos como alimentos para a fermentação.

Com a intenção de gerar ATP como fonte de energia e diante da influência de diversos fatores como a concentração de minerais, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura entre outros, as enzimas glicolíticas da levedura iniciarão o processo de fermentação, onde o etanol e o CO<sub>2</sub>

serão os produtos finais. Contudo, a alta concentração de açúcares pode inibir as enzimas respiratórias ocasionando o Efeito Crabtree, fazendo com que a levedura opte pela fermentação mesmo em condições aeróbicas (BRIGGS et al., 2004). O etanol e outros produtos da síntese como glicerol e ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros) também podem ser oxidados metabolicamente para a produção de mais ATP e biomassa, mas somente em condições de aerobiose. Além destes produtos secundários, polissacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, álcoois superiores, acetaldeídos, acetoína butilenoglicerol e outros também serão formados durante a fermentação. Em condições laboratoriais a taxa de conversão em etanol é de 95%, porém em processos industriais com variações maiores, a taxa de conversão chega em 90% de etanol, ainda sim, um processo muito viável economicamente.

A formação destes compostos secundários está associada ao estresses que podem ocorrer durante a fermentação. O glicerol, o mais abundante destes compostos está relacionado ao estresse osmótico, decorrente de concentrações elevadas de açúcares ou sais no mosto e o ácido succínico (segundo composto orgânico secundário mais abundante) pode estar relacionado a uma defesa da levedura perante a contaminação bacteriana, pois junto ao álcool, este ácido promove efeito bactericida (SCHMIDELL et al., 2001). A produção de bebidas alcoólicas consiste, basicamente em induzir a levedura a utilizar sua rota metabólica alternativa, desta maneira ao invés de metabolizar aerobiamente a glicose em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  a levedura, sob estresse, utilizará a via anaeróbica para metabolizar a glicose em etanol e  $\text{CO}_2$ .

## **2. A indústria da cerveja como produtora de matéria-prima para fábricas de ração animal**

Dados da CERVBASIL (Associação Brasileira da Indústria da Cerveja) mostram que o Brasil, mesmo tendo registrado uma queda de 2% na produção de cerveja entre os meses de Janeiro e Novembro de 2016 quando comparado ao mesmo período de 2015, ainda se mantém no 3<sup>o</sup>. lugar no ranking de países produtores de cervejas, atrás apenas da China e EUA, tendo uma produção média anual de 13,5 bilhões de litros da bebida. Com crescimento anual da produção na ordem de 5,4% até 2015, este é um ramo industrial com potencial de crescimento ainda maior, as cervejarias representam 1,6% do PIB brasileiro gerando cerca de 2,2 milhões de empregos ao longo de toda cadeia produtiva.

As indústrias cervejeiras brasileiras tem um importante papel na economia do país, pois origina uma imensa cadeia produtiva que se inicia no agronegócio passando por diversos outros setores como o de embalagens, maquinários, logística, construção civil, marketing, até chegar aos pequenos e grandes varejos de todas as cidades do país (CERVBASIL, 2016).

O processo de fermentação consiste em converter os carboidratos, principalmente polissacarídeos presentes nos cereais em etanol e CO<sub>2</sub>. No entanto, como as enzimas da via glicolítica da levedura metabolizam apenas monossacarídeos e dissacarídeos, estes carboidratos maiores precisam ser hidrolisados para que possam ser utilizados durante a fermentação. O cereal então, geralmente a cevada, passa pelo processo de maltagem, que produzirá o malte, onde são deixados até que comecem a germinar, formando assim amilase e maltase enzimas apropriadas para a hidrólise dos polissacarídeos da parede celular das sementes do cereal, convertendo os em maltose, glicose e outros monossacarídeos de reserva alimentar. A germinação pode ocorrer durante 4 dias, em seguida o processo é interrompido através de aquecimento controlado e então o grão segue para a torrefação.

O malte contendo as enzimas originadas durante a germinação será macerado, misturado com água e com sais necessários para o bom desenvolvimento das leveduras. As enzimas presentes no malte irão hidrolisar a maltose, glicose e outros açúcares simples, solúveis em meio aquoso. O mosto em seguida é pasteurizado para evitar contaminações provocadas por outros micro-organismos, neste momento adiciona-se lúpulo para aromatizá-lo e contrabalancear o dulçor do

malte, além de servir como conservante natural. O mosto então é resfriado e aerado e as leveduras selecionadas são adicionadas. No primeiro momento, as leveduras utilizando o oxigênio existente irão se desenvolver e a biomassa aumentará. Após o término do oxigênio a levedura entrará em estresse e irá alterar sua rota metabólica, passando a converter o açúcar em etanol e CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono). O processo chega ao fim com a separação do mosto fermentativo contendo as leveduras da cerveja bruta e nesta etapa as leveduras poderão ser reutilizadas em outros ciclos de fabricação de cervejas. (OETTERER, 2004; NELSON e COX, 2002).

As leveduras utilizadas no processo de fabricação de cerveja devem ser renovadas após uma determinada quantidade de reuso, sendo assim, substituídas por outro lote de leveduras mais novas. Devido ao sua constituição muito rica em proteína (48 a 52 %), RNA (7,5 %), minerais (8,3 %), carboidratos (32,9 %) e lipídios (3,4 %) (CABALLERO-CÓRDOBA et al., 1997) as leveduras descartadas podem então, ser reutilizadas em indústrias de outros setores como o de alimentos (NUNES et al., 2010). A reutilização destes resíduos é um fator de caráter econômico e ambiental para as cervejarias, pois se consegue aproveitar ao máximo toda sua cadeia produtiva, além de diminuir a quantidade de resíduos a serem descartados e consequentemente as despesas com seu tratamento. O fator ambiental vem sendo fortemente abordado por estas indústrias nos últimos anos, onde a preservação dos recursos hídricos é de extrema importância uma vez que 95% da composição da cerveja correspondem à água. (CERVBRASIL, 2014).

As leveduras utilizadas nas cervejarias são vendidas a um valor consideravelmente baixo para empresas de nutrição animal para a fabricação de rações e aditivos para suínos, aves, peixes e bovinos (BARROSO et al., 2013; HUIGE, 2006). A reutilização de leveduras para nutrição animal ganhou destaque em vários trabalhos científicos, onde uma visão mais moderna, busca implantar novos padrões de produção animal, pois embora os antibióticos tenham sido utilizados há décadas na produção de animais de corte como bovinos e suínos e seus benefícios tenham sido importantes naquele momento (HAYS, 1981; CROMWELL, 2001) durante as duas últimas décadas a União Europeia e os Estados Unidos, iniciaram projetos visando a eliminação do uso de antibióticos promotores de crescimento com o intuito de evitar que a presença de resíduos alcancem produtos comestíveis utilizados na alimentação humana, o desenvolvimento de resistência bacteriana, reduzir os riscos de alergias (BAGER et al., 2000) e aumentar as opções de substituição das fontes

proteicas de origem animal nas dietas, prevenindo a ocorrência de zoonoses, como a encefalopatia espongiforme bovina e as salmoneloses (RUTZ et al., 2006).

Outro fator importante, é a possibilidade de otimizar o processo de produção de alimentos, não só para humanos como para animais também. Esse fator poderia não só ajudar a combater a desnutrição em várias regiões do planeta como também ser menos prejudicial ao meio ambiente, diminuindo as áreas destinadas à produção de grãos utilizados na dieta humana e animal, reduzindo o desmatamento, contaminação e utilização excessiva do solo e da água e a emissão de gases como dióxido de carbono, metano, óxido nitroso e amônia, impactando diretamente em problemas ambientais como o aquecimento global, diminuição na camada de ozônio e a ocorrência de chuva ácidas (SPIES, 2003; TESTA, 2004; MIRANDA, 2007).

Embora exista a necessidade de contínuos estudos para a obtenção e otimização de processos em escala industrial para a utilização destes resíduos (micro-organismos) alguns estudos comprovam as vantagens nutricionais da inclusão de leveduras secas na dieta de animais de corte (HALÁSZ e LÁSZTITY, 1991). Na suinocultura, o foco é utilizar a levedura como substituição do farelo de soja, onde se avalia a conversão alimentar em animais em crescimento. Melhoras nas variáveis como morfologia intestinal, como a altura dos vilosidades e da profundidade das criptas intestinais, desenvolvimento dos órgãos digestores e a atividade das enzimas digestivas pancreáticas, são de extrema importância para a melhor utilização das leveduras secas como substituto alimentar (BERTECHINI, 2006; LERNER & SHAMIR, 2000; BUENO et al., 1994).

Em peixes, a complexidade da ração dos alevinos é considerada um ponto crítico para o rendimento e sustentabilidade da saúde do peixe, portanto o completo conhecimento de características da ração como a digestibilidade dos nutrientes que compõem a ração é de extrema importância para o bom desenvolvimento dos peixes (CHO, 1987). Estudos demonstram que a levedura de cerveja é adequada para repor 50 % da proteína existente na ração de peixes sem comprometer sua qualidade. Sendo assim foi bem avaliada como substituta para alimentos vivos e complementos alimentares para rações. (NAYAR et al., 1998; OLIVA-TELES & GONÇALVES, 2001; RUMSEY et al., 1991).

Outro fator positivo e importante nas leveduras de cervejarias é a presença de vários imunoestimulantes com a  $\beta$ -glucanas, ácidos nucleicos e oligossacarídeos como as mananas (WHITE et al., 2002; YALÇIN et al., 2012).

Mostrando-se eficaz no aumento da resistência imunológicas como resistência contra bactérias como *Streptococcus iniae* e no equilíbrio da flora intestinal, proporcionando melhor saúde e crescimento para os peixes. (ORTUÑO et al., 2002; SIWICKI, 1994; LARA-FLORES et al., 2002).

### 3. O processo de autólise

O entendimento da levedura como um todo, analisando suas características biológicas e físico-químicas, se faz importante para um melhor entendimento de sua utilização em processos fermentativos e posteriormente para sua inativação ou exposição ao processo de autólise. A parede celular da levedura é extremamente resistente, sendo mais fina nas células jovens e espessando-se com o seu amadurecimento, formando uma armadura que envolve toda a levedura (DUPRES et al., 2010). Sendo formada por duas camadas distintas (OSUMI, 1998), uma camada interna composta por cerca de (48 – 60%) de glucanas, que é um polímero de unidades de glicose com ligações  $\beta$ - (1-3) e  $\beta$ -(1-6) interligados, que a torna insolúvel, e assim responsável por evitar a lise osmótica e pela rigidez da parede celular. A outra camada, a externa, é formada de manoproteínas (20 – 23%) que consiste de dois tipos de mananos ligados à uma rede de proteínas interligadas por ligações dissulfídicas e intraligadas por ligações de hidrogênio. Esta é responsável por proteger a célula de fatores externos como contra o ataque de enzimas sintetizadas por outros micro-organismos e também responsável pela porosidade da parede celular. Completando a parede celular encontram-se proteínas (6 a 8%), parte da qual possuindo atividade enzimática, já que invertases e outras hidrolases foram identificadas na parede celular (PELCZAR et al., 1980), quitina (0,6-2,7%), que é composta por  $\beta$ - (1-4) N-acetilglicosamina e uma pequena porção de lipídios (FLEURI & SATO, 2005).

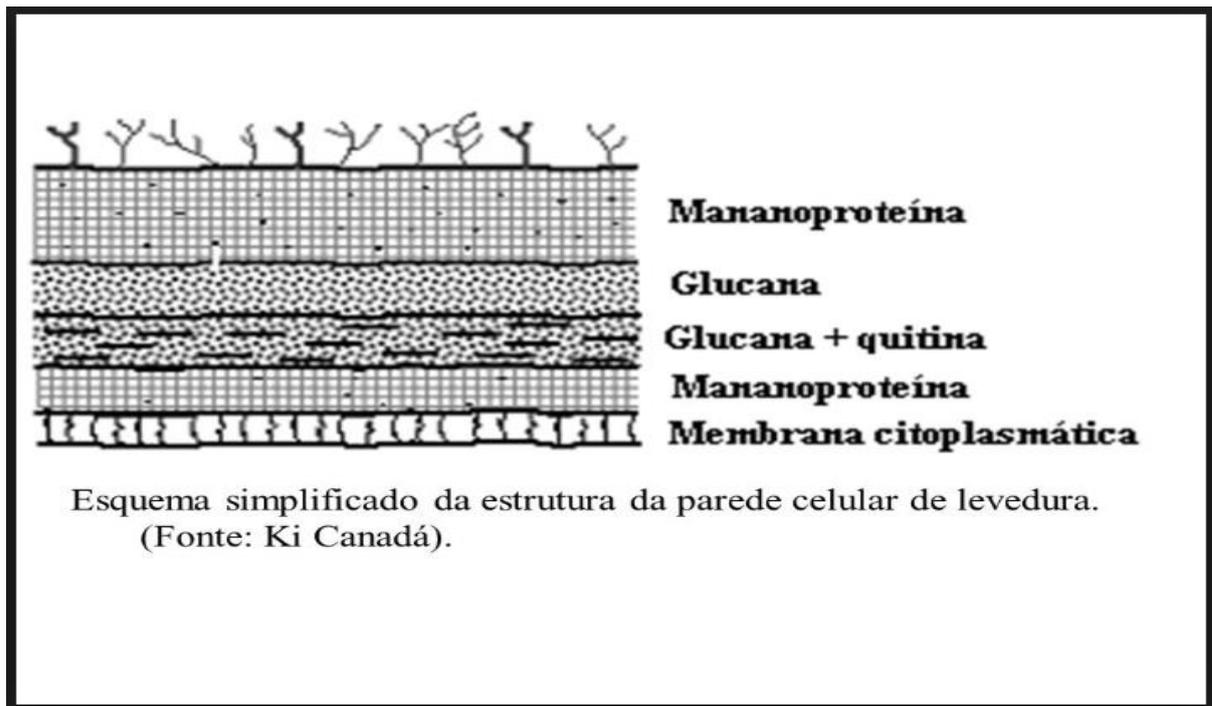


FIGURA I: Ilustra a constituição da parede celular de leveduras.  
<https://slideplayer.com.br/slide/3687621/>

Para que ocorra o processo de autólise, descrito pela primeira vez em 1875 por SALKOWSKI e com os primeiros estudos publicados apenas em 1954, onde VOSTI e JOSLYN explicaram os princípios do processo bioquímico da autólise em leveduras de panificação, a parede interna e externa necessitam ser hidrolisadas. Assim, a célula deve ser induzida ao processo de autólise, onde suas próprias enzimas irão solubilizar a parede celular (TANGULER & ERTEN, 2008; SHIN et al., 2009).

Células que são envolvidas apenas por membranas celulares, são consideravelmente mais frágeis do que as que possuem parede celular como as leveduras. Desta forma, pequenas variações na pressão osmótica ou aplicação de ultrassom de baixa intensidade podem promover a ruptura de sua membrana (CHARPENTIER et al., 1986). Mas, com as leveduras devido a sua resistente parede celular formada por manoproteínas e  $\beta$ -glucanas (GIOVANI et al., 2012) é necessário o sinergismo entre as enzimas presentes em seu interior, assim as atuações em passos gradativos das glucanases e proteases se tornam muito importantes. Ao atacar a camada externa da mananoproteína, a protease possibilita o acesso da  $\beta$ -1,3 glucanase à camada  $\beta$ -glucana causando o aumento de sua porosidade e o extravasamento dos biopolímeros da célula por diferença de pressão osmótica (ALEXANDRE H & GUILLOUX-BENATIER M, 2006). Em paralelo a  $\beta$  (1-6) glucanase

e manases promovem a solubilização da matriz da parede celular, sendo inativadas em seguida (NITSCHKE et al. 2012; SCOTT & SCHEKMAN, 1980; KITAMURA, 1982; HUNTER & ASENJO, 1988).

Após a fase de crescimento, fatores naturais como estresse nutricional, alta temperaturas ou o próprio envelhecimento natural da célula induzem enzimas endógenas ao processo de autólise natural em leveduras que perderam a capacidade reprodutiva, nesta etapa ocorre a promoção das atividades proteásicas na célula com posterior hidrólise dos compostos nitrogenados e liberação desses no meio, portanto este processo está diretamente associado a morte celular, este seria um mecanismo de autodestruição pré-programado (SHIN et al., 2009; SATO et al., 1987). Neste processo, o conteúdo citoplasmático ou biopolímeros intracelulares (proteínas, peptídeos, ácidos graxos, nucleotídeos e aminoácidos) é hidrolisado por endoenzimas a compostos de baixo peso molecular e liberados no meio extracelular (ALEXANDRE & GUILLOUX, 2006). Segundo HOUGH e MADDOX (1970) essa atividade é considerada a mais importante característica da autólise em leveduras, simultaneamente a esta etapa ocorre a degradação dos componentes da parede celular (Glucanas e manoproteínas) tornando-as mais porosas e permeáveis facilitando a liberação dos hidrolisados (BABAYAN et al., 1981). Portanto, em processos industriais onde a célula é induzida ao processo de autólise através do aumento da temperatura, adição de agentes plasmolizantes e outros fatores que possam romper a integridade das membrana citoplasmática ou torna-la mais porosa e/ou ativar suas enzimas hidrolíticas, deve se indiscutivelmente evitar a inativação destas enzimas endógenas, pois sua atividade é um fator determinante para a eficiência da autólise (DE ROOIJ E HAKKAART, 1985; BABAYAN et al., 1981). Segundo (HOUGH e MADDOX, 1970; KNORR et al., 1979) o estudo da biossíntese e da desintegração através da ação das enzimas foi o primeiro passo para compreender a digestão enzimática da parede celular das leveduras. Após esta fase, outros estudos buscaram avaliar fatores envolvidos no processo de autólise, buscando otimizar e aprimorar este processo (SUGIMOTO, 1974; BABAYAN et al., 1981; ORBAN et al., 1994; VERDUYN et al., 1999).

(MORENO-ARRIBAS et al., 2009) considera os peptídeos e os aminoácidos os principais componentes lançados no meio extracelular durante o processo de autólise. BABAYAN et al., (1981) define a autólise como o processo de formação e liberação de compostos de baixo peso molecular através da hidrólise

enzimática de biopolímeros intracelulares causando a morte celular. Ele divide o processo de autólise em 3 fases:

- 1 - O lançamento de enzimas hidrolíticas e seus substratos devido a distúrbios nas estruturas intracelulares (membrana citoplasmática e lisossomos);
- 2 - Com a degradação de inibidores de proteases e ativação das proteases intracelulares, ocorre o acúmulo de produtos hidrolisados na parede celular, devido ao contato destas enzimas ativas com os polímeros intracelulares;
- 3 - Os produtos da hidrólise, por serem pequenos o bastante podem ser lançados por difusão ao meio extracelular. Estes produtos, entre eles os compostos nitrogenados, encontram uma parede celular que não se rompe durante o processo de autólise, porém encontra-se mais porosa, pois seus componentes (glucanas e manoproteínas) são degradados em paralelo com os citoplasma da célula, facilitando assim o processo de difusão para o meio extracelular, ainda segundo o autor, através da quantificação destes produtos pode-se qualificar a eficiência do processo de autólise.

### **3.1. Fatores que interferem no processo de autólise celular**

O processo de autólise celular natural ocorre de forma lenta e controlada, após atingir a fase de estabilização a população de leveduras começa a cair lentamente e as células em um complexo processo programado, passam a ser degradadas pela ação de suas endoenzimas. Contudo, para fins industriais, esse processo de degradação celular com posterior liberação de componentes intracelulares de interesse no meio pode ser otimizado e acelerado. Vários são os fatores que podem contribuir ou prejudicar o processo de autólise, afetando a atividade proteolítica das enzimas. Entre eles os mais citados nas literaturas são a temperatura e o pH, além de outros agentes plasmolisantes e intervenções mecânicas (BABAYAN et al., 1981). A presença de etanol também pode auxiliar no processo de autólise, porém em excesso pode se tornar tóxico e inativar enzimas importantes, mesmo este sendo o principal metabólito natural do processo fermentativo da levedura.

**3.1.1 Temperatura:** A temperatura é um dos fatores que mais interferem no processo de autólise, atuando diretamente na síntese e atividade das enzimas endógenas

(WHITAKER, 1972) em outros mecanismos de controle celular como a transferência de informações anabólicas dos genes aos ribossomos, absorção de íons e moléculas e principalmente na composição e na integridade das membranas celulares estando diretamente ligados a sua permeabilidade (REED & NAGODAWITHANA, 1991). A temperatura é mencionada quando analisa-se a liberação de compostos nitrogenados de baixo peso molecular, decorrentes da hidrólise de compostos intracelulares durante o processo de autólise. Segundo COLAGRANDE e SILVA (1981) e COLAGRANDE et al., (1984) leveduras presentes em vinho aquecidas entre 35°C a 45°C durante 24 a 72 horas apresentaram um aumento de 4 a 12 % no teor de compostos nitrogenados de peso inferior a 1000, simultaneamente ocorre a diminuição de 6-9% nos teores de compostos nitrogenados de peso molecular mais elevados como peptídeos e proteínas. O específico sinergismo necessário para que as enzimas em determinada temperatura, atuem de maneira eficiente, acelerando o processo de hidrólise das endoestruturas, porém sem serem desnaturadas em altas temperaturas ou em períodos de exposição muito longos, justificam sua importância.

A mudança gradativa de temperatura também promove o aumento da permeabilidade da parede celular, possibilitando que compostos nitrogenados de baixo peso molecular, seja lançados passivamente ao meio extracelular, logo no início do processo de autólise (BABAYAN e BEZRUKOV, 1985). Nota-se também, que após 5 horas de incubação à 46 °C, diante da ação hidrolítica das proteases, ocorre um significativa diminuição na densidade da parede celular (composta por proteínas). Vários valores de temperaturas são citados na literatura, e elas podem interferir na qualidade do autolisado desejado. Temperaturas elevadas causam a morte rápida da levedura, sendo que a 48 °C aproximadamente 95 % das leveduras morrem em 45 minutos, a 50 °C em 18 minutos e a 52°C em 6 minutos (REED & NAGODAWITHANA, 1991). Entretanto, grande parte dos experimentos são geralmente conduzidos em temperaturas relativamente altas, geralmente entre 37°C e 48 °C (BARBAYAN et al., 1981; FEUILLAT & CHARPENTIER, 1982; LURTON et al., 1989; LEROY et al., 1990; HERNAWAN e FLEET, 1995).

Segundo BABAYAN et al., (1981) 60°C é a temperatura ideal para a alta atividades das proteases e 70°C para as nucleases. Porém essa temperatura pode ser reduzidas na presença de agentes plasmolíticos como etanol, éter acetato e lecitina. Ainda segundo BABAYAN et al., (1981) a temperatura ideal para o processo de autólise está entre 45 e 60 °C para uma solução com pH 5.

**3.1.2 pH:** Tão importante quanto a temperatura e extremamente relacionado com ela o pH exerce fator decisivo no crescimento da população das leveduras, influenciando na taxa de fermentação e na formação de produtos, além de controlar a contaminação por bactérias (ALVES, 1994). No processo de autólise, as enzimas devem encontrar uma série de condições para que sua atuação na hidrólise das organelas celulares aconteça de forma eficaz. Assim, a temperatura, o tempo das reações, a natureza e concentração do substrato, do tampão, forças iônicas e constantes dielétricas do meio (modula -se pela adição de solventes orgânicos como o etanol) estão ligadas ao pH, restringindo a alta atividade enzimática a uma faixa de pH bem determinada e estreita, e por isso esta variável é tão determinante no processo de autólise (WHITAKER, 1972).

O controle do pH é uma importante ferramenta de controle da contaminação por bactérias em dornas de fermentação, pois são menos resistentes a pH baixo, além de possuírem taxas de crescimento menores nesta condição, como por exemplo as bactérias lácticas que possuem um pH ideal na faixa de 6.0 enquanto a *S. cerevisiae* possui um bom rendimento na faixa de 3.8 (KANDLER e WEISS, 1986). Muitos estudos demonstram os diversos valores de pH usados em autólises experimentais, a maioria destaca que o pH próximo de 5 é o mais adequado para uma autólise mais eficiente (VOSTI & JOSLYN, 1954; BÉHALOVÁ & BERAN, 1979; KITAMURA, 1982).

Estudos associados a temperaturas demonstram a relação e a importância do pH no processo de autólise, através da quantificação dos compostos nitrogenados liberados pelas leveduras incubadas, assim muitos autores citam a eficiência da autólise. LURTON, (1989) compara a incubação a 40 °C de células de levedura em pH 5 e 3 durante 7 dias, e destaca que 85 % do nitrogênio celular foi liberado na solução com pH 5, diante de 65 % da outra solução com 3,0 de pH. No entanto, testes realizados com pH próximos de vinhos entre 3 e 3,5 % visando representar algumas metodologias de envelhecimento do vinho em contato com as leveduras após a segunda fermentação buscando enriquecer o vinho com produtos da autólise, mostram que a incubação entre 30 a 35°C foi tão eficiente em pH 3 quanto em pH 5, quando se quantificou os compostos nitrogenados. Reforçando os resultados positivos obtidos na faixa de pH entre 3 e 5, o consenso de que o pH acima de 5 não é adequado para a autólise também é expressado por FEUILLAT &

CHARPENTIER (1982) onde o rendimento da autólise foi 17 % menor em pH entre 6 e 8.

**3.1.3 Etanol:** Embora como exemplo o grau alcóolico do vinho, próximo a 11% vol, não seja considerado um fator inibidor da autólise em um grande número de trabalhos (BIDAN et al., 1985; MODRA & WILLIAMS, 1988) a presença de altas concentrações de etanol, dependendo da linhagem do micro-organismo pode vir a ser prejudicial ao processo de autólise, pois pode agir como inibidor em determinadas etapas do processo. A invertase de *Saccharomyces cerevisiae* por exemplo, sofre inativação de até 100% em concentrações de álcool acima de 8% v:v (ZECH & GORISCH, 1995). De acordo com autores como FENTON (1982) que abordam a utilização e a influência do etanol em processos de autóliques, o etanol obteve um resultado significativo em um tratamento com células de *Kluyveromyces fragilis* em concentração de 80% (peso de solvente/pesos seco de célula) durante 2 – 120 minutos, ainda segundo o autor o etanol não causa a ruptura da parede celular, mas atua como agente permeabilizador ao influenciar na extração de lipídios da parede celular, além de causar distúrbios nos sistemas de transportes das membranas ao se ligar em seu interior hidrofóbico causando seu enrijecimento (LOREIRO-DIAS & PEINADO, 1982; LEÃO & VAN UDEN, 1982; INGRAM, 1985). As influências do etanol nas leveduras podem variar de acordo com a linhagem, segundo JONES et al. (1981) a concentração de 10% (p:v) é a concentração máxima que proporciona o crescimento e 20% (p:v) que permite a produção de etanol para a maioria das linhagens.

As citações do uso de etanol utilizados em diversos trabalhos apontam que sua influência efetiva está diretamente relacionada ao pH da solução (SUGIMOTO, 1974), segundo o autor, a protease A foi significativamente inibida em soluções com concentrações alcóolicas superiores a 5% do vol. Outras enzimas também demonstram ser significativamente sensíveis a grandes concentrações de etanol, a hexoquinase e a álcool desidrogenase segundo CASEY & INGLEDEW (1976) e SHARMA & TAURO (1987) e a invertase, frutose-1,6-bifosfato aldose e piruvato descarboxilase as mais sensíveis segundo MILLAR et al. (1982). No entanto CHARPENTIER et al. (1986) ao compararem um meio com 13% e outro com 6% utilizando a liberação de nitrogênio intracelular como referência para avaliar a eficiência no etanol do processo de autólise constataram a maior intensidade na concentração mais elevada, sem evidenciar diferenças na atividade enzimática das

células de *S. cerevisiae*. A alta liberação de compostos nitrogenados intracelulares, também ocorre devido a diminuição da capacidade seletiva da membrana plasmática, permitindo a saída de constituintes celulares e a entrada passiva de prótons, resultando em deficiências nutricionais, o que intensifica a inibição alcoólica (CASEY et al., 1984; DOMBEK & INGRAM, 1986).

#### **4. A empresa Biomin Nutrição Animal do Brasil**

A Biomin do Brasil Nutrição Animal LTDA, é uma empresa de biotecnologia de origem austríaca, situada em Piracicaba, interior de São Paulo. Suas atividades foram inauguradas em 2008 e sua atual estrutura consiste em um prédio administrativo, uma planta de fermentação e uma planta de mistura. Atualmente com 140 colaboradores, a Biomin representa o maior investimento do Grupo ERBER (Austriaco), que está presente em todos os continentes, atuando em diversas áreas. Na cidade de Tull, na Áustria, onde se localiza o centro de pesquisa da Biomin, existe uma produtiva parceria com a Universidade de Tull, onde suas pesquisas englobam as áreas de microbiologia, biologia molecular, biologia celular, analíticas, controle da qualidade e fermentação. A Biomin tem como objetivos “soluções inovadoras e sustentáveis para a segurança e qualidade na agricultura, alimentação humana e animal para a crescente população mundial”. A empresa trabalha especificamente com nutrição de bovinos, suínos, aves, aquaculturas como peixes e camarões, probióticos, controle ambiental e prestando serviços no setor de fermentação.

Entre os produtos da Biomin dois produtos se destacam: as leveduras inativas (que foi submetida à centrifugação e secagem) e as leveduras autolisadas, que são usadas como aditivo para ração animal, possuindo um alto teor de proteína total superior a 37%, além de vitaminas do Complexo B. A principal matéria-prima de ambos os produtos é o mosto de cerveja (aqui chamado de creme de cerveja) adquirido através de processos de fermentação em grandes cervejarias.

Para ambos os produtos, existe um controle de qualidade para o direcionamento da matéria-prima. Quando os caminhões chegam à Biomin com o creme de levedura (oriundos de cervejarias) é realizada uma análise de massa seca, onde se espera um valor aceitável para o descarregamento. Também são avaliados a cor e odor do material. Então o creme é aquecido a 40 °C para proporcionar maior fluidez e o creme é centrifugado a 5.000 RPM, o Clarificado resultante da centrifugação é tratado na Estação de Tratamento de Efluentes da empresa para descarte no meio ambiente ou vendido para empresas que o utilizam como fertilizantes e do Concentrado (parte restante que continua no processo) serão determinados a massa seca e conteúdo de proteína bruta. O processo de aquecimento seguido de centrifugação é dado o nome de Processo de Tratamento Comum. Com os resultados de massa seca e proteína, o creme é direcionado ao

tratamento específico ao produto que se deseja (Levedura Inativa ou Levedura Autolisada). Para a Levedura Inativa ao creme inativado é adicionada a quantidade adequada de maltodextrina que vai impedir a aderência do creme no Spray Dryer durante a etapa seguinte de secagem. Este material é comercializado puro ou usado pela própria Biomin como ingrediente em outros produtos.

O outro produto (Leveduras Autolisadas) é submetido ao Processo de Autólise (Hidrólise dos biopolímeros das células para gerar a 'levedura autolisada'), que consiste no aquecimento do creme entre 48 °C e 50 °C durante 20 horas com controle de pH com ácido nítrico 54% entre 4,5 a 4,9. Após a autólise o creme é aquecido a 60 °C para a inativação das enzimas da própria levedura, a massa seca é quantificada e adiciona-se a quantidade adequada de maltodextrina e o produto também segue para a secagem no Spray Dryer. Assim como a Levedura Inativa, este produto pode ser comercializado ou ser usado internamente. A diferença entre estes produtos está no fato da levedura autolisada possuir maior disponibilidade dos compostos nitrogenados (Proteína Bruta) no meio extracelular, o que segundo trabalhos como RUMSEY (2008) e HISANO et al. (2008) aumenta a digestibilidade das proteínas em até 30% em Truta arco-íris quando comparado com a levedura integra.

Levantamento realizado na Biomin nos anos de 2013 e 2014, evidenciou que houve um considerado aumento (de 8%) nos lotes de produtos que ficaram com taxa de proteína abaixo do esperado: Em 2013, 43% do produto apresentaram taxa inferior de conteúdo proteico (42%) esperado pela empresa na época e em 2014 este número subiu para 51%. Um fator observado é que do total de lotes produzidos em 2014 que ficaram com conteúdo proteico abaixo do esperado, 76% deles foram produzidos nos últimos meses do ano, sem que houvesse alguma modificação no processo. Esse fato demonstraria que fatores relacionados à matéria-prima adquirida, poderiam estar influenciando na qualidade do produto final. Assim, estudar as características da matéria-prima, as etapas do Processo de Tratamento Comum e o Processo de Autólise poderiam levar à um maior conhecimento das melhores condições para se obter um produto de qualidade melhor.

## 4.1. Spray Dryer

A secagem por nebulização ou “Spray Drying” é utilizada desde escalas laboratoriais a toneladas de produtos na escala industrial, sua maior presença está nas empresas farmacêuticas e alimentícia. Ao ser atomizado o material adquire a forma de uma esfera o que aumenta sua área de contato com o ar quente (agente dessecante), tornando – o muito prático e produtivo. Outro fator de destaque é o curto tempo de exposição entre o produto a ser seco e a alta temperatura do sistema, esse fator faz com que produtos de origem biológica como extratos de plantas e micro-organismos, corantes, proteínas e enzimas possam ser secos e preservados. O sistema é basicamente composto de: 1) Sistema de atomização do material; 2) Sistema de aquecimento e controle de temperatura do ar de secagem; 3) Sistema de bombeamento e controle de vazão da alimentação de material a ser seco; 4) Sistema da alimentação de ar para secagem; 5) Câmara de secagem e 6) Sistema de separação ar – pó seco (ROSA et al., 2006).

## 5. Objetivos

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- 1 - Avaliar a qualidade da matéria-prima de levedura de cerveja, aqui chamado de creme, recuperada de companhias cervejeiras, relacionando aspectos físico-químicos e biológicos (pH, temperatura, massa seca, presença de resíduos, Brix, viabilidade celular, teores de proteína bruta, ácidos orgânicos, açúcares e etanol) que estão diretamente ligados ao modo como levedura foi utilizada, estocada, transportada e como se encontra no momento em que chega até a Biomin, relacionando estes aspectos com a periodicidade com que a matéria-prima é disponibilizada pelos nossos fornecedores e a influência destas características ao longo da cadeia produtiva na empresa e o resultado do produto final.
- 2 - realizar um estudo dos parâmetros envolvidos nos processos de Tratamento Comum do Creme e do Processo de Autólise. As variações nesses parâmetros, em nível de experimentos laboratoriais, poderão levar à melhor qualidade do produto final.

Para isso, foram propostos estudos com quatro Experimentos:

**Experimento 1.** Avaliação do processo de Tratamento Comum do Creme. Neste modelo serão utilizadas, no laboratório, as mesmas condições usadas no processo industrial: Centrifugação sob aquecimento a 40 °C. Neste experimento o valor de Brix, original da cerveja, não será modificado. O precipitado obtido neste procedimento será autolisado nas seguintes condições: Aquecimento entre 48 °C a 50 °C a pH entre 4,5 e 4,9 durante 24hs. Ao longo do experimento o autolisado será centrifugado e o precipitado será avaliado quanto ao teor de proteína bruta e massa seca e o sobrenadante quanto a proteína bruta e o Brix.

**Experimento 2.** Neste caso, a diferença em relação ao Experimento 1 é que no processo de Tratamento do Creme a amostra não será aquecida. Todos os demais procedimentos realizados para o Experimento 1 serão feitos no Experimento 2.

**Experimento 3.** Neste caso o creme será coletado após o aquecimento nos tanques da fábrica, porém diferentemente do Experimento 1, antes da centrifugação, o creme então será lavado, visando reduzir o valor do Brix (que geralmente é entre 4% e 8%) e seguirá o procedimento já descrito anteriormente de autólise. A quantidade de água

a ser adicionada ao creme será proporcional a quantidade de sobrenadante descartado após cada decantação.

**Experimento 4.** Neste caso o creme assim como no Experimento 2 não será aquecido e passará pelo mesmo processo de lavagem descrito no Experimento 3.

Todos os cremes resultantes de todos os experimentos serão secos (através do equipamento mini *spray dryer*, Marca Buchi, modelo B-290) e analisados quando a proteína total e massa seca.

## 6. Materiais e Métodos

### 6.1. Análise de parâmetros físico-químicos e biológicos da matéria-prima (creme).

Com o intuito de observar possíveis variações na qualidade da matéria-prima (creme composto por leveduras *Saccharomyces* na forma de células frescas em suspensão aquosa) proveniente das empresas fornecedoras, foram coletados o total de 29 lotes de cremes ao longo do ano de 2016 e durante o primeiro semestre de 2017 para o levantamento de dados correspondentes as características físico-químicas e biológicas da matéria-prima adquirida e suas possíveis variáveis ao longo do ano. O objetivo foi analisar amostras dos dois fornecedores e suas diferentes fábricas, com os quais a Biomin trabalhou neste período. No entanto, devido a disponibilidade dos fornecedores, não foi possível avaliar quantidades significativas de algumas unidades dentro de cada um dos dois fornecedores. O Fornecedor A, possuía 3 unidades fabris (A1, A2 e A3) e o fornecedor B possuía, naquele momento, 2 unidades fabris (B1 e B2). Destes, foi possível avaliar somente 1 amostragem da fábrica A1, seis amostragens da fábrica A2, e quatorze amostragens da fábrica A3. No caso do fornecedor B, foi possível avaliar cinco amostragens da fábrica B1 e duas amostragens da fábrica B2. No final dos experimentos foi possível avaliar uma única amostragem de um terceiro fornecedor "C" que, embora muito esporádico, contribuiu de forma expressiva pois seu creme de cerveja apresentou condições até então não encontradas nos outros fornecedores quanto a viabilidade celular significativamente baixa, sendo de 20 % de células viáveis, valor de °Brix e proteína do sobrenadante altos, sendo 13,2 e 5,71% respectivamente. Além disso, o creme aparentou uma densidade menor, observada devido à dificuldade para separar o pellet (levedura) do sobrenadante durante a etapa de centrifugação realizado no processo industrial, essa característica também se mostrou durante o processo de decantação realizado neste trabalho (Teste 3). Quando observada em microscopia a levedura também apresentava tamanho menor, quando comparada com leveduras analisadas dos outros 2 fornecedores. Este creme foi utilizado na última autólise experimental realizada neste trabalho e por possuir características distintas serviu para nos fornecer parâmetros comparativos entre as matérias-primas. Os parâmetros analisados e suas

metodologias utilizadas são descritas a seguir. Para todas as análises foi utilizada a infraestrutura da empresa Biomin, que contou com os equipamentos e reagentes necessários para o desenvolvimento das etapas.

Algumas análises propostas nesta dissertação já são comumente analisadas na Biomin. Estas análises seguem o Plano de Amostragem já estabelecido pelo Controle de Qualidade da empresa. Esse controle tem por finalidade assegurar que a matéria-prima esteja dentro das condições adequadas estabelecidas no contrato entre a Biomin e o fornecedor da matéria-prima. Portanto, assim que o caminhão contendo o creme de cerveja é devidamente estacionado para o descarregamento nos tanques de recebimento da Biomin, uma amostra de aproximadamente 250 mL é coletada em um frasco apropriado para a estocagem e análises como valor de pH, temperatura, cor, odores, massa seca e a concentração de leveduras são avaliados e registrados nos controles internos da empresa. A obtenção dos resultados das análises citadas acima, para utilização neste estudo, foram obtidas através deste controle. As amostras estocadas são descartadas após o processamento da matéria-prima na empresa.

#### **6.1.1. Medidas de pH e temperatura no recebimento do creme**

O pH e a temperatura das amostras foram analisados através do pHmetro - DIGMED - Modelo DM-22).

#### **6.1.2 Coloração e odores**

Análise sensorial, comparou-se ao histórico de amostragens existente, onde busca-se avaliar possíveis cremes em estado de degradação.

#### **6.1.3 Massa seca**

A determinação da massa seca foi feita em balança de raios infravermelhos (SHIMADZU – Modelo MOC – 120H). A quantidade entre 2 e 3 gramas da amostra foi espalhada no prato da balança e aquecida a 105 °C, a variação da massa da amostra devido a evaporação resulta no valor da massa seca em porcentagem.

#### **6.1.4 Quantificação dos sedimentos**

A amostra foi centrifugada em centrífuga Eppendorf -Modelo 5810 ou FANEM - Modelo 208 a 3.500 RPM, durante 5 minutos, utilizando 10 mL em tubo de centrifugação graduado. Apesar de alguns cremes de cerveja apresentaram pequenas quantidades de resíduos como malte e lúpulo provenientes do processo de fabricação da cerveja, estes resíduos foram apenas registrados em “Existentes ou Não Existentes”.

### **6.1.5 Análise do °Brix**

Criada pelo matemático alemão Adolf Ferdinand Wenceslaus Brix (1798 – 1870), o Brix é uma escala numérica para índice de refração. Assim, comparando o quanto a luz desvia em uma solução de água destilada em relação a solução a ser analisada, é possível de forma indireta determinar a quantidade total de todos os compostos dissolvidos (açúcares, sais, proteínas, ácidos e etc) nesta solução, obtendo-se o resultado em porcentagem. Para a medida do °Brix repetiu-se o procedimento de centrifugação do item anterior (6.1.4) e cerca de 1 mL do sobrenadante desta centrifugação foi analisado em refratômetro – Marca ATAGO - Modelo PAL-3 (0 – 93%).

### **6.1.6 Teores de álcool, ácidos orgânicos e açúcares**

Essas análises foram realizadas através de análises com técnica de cromatografia em fase líquida com Índice de Refração (HPLC - High Pressure Liquid Chromatography), utilizando cromatógrafo em fase líquida - Marca Agilent - Modelo 1260, centrífuga Excelesa 3 - Marca Fanem - Modelo 280 e banho ultrassônico- marca Unique, modelo: USC 1800A. Contendo solução de ácido sulfúrico 3mM -Marca Merck na fase móvel, temperatura de 50°C. A amostra foi centrifugada, e 1 mL do sobrenadante foi diluído em balão volumétrico de 20 mL com água deionizada. A massa exata deste 1 mL é registrada e utilizada para o cálculo do fator de diluição, o fator é inserido no software do equipamento. A amostra diluída nos balões volumétricos foram filtradas em filtros de 45 µm e analisados de acordo com a metodologia da empresa. Os resultados foram expressos em g/L.

### **6.1.7 Teor de Nitrogênio Total (proteína bruta)**

O conteúdo de proteína bruta foi avaliado pelo método DUMAS, no equipamento modelo FP-528, marca LECO (Leco Corporation St. Joseph, MI). Este

método consiste na oxidação total da amostra na presença de oxigênio 99,99995% a 850 °C, seguida de redução dos óxidos de nitrogênio e detecção do nitrogênio molecular produzido por um detector de condutividade térmica. Assim o teor de proteína bruta é calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio total encontrado pelo fator 6,25 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). Após a estabilização do equipamento com a análise de alguns “Branco” e a checagem da eficiência do equipamento com a análise em duplicata de padrões de EDTA onde busca-se o valor esperado entre 59,50 e 60% com desvio padrão menor que 1% o equipamento está pronto para as análises. Utilizando uma balança analítica marca Sartorius, o valor aproximado de 0,15 gramas das amostra, foram pesadas em folhas (amostras secas) ou em capsulas (amostras líquidas) de titânio, embrulhadas e o valor automaticamente inseridos no software do equipamento. A amostra introduzida no equipamento foi queimada a 850°C e os gases resultantes da queima, juntamente com o gás Hélio (gás de arraste) foram homogeneizados, filtrados por filtros contendo diferentes reagentes, cada qual com a finalidade de reter outros gases, ácidos e umidade, fazendo com o que apenas o nitrogênio total presente na amostra chegasse até a célula de quantificação. A relação do nitrogênio encontrado, da massa pesada e do fator de conversão de 6.25 foi calculada pelo software e o resultado exibido em porcentagem.

### **6.1.8 Viabilidade celular**

A viabilidade celular foi analisada com o método colorimétrico com vermelho de eritrosina segundo BONNEU et al. (1991). Este método baseia-se na adição do corante ao creme na proporção 1:1 (v/v) e da contagem (em câmara de Neubauer) das células mortas (coradas) e viáveis em microscópio óptico. Para análise do creme de levedura, transferiu-se 1.0mL do produto bem homogeneizado para um tubo com diluente (correspondendo a uma diluição  $10^{-1}$ ). Em outro tubo foi adicionado 0,2 mL do creme de cerveja e 0,2 mL da solução trabalho de eritrosina (proporção de 1 para 1)

O cálculo da viabilidade de células na amostra é feito da seguinte forma:

Total de células = células viáveis + células inviáveis (ambas multiplicadas por 2 devido a diluição 1:1 com o reagente eritrosina).

$$\text{Viabilidade das células (\%)} = \frac{\text{Células viáveis} * 100}{\text{Total de células}}$$

E o resultado foi expresso em porcentagem.

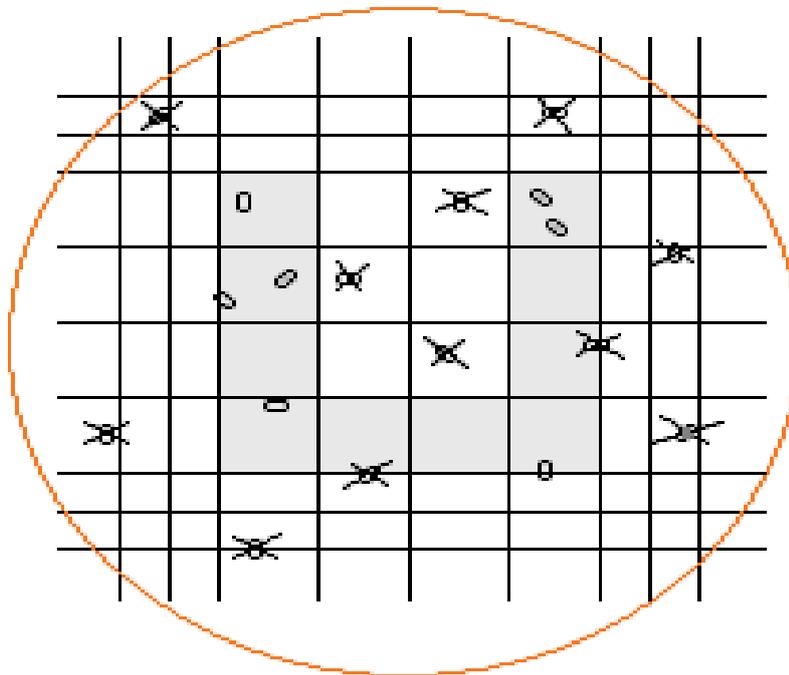


FIGURA II: Ilustra como deve ser feita a contagem nas Câmara de Neubauer.

### 6.1.9. Secagem com mini spray dryer.

O mini spray dryer B-290 - BUCHI opera de acordo com ar aquecido de secagem em contra - corrente (ex. ar em modo aberto) e produz vapor. Isto significa que o produto pulverizado e o gás quente tem a direção contrária. A temperatura e a pressão foram estabilizadas inicialmente com água destilada (ex.: set point 180°C, saída 80°C e pressão 45mm) e em seguida cerca de 500 mL do autolisado foram secos gerando um pó fino com massa seca próximo a 95%.

## **6.2. Estudo dos parâmetros dos processos de Tratamento Comum do Creme e Autólise e sua relação com a qualidade do produto final**

Após a avaliação das variáveis no creme, foram selecionados em momentos diferentes cremes com características consideradas adequadas para o processo de autólise (viabilidade > 80%, massa seca entre >10%, °Brix entre 4 e 7 e proteína bruta < 2% no sobrenadante). Diante do fato dos cremes do fornecedor A serem os mais frequentes e terem se mostrado, com uma qualidade maior do que o esperado pela empresa, decidiu-se por avaliá-los primeiramente. Essas análises foram chamadas de **Teste 1**.

Em seguida, como mencionado na avaliação da matéria-prima, tivemos a presença de um terceiro fornecedor, o qual seu creme apresentou características teoricamente ruins (viabilidade de 20%, massa seca entre < 10%, °Brix de 13,2 e proteína total de 5,71% no sobrenadante) para o processo de autólise. Esse creme com qualidade distintas nos forneceu condições para que pudéssemos avaliar quais os parâmetros podem ser levados em consideração para diferenciar e compreender cremes com baixa e alta qualidade, facilitando o direcionamento da matéria-prima para o produto adequado.

### **6.2.1 Autólises Experimentais**

No processo industrial, na Biomin, o creme proveniente das cervejarias passa pelos processos de aquecimento a 40 °C, visando proporcionar maior fluidez e homogeneização ao creme, possibilitando assim o passo seguinte de centrifugação. Após a centrifugação o creme é destinado a um dos dois produtos fabricados com esta matéria-prima: o constituído por leveduras integras inativas e o autolisado também constituído por leveduras inativas, porém, com o material intracelular disponibilizado no meio extracelular. Para a obtenção do autolisado o precipitado obtido, tem o pH ajustado para 4.5 com a utilização de ácido nítrico 53%, e em seguida é aquecido e mantido entre 48 °C a 50 °C durante 20hs. Para avaliar os possíveis danos causados na matéria-prima ao longo dos processos iniciais de aquecimento seguido de centrifugação, comuns para ambos os produtos e suas possíveis interferências ao longo do processo de autólise e na qualidade do produto final, foi

proposto o estudo de quatro Autólises Experimentais, descritos a seguir. Em todos os quatro experimentos, após os diferentes tratamentos, o precipitado obtido foi autolisado com aquecimento entre 48 °C a 50 °C, pH entre 4,5 e 4,9 durante 24hs. O autolisado foi avaliado quanto ao teor de proteína bruta e massa seca e °Brix ao longo do processo de autólise.

**Experimento 1 (E1).** Neste experimento buscou-se reproduzir as mesmas condições usadas em todos os cremes no início do processo industrial: O aquecimento a 40°C, seguido de centrifugação. O creme foi submetido à centrifugação sob aquecimento a 40 °C. Neste caso, com exceção do primeiro teste onde 10 litros do creme foram coletados logo após o descarregamento e aquecido em laboratório em agitador magnético – marca IKA – Modelo RET basic, e depois decantado, nos demais testes aproximadamente 5 litros da amostra foram coletados diretamente do processo, após o aquecimento a 40 °C e a centrifugação. Neste experimento o valor de Brix, original da cerveja, assim como no processo comum da fábrica, não foi modificado.

**Experimento 2 (E2).** Neste experimento o creme não foi aquecido nem centrifugado. Neste caso, 10 litros do creme *in natura* foram coletados logo após o descarregamento e deixados em câmara fria a 5 °C por 24 horas para decantação e em seguida aproximadamente 4 litros do sobrenadante foram descartados. Neste Experimento, o valor de Brix original também não foi modificado.

**Experimento 3 (E3).** Aqui, assim como no Experimento 1, o aquecimento a 40°C do Teste 1 se deu em agitador magnético – marca IKA – Modelo RET basic, em laboratório. Nos demais testes cerca de 10 litros do creme foram coletados logo após o aquecido a 40 °C na fábrica (porém antes da centrifugação) e armazenado em câmara fria para decantação a 5 °C por 24 horas. Para avaliar a interferência do Brix, diferentemente do Experimento 1, 4 litros do sobrenadante foram descartados e foram adicionados ao concentrado 4 litros de água fresca (mesma quantidade do sobrenadante descartado). O conteúdo foi homogeneizado e deixado para decantar novamente em câmara fria a 5 °C por 24 horas, esta etapa foi repetida de 2 a 3 vezes, buscando a redução do Brix para valores próximos de 1%.

**Experimento 4 (E4).** Neste caso, assim como no Experimento 2 a amostra não foi aquecida. Logo após o descarregamento no tanque, foram coletados 20 litros da amostra ainda “*in natura*”, e assim como no Experimento 3, o recipiente contendo a amostra foi deixado para decantar em câmara fria a 5 °C por 24 horas, aproximadamente 8 litros do sobrenadante foram descartados e a quantidade proporcional de água fresca foi adicionada ao concentrado, homogeneizado e deixado para decantar novamente, neste caso a etapa também foi realizada 2 a 3 vezes, buscando a obtenção do Brix com valores próximos de 1%.

Todos os cremes provenientes de cada um dos 4 Experimentos sugeridos continham massa seca entre 14% e 18%. Para o início da autólise experimental todos os cremes tiveram o pH ajustado entre 4,50 e 4,90 e autolisados em laboratório em agitador magnético – marca IKA – Modelo RET basic, onde 4 litros do creme proveniente de cada Experimento foram aquecido gradativamente sobre agitação constante até 48°C e mantidos durante 24 horas nestas condições.

**Avaliação do produto final.** Para todos os Experimentos descritos, o produto final foi seco (através do equipamento mini *spray dryer*, Marca Buchi, modelo B-290) e avaliado quanto ao teor de proteína bruta pelo método DUMAS (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). A massa seca assim como os cremes e seguindo o mesmo procedimento, foi analisada através da balança de raios infravermelhos (SHIMADZU).

## **7 . Resultado e Discussões**

### **7.1. Análise da Matéria-Prima**

#### **7.1.1. Teores de Álcool e Açúcares da Matéria-Prima**

As análises realizadas nos cremes de cerveja através de HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), mostram que para qualquer um dos fornecedores não há quantidades significativas de açúcares nos cremes recebidos (TABELA I). Esse resultado mostra coerência com os processos de fabricação de cerveja, pois os açúcares são convertidos em álcool pelas leveduras para a produção de cerveja. E estes resíduos apenas são descartados pelas cervejarias após uma determinada quantidade de reuso. A presença de álcool nos cremes provenientes do fornecedor “A” e “B” se mostraram dentro do tolerável para as leveduras 10% (p:v), limite para o crescimento e 20% (p:v) para a produção de etanol (JONES et al., 1981) no entanto o Fornecedor “B2” exibe uma quantidade de álcool maiores para as duas análises realizadas. Esse resultado pode estar relacionado ao processo falho no momento da centrifugação e/ou estocagem, e ser um indicador de um creme com menor viabilidade ou com leveduras mais frágeis ou com alterações em sua composição devido ao estresse provocado pelo maior número de lavagens e centrifugações nos ciclos de reuso, esta característica é descrita por CABALLERO-CÓRDOBA et al. (1997), onde os autores mencionam a diferença na composição das leveduras provenientes das destilarias e grandes cervejarias quando comparadas com as cultivadas em laboratórios em condições adequadas de nutrientes e oxigênio.

TABELA I: Análise do teor de álcool e açúcares na matéria-prima. \*N.D. Não Detectável valores menores que 0,02 g/L.

LOTE	CERVEJARIA	UNIDADE FABRIL	Álcool g/L	Sacarose g/L	Glicose g/L	Frutose g/L
1	A	A1	71,12	0,51	0,06	N.D.
2	A	A2	59,1	N.D.	N.D.	N.D.
3	A	A2	58,83	<0,02	0,08	N.D.
4	A	A2	58,8	0,24	0,13	0,13
5	A	A2	48,46	N.D.	0,07	0,13
6	A	A2	66,4	0,42	0,21	0,13
7	A	A2	66,77	0,28	0,05	0,1
8	A	A3	57,41	N.D.	0,57	N.D.
9	A	A3	72,37	0,03	0,2	N.D.
10	A	A3	67,47	0,12	0,11	N.D.
11	A	A3	46,99	0,09	0,07	N.D.
12	A	A3	77,85	0,05	0,41	0,12
13	A	A3	69,21	0,16	0,09	N.D.
14	A	A3	72,6	0,23	0,12	N.D.
15	A	A3	57,35	N.D.	0,05	N.D.
16	A	A3	68,27	0,17	0,11	N.D.
17	A	A3	99,2	0,38	0,11	N.D.
18	A	A3	60,33	0,15	0,22	N.D.
19	A	A3	61,8	0,23	0,23	N.D.
20	A	A3	64,04	0,25	0,27	N.D.
21	A	A3	64,48	0,27	0,04	0,13
22	B	B1	62,28	N.D.	N.D.	N.D.
23	B	B1	63,89	0,05	0,06	N.D.
24	B	B1	64,12	0,02	0,01	N.D.
25	B	B1	65,29	N.D.	0,04	N.D.
26	B	B1	64,37	0,11	0,06	N.D.
27	B	B2	100,69	N.D.	0,24	N.D.
28	B	B2	103,34	0,08	1,1	N.D.

### 7.1.2. Teores de Ácidos Orgânicos

Quanto aos ácidos orgânicos, para ambos os fornecedores os valores também foram considerados baixos principalmente para os ácidos cítrico e acético, o ácido láctico embora também em valores baixos, apresentou valores diferentes quanto aos fornecedores (TABELA II). O Fornecedor “B” apresentou em 6 das 7 amostras valores acima de 2 g/L enquanto o Fornecedor “A” apresentou valores abaixo de 1 g/L com exceção de duas das 20 amostras analisados, onde uma apresentou 2,09 g/L e outra 1,03 g/L. O ácido láctico pode estar associado a presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* consideradas como uma das principais bactérias contaminantes do meio fermentativo em usinas de cana-de-açúcar (OLIVA-NETO, 1995; NOBRE, 2005). A presença destas bactérias, pode simbolizar uma maior quantidade de reuso do mosto na fabricação da cerveja ou contaminações na estocagem e/ou transporte do creme. Estas micro-organismos podem induzir a flocculação das leveduras ocasionando menor produtividade na fermentação, além de perdas durante a centrifugação e queda na porcentagem da viabilidade celular (ALMEIDA E SILVA, 2005; ROSE, 1980; OLIVA-NETO & YOKOYA, 1994; LUDWIG et al., 2001). Assim, este análise também poderia ser utilizado como indicador da qualidade do creme.

TABELA II: Análise do teor de ácidos orgânicos na matéria-prima. \*N.D. Não Detectável valores menores que 0,02 g/L.

LOTE	CERVEJARIA	UNIDADE FABRIL	ÁCIDOS g/L		
			Cítrico	Lático	Acético
1	A	A1	<0,02	0,1	0,32
2	A	A2	0,13	0,29	0,13
3	A	A2	0,17	0,27	0,38
4	A	A2	0,21	0,45	0,36
5	A	A2	0,14	0,32	0,44
6	A	A2	N.D.	2,09	1,96
7	A	A2	0,15	0,32	0,33
8	A	A3	0,12	0,34	0,13
9	A	A3	0,09	0,48	0,43
10	A	A3	0,12	0,41	0,33
11	A	A3	0,11	0,53	0,24
12	A	A3	N.D.	0,53	0,46
13	A	A3	0,12	0,46	0,42
14	A	A3	0,12	0,39	0,35
15	A	A3	0,09	0,51	0,35
16	A	A3	0,1	0,44	0,37
17	A	A3	0,17	0,84	0,7
18	A	A3	0,11	N.D.	N.D.
19	A	A3	N.D.	1,03	1,22
20	A	A3	0,13	0,63	N.D.
21	A	A3	0,17	0,27	0,2
22	B	B1	0,02	2,34	0,41
23	B	B1	0,09	2,37	0,41
24	B	B1	0,1	2,07	0,33
25	B	B1	0,1	2,25	0,41
26	B	B1	0,09	2,35	0,38
27	B	B2	0,08	1,09	1,24
28	B	B2	N.D.	2,59	1,39

### 7.1.3. Teores de Nitrogênio Total (Proteína Bruta).

A análise de proteína bruta dos cremes foi realizada em 3 etapas: o creme integro “*in natura*”, o sobrenadante e o pellet após centrifugação. Os resultados são expressos em base úmida e mostram pouca variações entre todos os fornecedores para as análises do creme integro e do pellet, passando por valores entre 4,10 e 6,15 % e 9,79 e 11,46% respectivamente (TABELA III). Com exceção do último creme da Tabela que apresentou o valor de 12,85% de proteína. Estes resultados são interessantes para o entendimento de que não existe uma variação significativa entre os dois principais fornecedores. Deve-se destacar o fato de que para garantir a eficiência da análise de proteína no método DUMAS, é necessário garantir a completa homogeneização da amostra, pois a quantidade utilizada é muito pequena. No entanto para o creme de cerveja íntegro (“*in natura*”) isso se torna um fator negativo devido a difícil homogeneização da amostra, que por conter leveduras viáveis em continuo processo de fermentação geram grande quantidade de espuma dificultando a amostragem. Por esse motivo a análise do sobrenadante foi considerada mais fácil e eficaz. Embora pequena, a diferença nos valores de proteína do sobrenadante mostram que o fornecedor “B” possui os valores mais elevados que o fornecedor “A” onde apenas 2 amostras apresentaram valores (1,84 e 2,07 g/L) dentre os obtidos no Fornecedor “B”. Essa característica pode servir como indicador para identificar cremes com maior quantidade de leveduras já autolisadas, esta característica poderia ser utilizada para direcionamento do creme para outro processo e não para o processo de autólise, porém independentemente do processo, a proteína presente no meio seria desperdiçada durante a centrifugação do creme.

TABELA III: Análise do teor de proteína bruta na matéria-prima.

LOTE	CERVEJARIA	UNIDADE FABRIL	PROTEÍNA MÉTODO DUMAS %		
			Creme Integro	Pellet	Sobrenadante
1	A	A1	5,37	10,25	0,96
2	A	A2	4,77	10,26	0,95
3	A	A2	5,03	9,93	1,35
4	A	A2	5,04	10,86	1,08
5	A	A2	5,69	11,13	1,28
6	A	A2	4,27	10,39	1,39
7	A	A2	4,98	10,17	1,51
8	A	A3	4,04	9,79	1,21
9	A	A3	4,35	12,29	1,58
10	A	A3	4,50	10,69	1,84
11	A	A3	4,10	11,05	1,53
12	A	A3	4,40	10,89	2,07
13	A	A3	4,99	11,28	1,69
14	A	A3	5,91	10,4	1,54
15	A	A3	4,85	10,57	1,33
16	A	A3	5,25	10,44	1,4
17	A	A3	4,38	10,48	1,17
18	A	A3	4,79	11,32	1,48
19	A	A3	4,88	11,14	1,35
20	A	A3	5,26	10,66	1,66
21	A	A3	5,90	10,11	1,34
22	B	B1	6,36	10,97	1,89
23	B	B1	5,33	10,41	2,19
24	B	B1	5,43	10,45	1,96
25	B	B1	5,80	11,1	1,72
26	B	B1	5,29	11,46	1,72
27	B	B2	4,49	10,55	1,68
28	B	B2	6,15	12,85	2,48

#### **7.1.4. Demais análises Físico-Químicas: pH, Temperatura no caminhão, Massa seca, Viabilidade Celular.**

Os resultados obtidos na análise de pH, temperatura no caminhão, massa seca e viabilidade celular são mostrados na TABELA IV. Todos os valores de pH ficaram entre 5 e 6 pontos, ou seja dentro do histórico obtidos pela empresa. A temperatura média dos caminhões na maioria dos casos não apresentou alterações, permanecendo entre 7,9 e 18,1 °C. Houve onze casos com temperaturas maiores que 18°C, dos quais dois apresentaram temperaturas muito elevadas 26 e 27,5 °C. Para massa seca, apenas 4 lotes apresentaram valores inferiores a 10%, mínimo aceito pela Biomin, os demais lotes apresentaram valores entre 10 e 14%. A viabilidade celular é considerada um parâmetro muito importante para a realização de uma autólise eficiente. Neste experimento, registra-se um importante dado, a viabilidade para o fornecedor “A” em 19 das 22 amostras ficaram acima de 80%, e destes, 8 acima de 90%, valores considerados bastante elevados por se tratar de um produto residual, derivado de um processo industrial e transportado a longas distâncias. Vale destacar que os três valores abaixo da média foram 77, 67 e 50%, sendo o último o mesmo em que a temperatura estava mais elevada no caminhão com 27,5%, talvez o tempo de transporte e a espera para o início do descarregamento na Biomin, tenham causado esta situação. No entanto, as menores viabilidades foram registradas no fornecedor “B” onde 6 das 7 amostras apresentaram viabilidade entre 65 e 75%.

TABELA IV: Análise de pH, temperatura no caminhão, massa seca e viabilidade celular na matéria-prima.

LOTE	CERVEJARIA	UNIDADE FABRIL	pH	Temperatura no caminhão (°C)	Massa seca (%)	Viabilidade (%)
1	A	A1	5,79	18,1	13,78	96,25%
2	A	A2	5,24	14,1	13,1	98%
3	A	A2	5,63	16	10,83	98%
4	A	A2	5,21	18,1	11,46	91%
5	A	A2	5,07	16,8	11,22	83%
6	A	A2	5,72	20	12,34	77%
7	A	A2	5,25	20	13,74	81%
8	A	A3	5,00	15,89	9,34	95%
9	A	A3	5,95	23,9	9,62	67%
10	A	A3	5,34	17,02	12,32	92%
11	A	A3	5,18	23,9	9,03	83%
12	A	A3	5,70	27,5	10,15	50%
13	A	A3	5,68	23,1	14,74	90%
14	A	A3	5,19	18	14,62	88%
15	A	A3	5,41	23,7	13,04	81,50%
16	A	A3	5,28	20,39	12,33	86%
17	A	A3	5,95	21	8,39	93%
18	A	A3	5,66	13	13,72	80,50%
19	A	A3	5,65	13,6	14,17	90%
20	A	A3	5,73	12,7	15,06	89%
21	A	A3	5,87	11,28	12,58	91%
22	B	B1	5,16	11,8	12,97	65%
23	B	B1	5,05	13,2	10,73	65%
24	B	B1	5,19	11,9	11,32	75%
25	B	B1	5,16	7,9	11,06	72,50%
26	B	B1	5,25	11,6	10,9	74,50%
27	B	B2	5,96	20,9	11,32	88%
28	B	B2	6,00	26	10,87	79%

### **7.1.5 Presença de resíduos**

Notou-se se que a matéria-prima proveniente do fornecedor B apresentou maior incidência de resíduos que o fornecedor A, no entanto a quantidade de resíduos encontrada foi considerada pequena e como a Biomin possui filtros para evitar que resíduos maiores possam prejudicar as bombas de sucção do creme, estes resíduos não causariam interferência no processo. Além disso, as análises propostas podem ser realizadas sem a interferência dos resíduos quando existentes, pois por serem mais pesados, decantam durante a centrifugação no creme e no produto seco sua interferência pode ser evitada devido a uma amostragem visivelmente livre de resíduos e homogênea.

### **7.1.6 Grau Brix:**

Todos os cremes analisados ficaram dentro da média histórica da empresa, entre 4 e 8 °Brix.

### **7.1.7. Análise dos resultados obtidos**

Conclui-se que a matéria-prima do fornecedor “B” apresentou menor qualidade quando comparada com o fornecedor “A”. Onde a discreta, porém existente, maior concentração de álcool e ácidos lácticos podem significar um processo mais longo e/ou inadequado para a levedura, diminuindo sua viabilidade ao longo dos ciclos de fermentação, ou ainda durante a estocagem ou do transporte até a Biomin.

## **7.2. Autólises Experimentais**

Os experimentos de autólise foram realizados em dois cremes do fornecedor A, e aqui chamamos de Teste 1 e Teste 2. O experimento realizado com o creme do fornecedor C foi chamado de Teste 3. Os cremes do fornecedor B não foram avaliados quanto a autólise experimental devido à baixa frequência de recebimentos deste fornecedor.

### **7.2.1 – Experimentos de autólise no creme do fornecedor A- Teste 1**

Embora não tenham sido encontrados na literatura muitos trabalhos relacionando o °Brix com o aumento do teor de proteína solubilizada no meio extracelular, a análise do sobrenadante, além de barata e prática, mostrou-se eficiente na avaliação da autólise. Nota-se a relação do aumento do °Brix com o aumento da proteína no sobrenadante (TABELA V). No Teste 1, nota-se o melhor desempenho no Experimento 4, seguido pelo 3, 1 e por último o Experimento 2. Um fator importante a se observar é que mesmo com o aquecimento prévio seguido de lavagem o Experimento 3 apresentou valores tão altos quantos os do Experimento 4, considerado o mais correto neste experimento. Isso demonstrou, a princípio, que o aquecimento rápido e brando em bancada poderia não representar o real aquecimento realizado no processo, justificando assim a decisão de se coletar as amostras após o aquecimento no processo.

Os resultados no produto final seco (TABELA VI) reforçam a observação anterior, pois praticamente não houve diferença entre o teor de proteína nos produtos secos provenientes dos Experimentos 3 e 4 e entre os Experimentos 1 e 2, onde para ambos os casos a única diferença entre eles foi o aquecimento. Outro fator importante foi o aumento significativamente maior no valor do °Brix para todos os Experimentos durante o período de 06 horas iniciais, e praticamente se estabilizando ao atingir 12 horas, obtendo um aumento pouco significativo até o término do processo as 24 horas. Embora a análise de proteína no sobrenadante tenha mostrado um pequeno aumento após as 12h e o decréscimo na proteína do pellet confirme este resultado, estes dados devem ser avaliados com intuito de avaliar a redução de custo de produção, pois evidenciam a possibilidade de redução de 50% do tempo de autólise para que se

obtenha um produto autolisado com as mesmas características do atual produto final, após 24 horas. Gerando economia de energia e ganho de tempo.

Excepcionalmente no Teste 1 os pellets não foram lavados antes da análise. Assim 50 mL de cada Experimento foram coletados e centrifugado ao longo do processo, o sobrenadante foi analisado quanto a Brix e proteína e o pellet quanto a proteína. Os resultados da análise de proteína do sobrenadante e do pellet lavado (exceção o Experimento 3 que apresentou perda maior dos compostos nitrogenados quando comparado ao Experimento 4), são coerentes entre si e com os resultados do Brix do sobrenadante. Os resultados confirmam a maior eficiência do Experimento 4 devido ao maior aumento nos valores do Brix e da proteína no sobrenadante e ao segundo maior decréscimo nos valores para o pellet. Ao avaliar os resultados obtidos quanto a proteína no produto final, observa-se que a variável que realmente interferiu na variação entre os Experimentos 1 e 2 quando comparados com os Experimentos 3 e 4, foi a lavagem do Brix no início do processo. A existência de sólidos solúveis como amido e açúcares etc, entre as leveduras gera a diluição da proteína no produto seco. Sendo que os Experimentos 3 e 4 continham apenas leveduras e segundo CABALLERO-CÓRDOBA et al. (1997) o valor final de 51% corresponde com a composição proteica das leveduras proveniente de cervejarias que é de 48%, contudo a presença de RNA (7%) pode entrar no montante de proteína total por também conter nitrogênio em sua constituição.

TABELA V: Teste 1 - Análise do °Brix no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4).

Teste 1	°Brix do Sobrenadante			
	E1	E2	E3	E4
In natura	6,4	6,4	6,4	6,4
Aquecido a 40°C	-	-	7,1	-
Após decantação	7,1	6,7	-	-
Após 2° lavagem	-	-	2	1,7
00h	8,8	8,1	3,7	3,7
01h	9,5	8,4	5,2	4,6
02h	10,2	8,5	5,2	5,7
03h	10,7	8,6	5,6	6,3
04h	10,8	8,5	6,0	6,7
05h	11,2	8,6	6,2	6,9
06h	11,1	8,7	6,4	7,0
12h	11,4	8,9	7,0	7,5
18h	11,7	8,9	7,4	7,8
24h	11,7	8,9	7,7	8,0
Saldo	4,6	2,2	5,7	6,3
Proteína (%) Prod. Seco	45,3	45,68	51,69	51,24

TABELA VI: Teste 1 - Análise do teor de proteína bruta no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4).

Teste 1	Proteína bruta (%) do Sobrenadante			
	E1	E2	E3	E4
In natura	1,79	1,79	1,79	1,79
Aquecido a 40°C	-	-	2,15	-
Após decantação	2,15	1,79	-	-
Após 2° lavagem	-	-	1,63	1,20
00h	3	2,70	2,60	2,45
01h	3,85	3,10	3,70	3,15
02h	4,45	3,20	4,05	4,00
06h	5,45	4,00	4,35	4,40
12h	5,29	4,20	5,00	4,75
18h	5,69	4,24	5,10	5,14
24h	5,71	4,25	5,34	5,77
Saldo	3,56	2,46	3,71	4,57
Proteína (%) Prod. Seco	45,30	45,68	51,69	51,24

TABELA VII: Teste 1 - Análise de proteína bruta (em base úmida e sem lavagem) no Pellet dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4).

Teste 1	Proteína bruta (%) do Pellet			
	E1	E2	E3	E4
<b>In natura</b>	11,07	11,07	11,07	11,07
<b>00h</b>	13,03	13,35	13,71	12,96
<b>06h</b>	10,30	13,42	10,95	9,08
<b>12h</b>	10,06	13,04	10,96	9,50
<b>18h</b>	9,60	12,32	9,85	8,87
<b>24h</b>	9,40	12,31	8,13	8,46
<b>Saldo</b>	<b>-3,63</b>	<b>-1,04</b>	<b>-5,58</b>	<b>-4,50</b>
<b>Proteína (%) Prod. Seco</b>	<b>45,30</b>	<b>45,68</b>	<b>51,69</b>	<b>51,24</b>

## 7.2.2 Experimentos de Autólise no creme do fornecedor A- Teste 2

O Teste 2 representa o experimento de autólise para o creme do fornecedor A e as TABELAS VIII, IX e X apresentam os resultados obtidos das análises de °Brix e de proteínas no sobrenadante e pellet. Os resultados são confirmativos em relação aos resultados obtido no teste anterior, onde é possível observar o maior ganho do °Brix, nos Experimentos 3 e 4, seguido do Experimento 1 e com menor acréscimo o Experimento 2. Neste caso, aqui também se observa a relação de ganho e tempo, pois o aumento mais significativo ocorre, nas 6 primeiras horas. Se mantendo praticamente estável a partir deste momento. Neste caso, nota-se em especial no Experimento 1 que o °Brix antes do início da autólise é 11,2% o que significa que as células já podem estar em estado avançado de autólise. Embora a qualidade do creme tenha sido considerada muito adequada no levantamento realizado neste trabalho, a maior exposição do creme ao processo de aquecimento durante o processo inicial pode fazer com a levedura inicie o processo de autólise antes da centrifugação, elevando assim a quantidade de compostos nitrogenados lançados no meio extracelular e desperdiçados neste processo. Os resultados de proteína nos produtos secos, conferem com a conclusão obtida ao longo do projeto, onde a levedura *in natura* e lavada no Experimento 4, apresenta valores próximos da

literatura, porém maiores que a levedura *in natura* com valor de °Brix original (Experimento 2) o Experimento 3 evidencia que o aquecimento rápido pode embora prejudicial para levedura, ainda conservar grande potencial autólítico da levedura. E o Experimento 1, permanece como mais prejudicial para o produto final, pois além do aquecimento que neste caso foi prolongado, a levedura também é exposta a ação mecânica da centrifuga.

Os valores de proteína no clarificado e no pellet lavado são coerentes com os valores encontrados na análise do °Brix e evidenciam a maior eficiência nos Experimentos 3 e 4. Contudo, a comparação entre a análise do °Brix e da proteína no sobrenadante no Experimento 2 não são compatíveis, talvez devido a relação não tão exata entre o aumento da proteína ao longo da autólise ou a interferência na leitura do °Brix devido a manutenção do °Brix original da cerveja. O Experimento 1 se manteve como o menos viável.

TABELA VIII: Teste 2 - Análise do °Brix no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4).

Teste 2	°Brix do Sobrenadante			
	E1	E2	E3	E4
In natura	6,2	6,2	6,2	6,2
Aquecido a 40°C	-	-	8,9	-
Após centrifugação	11,2	-	-	-
Após decantação	-	6,4	-	-
Após 2 lavagem	-	-	2,5	1,2
00h	12	6,8	4,4	3,4
06h	12,9	7	7,1	7,1
12h	13,5	7,10	7,5	7,7
24h	14	7,30	8,1	8,0
Saldo	2,8	0,9	5,6	6,8
Proteína (%) Prod. Seco	42,59	49,24	48,27	52,54

TABELA IX: Teste 2 - Análise de proteína bruta no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4).

Teste 2	Proteína bruta (%) do Sobrenadante			
	E1	E2	E3	E4
<b>In natura</b>	1,68	1,68	1,68	1,68
<b>Aquecido a 40°C</b>	-	-	2,65	-
<b>Após a centrifugação</b>	5,51	-	-	-
<b>Após decantação</b>	-	1,82	-	-
<b>Após 2 lavagem</b>	-	-	1,71	0,85
<b>00h</b>	6,80	2,15	2,95	1,66
<b>06h</b>	7,50	4,28	5,23	5,08
<b>12h</b>	7,70	4,30	5,71	5,51
<b>24h</b>	7,70	4,68	5,87	5,68
<b>Saldo</b>	<b>2,19</b>	<b>2,86</b>	<b>4,16</b>	<b>4,83</b>
<b>Proteína (%) Prod. Seco</b>	<b>42,59</b>	<b>49,24</b>	<b>48,27</b>	<b>52,54</b>

TABELA X: Teste 2 - Análise do teor de proteína bruta no Pellet Lavado dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4).

Teste 2	Proteína bruta (%) do Pellet Lavado			
	E1	E2	E3	E4
<b>In natura</b>	11,09	11,09	11,09	11,09
<b>Aquecido a 40°C</b>	-	-	-	-
<b>Após a centrifugação</b>	7	-	-	-
<b>Após decantação</b>	-	10,89	-	-
<b>Após 2 lavagem</b>	-	-	10,15	10,94
<b>00h</b>	6,44	10,75	9,2	10,94
<b>06h</b>	5,79	9,10	5,02	6,42
<b>12h</b>	5,06	8,64	4,32	5,62
<b>24h</b>	5,26	8,35	4	5,83
<b>Saldo</b>	<b>-1,74</b>	<b>-2,54</b>	<b>-5,20</b>	<b>-5,11</b>
<b>Proteína (%) Prod. Seco</b>	<b>42,59</b>	<b>49,24</b>	<b>48,27</b>	<b>52,54</b>

### 7.2.3 Experimentos de Autólise no creme do fornecedor C- Teste 3

O Teste 3 foi desenvolvido com o creme do fornecedor C e foi considerado importante para a comprovação da influência da matéria-prima no processo de autólise. Com características bem distintas quando comparado com os outros cremes avaliados neste trabalho, foi possível observar a relação entre a viabilidade, °Brix, teores de proteína no sobrenadante e no pellet lavado e o processo de autólise (TABELAS XI, XII e XIII, respectivamente).

O creme utilizado no Teste 3 apresentava viabilidade de 19%, e °Brix inicial de 13,2%, valores de proteína no sobrenadante *in natura* de 5,18% tão altos quanto os encontrados ao final do processo de autólise nos testes descritos anteriormente (Teste 1 e Teste 2) e proteína no pellet lavado de 8,05%, baixo perante a média dos cremes analisados (entre 10 e 12%).

As leveduras apresentavam uma baixa densidade, o que gerou dificuldades para o processo de centrifugação realizado na fábrica e também para o processo de decantação realizado no experimento em bancada. Obteve-se um aumento pequeno nos valores do °Brix, contudo novamente o Experimento 4, foi o que obteve maior ganho, seguido do 3, 1 e 2. A avaliação dos produtos secos, indica a situação adversa à encontrada até então, sendo que o Experimento 2 apresentou o maior valor de proteína, provavelmente pela dificuldade em se separar as leveduras do sobrenadante presente. Os resultados obtidos para os Experimentos 1 e 3 neste teste foram muito semelhantes, também provavelmente pelo fato da centrifugação realizada no processo não ter sido tão eficiente, preservando grande parte do sobrenadante rico em proteína solubilizada junto a levedura.

Para o Experimento 4, a lavagem das leveduras só foi possível com a adição de grande quantidade de água, além da proporção 1:1 utilizada em todos os demais testes. Com a remoção do sobrenadante as leveduras secas apresentaram o valor mais baixo entre os Experimentos do Teste 3, porém ainda assim, um valor significativamente alto, talvez devido a qualidade da levedura e a constituição do °Brix que poderia neste caso, ser constituída de maior quantidade de compostos nitrogenados e não outros componentes.

A observação dos resultados finais no Teste 3, confirmam que o creme em questão (fornecedor C) possuía grande proporção de leveduras já autolisadas,

pois os valores iniciais de proteína no sobrenadante eram de 5,19% (TABELA XII). Porém, mesmo nesta situação o ganho de proteína no sobrenadante no Experimento 4, apresentou saldo de 2,24% e o decréscimo do pellet da levedura neste mesmo Experimento foi de -5,91%, resultados menores quando comparados com os Testes 1 e 2 para o Experimento 4. No entanto, quando se observa os Experimentos 1 e 3 que passaram por aquecimento, os valores de proteína no sobrenadante são 1,14% e 1,86% respectivamente e de -1,45 e -3,26 de decréscimo de proteína no pellet. Isso pode representar uma levedura mais sensível, que não estaria apta a passar pelos processos de aquecimento e centrifugação. Esta conclusão se confirma ao observar os valores nos momentos que prosseguem o aquecimento e centrifugação (Após Centrifugação e Após 2 Lavagens) e antecedem o início da autólise, onde os valores de proteína no pellet já eram de 4,36% e 5,46% respectivamente, significativamente menores que os 8,05% encontrados no creme *in natura*. No entanto, os resultados de proteína no produto seco demonstram que a levedura em questão é consideravelmente de boa qualidade, talvez não adequada para o processo de autólise, mas apta a ser utilizada como levedura inativa ou ser misturada a outro lote processado pela fábrica.

TABELA XI: Teste 3 - Análise do °Brix no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4).

Teste 3	°Brix do Sobrenadante			
	E1	E2	E3	E4
<b>In natura</b>	13,2	13,2	13,2	13,2
<b>Aquecido a 40°C</b>	-	-	13,9	-
<b>Após centrifugação</b>	13,8	-	-	-
<b>Após decantação</b>	-	13,7	-	-
<b>Após 2 lavagem</b>	-	-	3,9	1,0
<b>00h</b>	14,1	13,9	4	1,7
<b>06h</b>	14,3	14,1	5,2	2,8
<b>12h</b>	14,3	14,1	5,7	3,6
<b>24h</b>	14,6	14,3	5,7	3,7
<b>Saldo</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>1,8</b>	<b>2,7</b>
<b>Proteína (%) Prod. Seco</b>	<b>47,60</b>	<b>51,17</b>	<b>48,09</b>	<b>44,42</b>

TABELA XII: Teste 3 - Análise do teor de proteína bruta no sobrenadante dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4).

Teste 3	Proteína bruta (%) do Sobrenadante			
	E1	E2	E3	E4
<b>In natura</b>	5,19	5,19	5,19	5,19
<b>Aquecido a 40°C</b>	-	-	5,89	-
<b>Após centrifugação</b>	5,89	-	-	-
<b>Após decantação</b>	-	5,66	-	-
<b>Após 2 lavagem</b>	-	-	2,17	1,00
<b>00h</b>	6,57	5,84	2,41	2,12
<b>06h</b>	6,91	5,93	3,27	2,84
<b>12h</b>	6,98	6,34	3,87	3,12
<b>24h</b>	7,03	6,50	4,03	3,24
<b>Saldo</b>	<b>1,14</b>	<b>1,46</b>	<b>1,86</b>	<b>2,24</b>
<b>Proteína (%) Prod. Seco</b>	<b>47,60</b>	<b>51,17</b>	<b>48,09</b>	<b>44,42</b>

TABELA XIII: Teste 3 - Análise do teor de proteína bruta no Pellet Lavado dos 4 Experimentos sugeridos (E1-E4).

Teste 3	Proteína bruta (%) do Pellet Lavado			
	E1	E2	E3	E4
<b>In natura</b>	8,05	8,05	8,05	8,05
<b>Aquecido a 40°C</b>	-	-	-	-
<b>Após centrifugação</b>	4,36	-	-	-
<b>Após decantação</b>	-	-	-	-
<b>Após 2 lavagem</b>	-	-	5,46	7,10
<b>00h</b>	4,16	7,23	5,49	5,09
<b>06h</b>	3,04	6,36	2,70	5,09
<b>12h</b>	2,72	5,14	2,45	2,14
<b>24h</b>	2,91	4,47	2,20	2,04
<b>Saldo</b>	<b>- 1,45</b>	<b>-2,76</b>	<b>-3,26</b>	<b>-5,91</b>
<b>Proteína (%) Prod. Seco</b>	<b>47,60</b>	<b>51,17</b>	<b>48,09</b>	<b>44,42</b>

## 8. Experimentos Complementares

Após a observação dos resultados obtidos nas autólices experimentais realizadas em laboratório, foram avaliados os efeitos do aquecimento prévio e da centrifugação da matéria-prima, assim como o efeito da autólice da levedura na concentração de proteínas totais.

### 8.1. Efeitos do aquecimento prévio e centrifugação da matéria-prima

Para avaliar a concentração final de proteínas bruta nos cremes em relação ao prévio aquecimento e centrifugação da matéria-prima os cremes foram coletados em tubo Falcon de 50 mL e centrifugados a 3.500 RPM durante 5 minutos. O sobrenadante foi separado em outro tubo e analisado quanto a porcentagem de proteína bruta pelo método Dumas.

Os cremes analisados (provenientes do fornecedor A) foram classificados de acordo com o processo ao qual foram submetidos, sendo denominados: “Adequado” e “Inadequado”.

‘Adequado’: Onde, logo após ser aquecido a 40°C o creme foi centrifugado, evitando assim a exposição precoce a longos períodos sobre aquecimento.

“Inadequado”: O creme após o aquecimento a 40°C, não foi centrifugado imediatamente, permaneceu em espera por aproximadamente 6 horas, exposto a esta temperatura, pois os tanques de inox conservam a temperatura. Esta ocasião ocorre por diversos desvios de processo que podem acontecer normalmente, como: Problemas na caldeira fornecedora de vapor, ou na centrifuga, ou na Estação de Tratamento de Efluentes ou ainda pelo surgimento de outras prioridades, que acontecem durante as etapas de fabricação de outros produtos.

Os dois cremes dos dois processos (Adequado e Inadequado) tiveram o conteúdo proteico do sobrenadante avaliado ao longo das etapas de produção: *In natura*, aquecido 40°C, clarificado (proveniente da centrifugação industrial) e

concentrado (etapa final do Tratamento Comum, onde-se define o destino do creme: levedura Inativa ou Autolisado).

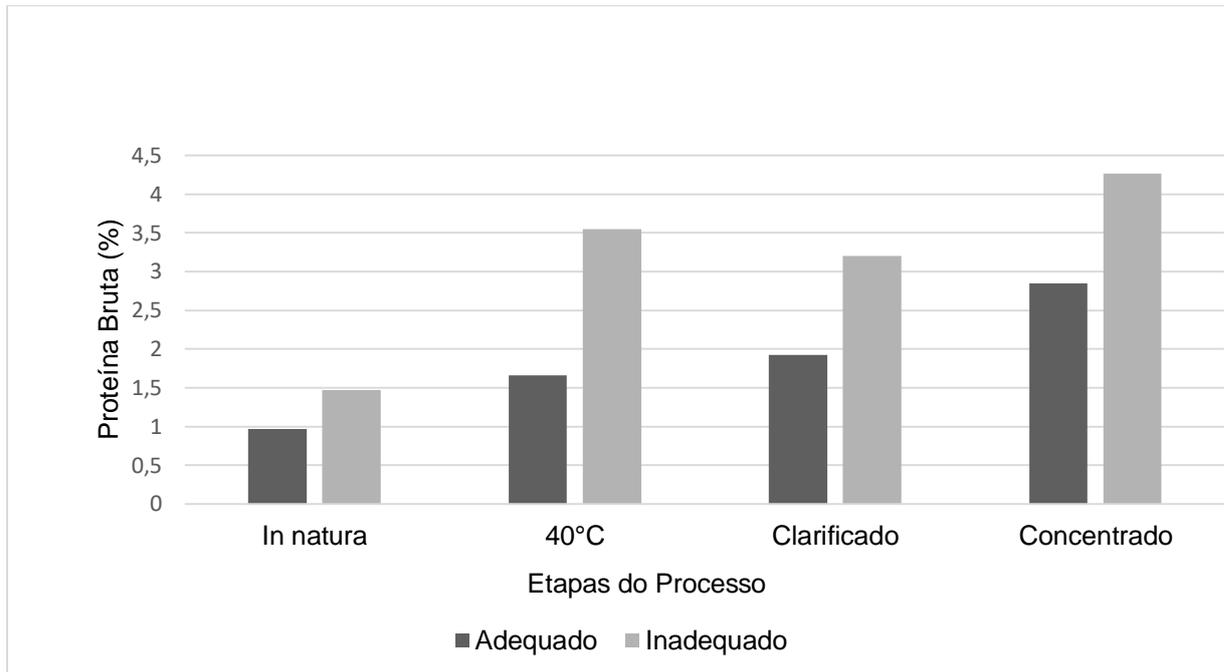


FIGURA III: Proteína bruta (%) liberada no meio extracelular durante o processo de Tratamento Comum.

A FIGURA II mostra a variação na porcentagem de proteína bruta em dois creme ao longo do processo inicial comum para a matéria-prima proveniente das cervejarias. O creme descrito como “Adequado” (exposto ao processo adequado), tem o teor inicial de proteína bruta no sobrenadante pouco menor que 1%. Nesta situação o creme foi centrifugado logo após o aquecimento, assim a porcentagem de proteína bruta não chegou a 2% no Clarificado resultante da centrifugação industrial, já no creme descrito como “Inadequado” (exposto ao processo inadequado) o creme possui teor de proteína bruta no sobrenadante inicial de 1,5%, porém, após o aquecimento, o creme permaneceu por mais de 6 horas aguardando para ser centrifugado, assim a amostragem denominada “40°C” (coletada momentos antes da centrifugação), contém um creme onde as leveduras já foram estimuladas ao processo de autólise, e ao observar o teor de proteína do “Clarificado”, nota-se o valor mais elevado (3,2 %) quando comparado ao creme “Adequado” este teor de proteína bruta é desperdiçado neste processo.

A FIGURA III, complementa as informações da FIGURA II. As amostras correspondentes a 12 lotes de cremes diferentes, foram coletados nos 3

diferentes momentos do processo comum de preparo da matéria-prima: 1- *In natura*, 2 – aquecido a 40°C e 3 – Concentrado. Assim como para as amostras da FIGURA II, e seguindo o mesmo procedimento, o sobrenadante foi analisado quanto a porcentagem de proteína bruta, no entanto neste caso o Pellet foi lavado com adição de água, homogeneizado e centrifugado até que o Brix ficasse < que 1. Após a lavagem o pellet foi analisado quanto à proteína bruta pelo método DUMAS e massa seca por Peso Constante em estufa, onde o cadinho de vidro é pesado (Peso A), tarado e 2 a 3 gramas do pellet são pesados e anotados (Peso B) e secos durante 4 horas a 105°C, e pesados novamente (Peso C).

#### **Fórmula para determinação da massa seca:**

$$\% \text{ Massa seca} = \frac{\text{Peso C} - \text{Peso A}}{\text{Peso B}} \times 100$$

Para o cálculo da proteína em base seca o teor de proteína foi dividido pelo valor da massa seca e multiplicado por 100.

$$\% \text{ Proteína na Base seca} = \frac{\text{Proteína (\%)}}{\text{Massa seca (\%)}} \times 100$$

Neste experimento os cremes que apresentaram teores de proteína bruta no pellet lavado iguais ou menores que 39% no estágio de “40°C” ficaram aproximadamente 06 horas aguardando para serem centrifugados enquanto os cremes que apresentaram valores igual ou entre 40 e 49% e igual ou maiores que 50% foram centrifugados em aproximadamente 2 horas após o aquecimento a 40°C. A diferença nestes resultados reforça a conclusão obtida nas autólices experimentais, onde, embora prejudicial, o aquecimento prévio de forma branda e em processo contínuo sem longos períodos de espera até a centrifugação, ainda pode preservar grande quantidade de proteína bruta no interior das leveduras e ser menos prejudicial ao produto final, porém quando exposto ao tempo maior de aquecimento, grande quantidade destas proteínas já são solubilizadas no meio extracelular, assim ao passar pelo processo de centrifugação, esta proteína é descartada junto ao clarificado e os valores caem drasticamente na levedura, antes mesmo do processo de autólice

industrial iniciar. Assim se iniciássemos a autólise com um creme com leveduras com teores menores de 39% (porcentual de proteína bruta restante, após o processo Inadequado) de proteína bruta teríamos desperdiçando grande parte do seu potencial antes mesmo da autólise iniciar, realizando assim um processo pouco produtivo.

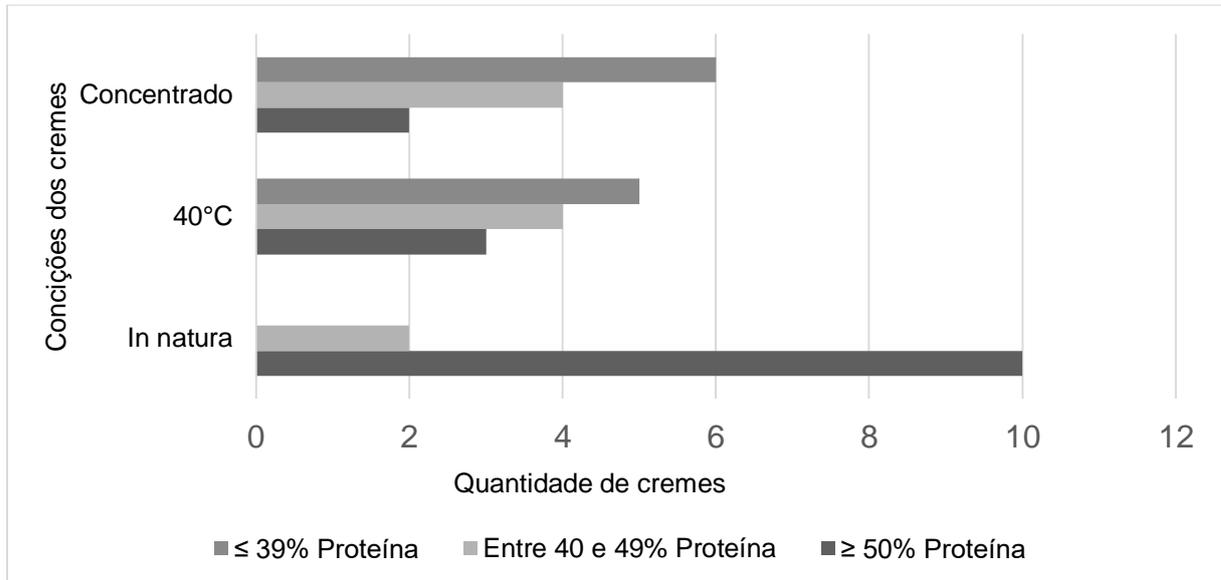


FIGURA IV: Análise de proteína bruta (%) em base seca na matéria-prima ao longo do Tratamento Comum do creme.

## 8.2. Potencial autolítico da levedura

Para compreender qual seria o potencial de extração dos compostos nitrogenados (relacionados com conteúdo de proteína bruta) e a porcentagem restante destes compostos na levedura ao término do processo de autólise, os cremes autolisados nos Experimentos 1, 3 e 4 do Teste 2 (creme proveniente do fornecedor A), os quais uma fração já havia sido seca e analisadas, foram lavados para a remoção da proteína solubilizada, e secos em Mini Spray Dryer e analisado quanto a proteína e massa seca. Para efeito de comparação a levedura íntegra *in natura* utilizada para este teste também foi seca e analisada quanto ao conteúdo de proteína bruta (FIGURA IV).

Os resultados mostraram que ao final dos Experimentos 1, 3 e 4, o percentual de compostos nitrogenados restantes nos produtos quando as células autolisadas foram lavadas e secas foi de 28,63%, 27,01% e 27,47%, respectivamente.

Quando comparados com os valores obtidos para a célula íntegra, 55,47%, e ao autolisado sem lavagem 42,27%, 48,27% e 52,54%, esses resultados evidenciam a eficiência da autólise realizada neste teste, pois conferem com o descrito por BABAYAN e BEZRUKOV (1985) que descrevem que aproximadamente 50% de todos os compostos nitrogenados da levedura podem ser hidrolisados e difundidos no meio extracelular.

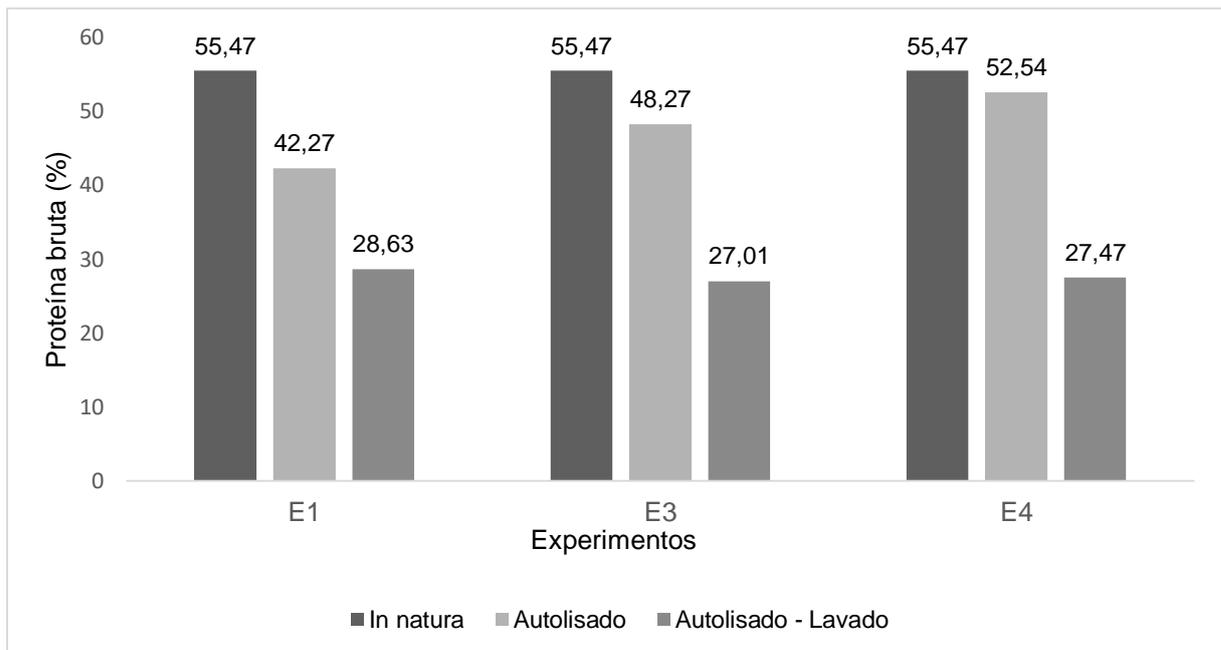


FIGURA V: Potencial autolítico da levedura seca *in natura* e após a autólise, com e sem lavagem.

Com o intuito de avaliar o quanto do potencial autolítico da levedura pode ser extraído durante 48 horas de autólise, o creme de cerveja foi lavado, o pH foi ajustado para 4.5 e 400 mL deste creme ficaram sobre agitação em mesa agitadora IKA Modelo 280, com temperatura controlada em 48°C durante 48 horas. Foram coletadas 4 amostras sendo elas: *In natura* (o creme logo após a lavagem) e após 2, 4 e 48h de autólise. Em cada período, 50 mL de cada amostra foram centrifugados, e o sobrenadante foi separado e analisado quanto a proteína bruta e °Brix e o pellet foi lavado e analisado quanto a porcentagem de proteína total em base seca.

Os resultados (FIGURA V) mostraram que o conteúdo proteico no pellet diminui e no sobrenadante aumenta. Há também o aumento do °Brix durante as 48hs de autólise. É possível notar o escurecimento da amostra ao longo do processo (FIGURA VI) o que indica aumento nos teores de proteína solubilizada no

sobrenadante e o aumento no °Brix. Entre o período de 6h e 48h o ganho de proteína se torna menos expressivo no sobrenadante, ainda assim, houve uma diminuição importante no teor do pellet lavado. Ao final de 48hs de autólise foi encontrado o valor de 13,7% de proteína bruta no pellet, o menor valor obtido ao longo deste trabalho, contudo, neste caso o creme ficou 48 horas em processo de autólise, o que não condiz com um processo economicamente viável.

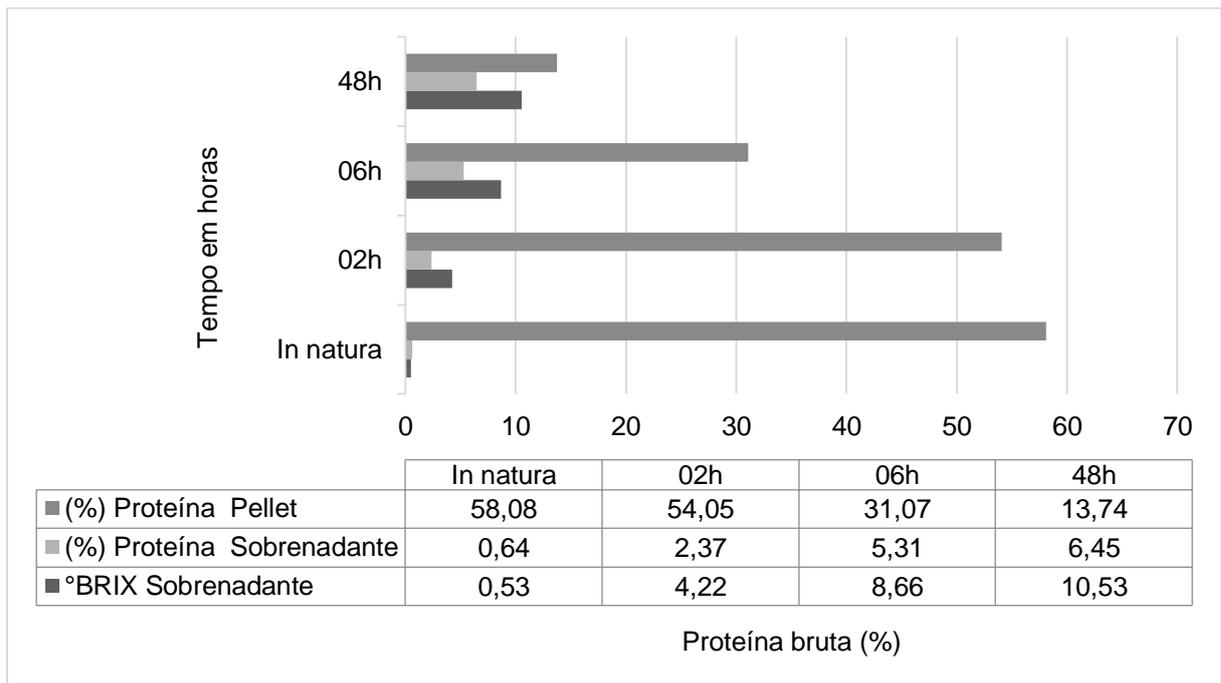


FIGURA VI: Proteína bruta (%) expressa em base seca do pellet °Brix e Proteína bruta do sobrenadante em autólise durante 48hs.

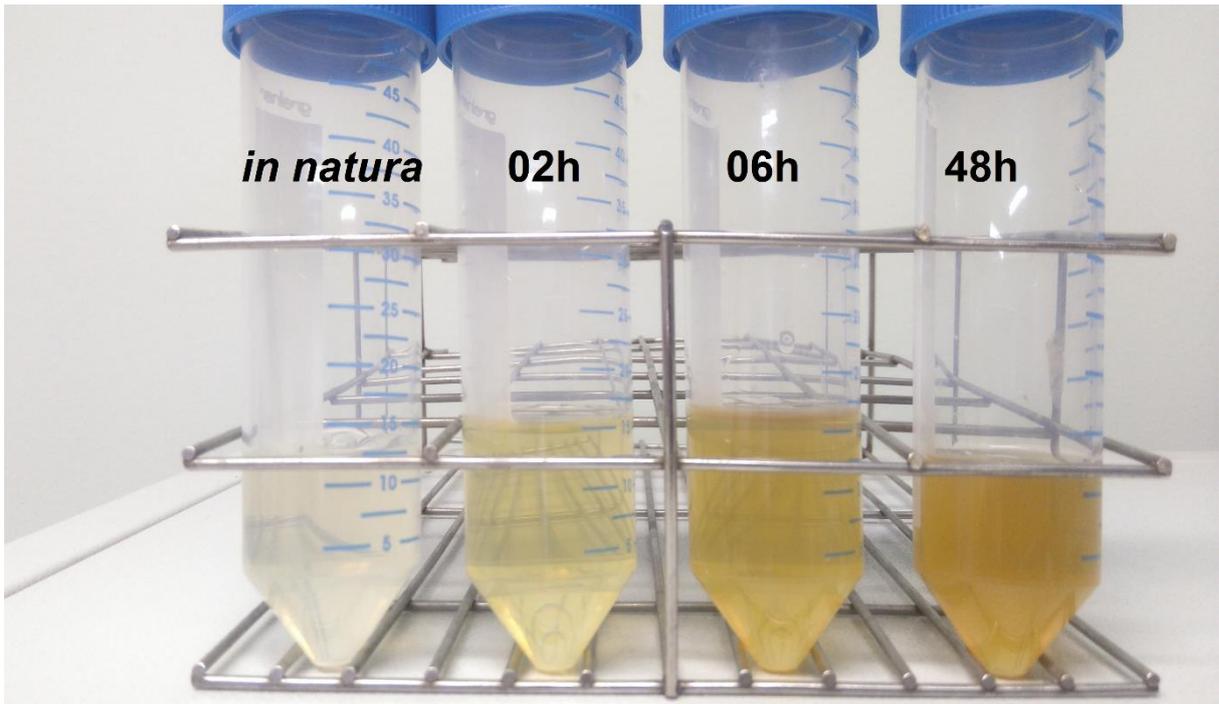


FIGURA VII: Análise visual das leveduras no processo de autólise durante 48hs.

Foi realizado o estudo de viabilidade celular da levedura (usada no Teste 2, do fornecedor A) durante 48hs no processo de autólise, usando o corante Azul de Metileno 1:1 e observação das células em microscópio óptico. Nesta técnica, as células viáveis produzem enzimas que degradam o corante a composto incolor, e assim, as células não viáveis ficam azuis e as não viáveis ficam incolores. A FIGURA VII mostra as células *in natura* (FIG.A) e as células após 2, 6 e 48hs a autólise (FIG. B, C, D, respectivamente). Após 2 horas há um elevado grau de células não viáveis e o corante começa a penetrar nessas células. Destaca-se que até 02 horas algumas células não viáveis ainda contém a coloração azul escuro, porém após as 6 horas praticamente todas as leveduras não apresentam mais esta coloração. Esta situação pode sinalizar que os componentes intracelulares que estavam corados no interior da levedura, foram extravasados para o meio extracelular confirmando o processo de autólise. Porém para esta afirmação, seria necessário a realização de mais testes.

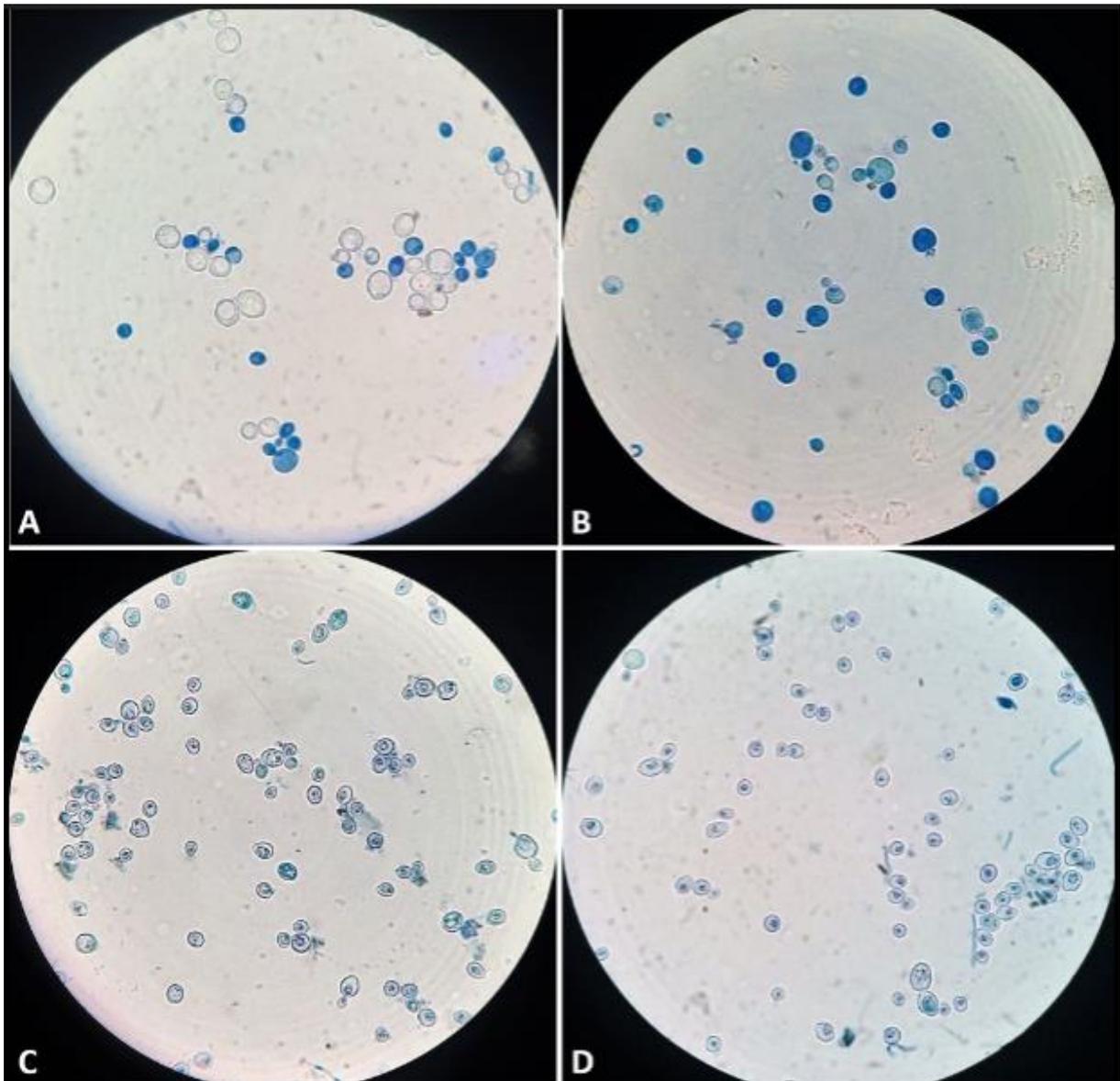


FIGURA VIII: Análise da viabilidade celular com Azul de Metileno das levedura *in natura* (A) e após 2, 6 e 48hs de autólise (B, C, D).

### 8.3. Acompanhamento do processo de autólise industrial

O processo de autólise desenvolvido na Biomin (equivalente em condições, ao Experimento 1) e foi avaliado em triplicata, quanto ao conteúdo proteico nos tempos zero, e após 24hs de autólise. Para isso, em cada período estabelecido 50mL de levedura foram centrifugados durante 5 minutos a 3.500 RPM em tubo Falcon, o sobrenadante foi separado e analisado quanto a porcentagem de proteína

bruta, o pellet foi lavado com constantes adições de água, homogeneizações e centrifugações, até que o Brix ficasse menor do que 1 e avaliado quanto ao conteúdo proteico em base úmida. Observa-se ao final das 24hs de autólise, um decréscimo pequeno de proteína no pellet e um ganho igualmente pequeno de proteína solúvel no sobrenadante quando comparado com tempo zero. Esses resultados confirmam os obtidos e descritos anteriormente, de que uma grande porcentagem dos compostos nitrogenados da levedura já foram extraídos ao longo do processo comum de preparo do creme, antes mesmo do processo de autólise iniciar.

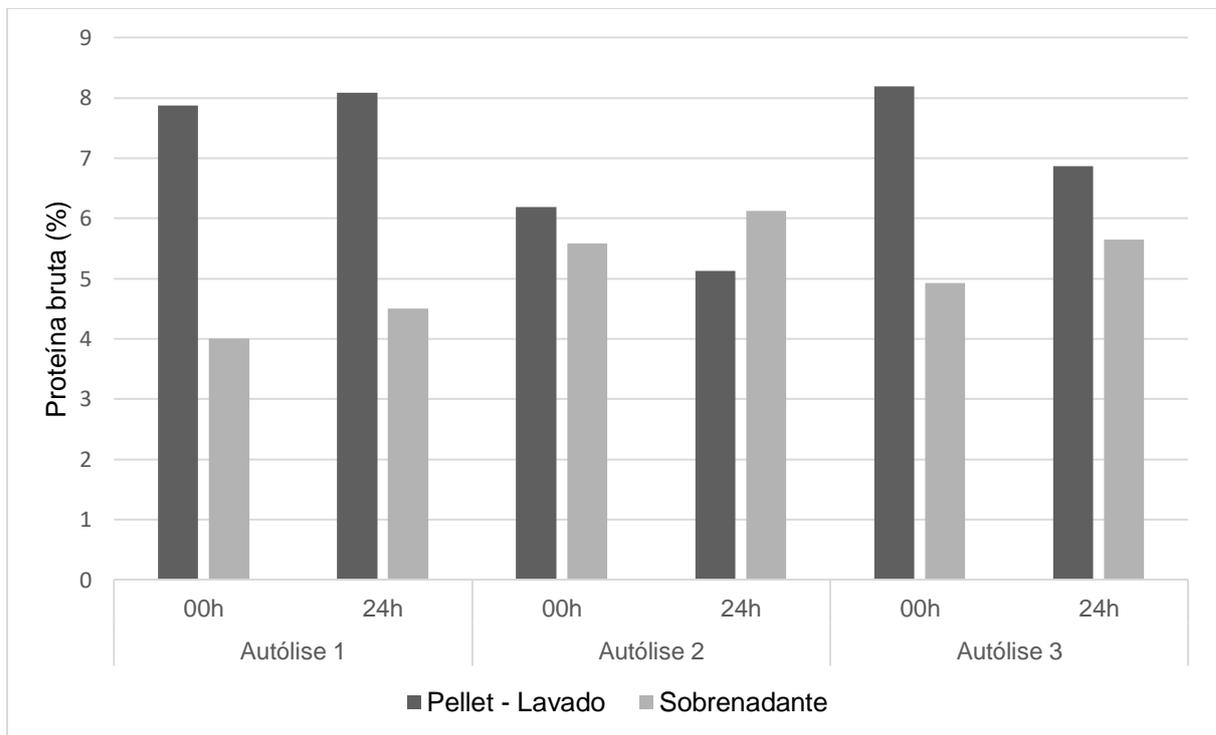


FIGURA IV: Análise do percentual de proteína bruta em base úmida na levedura (sobrenadante e pellet) ao longo do processo de autólise industrial.

## 9 Sugestão de melhoria no processo de autólise

Como parte da proposta de melhorias, foi realizado um teste onde buscou-se utilizar o creme obtido no Experimento 4 do Teste 2 que representava o processo ideal de autólise (por apresentar o maior teor de proteína 52,54%), como aditivo para aumentar o teor de proteína no Experimento 1 que representava o tratamento menos adequado com teores mais baixo (42,59%) e realizado atualmente na fábrica. Também foram utilizados cremes provenientes do processo que continham teores muito baixos de proteína bruta (33,01%).

A sugestão se baseia na possibilidade de produzir um lote grande em condições mais adequadas, porém mais caras e trabalhosas e utiliza-lo como aditivo em outros lotes produzidos de maneira convencional. Os resultados (TABELA XIV) mostraram que uma mistura contendo  $\frac{1}{4}$  do creme com teor mais elevado de proteína proveniente do Experimento 4, elevou em 3,46% o teor dos cremes ruins provenientes do processo, chegando em 36,47% e em 4,21% o creme proveniente do Experimento 1 chegando em 46,80%. Esses resultados deixam em aberto a possibilidade de adaptações buscando a obtenção deste creme com melhor qualidade e sua utilização como aditivo visando o aumento do teor de proteína no produto final.

TABELA XIV: Teste de adição de autolisado com alta qualidade.

<b>Teste de Adição</b>	
<b>Cremes</b>	<b>Proteína (%)</b>
Experimento 4 do Teste 2	52,54
Experimento 1 do Teste 2	42,59
Mix de cremes com má qualidade	33,01
Mix com 75% Exp. 1 e 25% do Exp. 4	46,80
Mix com 75% com cremes de má qualidade e 25% do Exp. 4	36,47

## 10. Conclusões

As condições da matéria-prima proveniente das cervejarias se mostram bem melhores do que imaginávamos anteriormente à realização deste projeto, porém, alguns lotes podem apresentar características que sozinhas ou somadas a variáveis no processo irão interferir na quantidade de proteína bruta no produto final.

Nosso principal fornecedor, o A, quase não apresenta variáveis em sua matéria-prima (creme), já o fornecedor B apresentou matéria-prima com condições físico-químicas e viabilidade celular um pouco inferiores. De maneira geral essas características não seriam um problema pois conhecendo estas variáveis poderíamos destinar os cremes do fornecedor B (e outros com estas condições) para o produto denominado Levedura Inativa, pois esse processo é mais rápido, barato e menos complexo. Os resultados obtidos aqui foram esclarecedores quanto a pré-conceito que tínhamos antes, como esperar que condições como a viabilidade e a concentração de outros componentes advindos do processo de fabricação de cerveja ou de contaminantes fossem significativamente inadequados, causando a baixa qualidade da matéria-prima.

Outra observação importante foi a constatação que a análise rápida e simples do °Brix pode ser usada para o reconhecimento parcial da qualidade da matéria-prima e do processo de autólise, pois mostrou coerência com o acompanhamento das análises de proteína no sobrenadante, porém não poderia ser usado como única análise de acompanhamento do processo. O °Brix pode ser composto por açúcares que podem diluir o teor de proteína bruta no produto final, porém, também podem expressar proteínas solubilizadas no meio, que seriam perdidas no processo de centrifugação. Portanto matérias-primas com °Brix maiores que 4 e 7 (valores médios encontrados na avaliação da matéria-prima) devem receber maior atenção, sendo direcionadas para outras avaliações como análises de proteína, etanol, ácidos orgânicos e viabilidade para seu melhor direcionamento no processo.

Quanto ao processo de autólise, os experimentos mostraram que o tratamento comum a matéria-prima realizado pelo processo de fabricação pode não ser adequado para a produção de um produto mais complexo como é o caso do extrato de levedura, porém, para o produto autolisado, desde que a centrifugação do

creme ocorra logo após seu aquecimento, a quantidade de proteína solúvel perdida na centrifugação não comprometeria a qualidade do produto final.

A lavagem do creme de cerveja para a redução do °Brix em escala industrial contribuiria para o aumento do teor de proteína no produto seco como visualizado nos Experimentos 4. Porém, para este processo seriam necessárias adaptações nas centrífugas que pudessem viabilizar a centrifugação a frio, além do aumento do tempo, custo e resíduos pois seriam necessárias grandes quantidades de água para a lavagem da matéria-prima.

Os resultados obtidos mostraram a possibilidade de reduzir em 50% o tempo de autólise no processo que atualmente é de 24 horas, pois após o período de 12 horas os ganhos de proteína bruta solubilizada no sobrenadante são pouco expressivos.

O desenvolvimento deste projeto contribuiu para o conhecimento das condições da matéria-prima, do potencial de extração de compostos nitrogenados das leveduras íntegras e de sua variação ao longo do processo. Assim, é possível afirmar que, mesmo possuindo na grande maioria das vezes um alto teor de compostos nitrogenados (> 50%), a composição do °Brix advindo das cervejarias e as condições do processo na Biomin (principalmente referentes ao aquecimento) podem facilmente gerar um produto com teor de proteína inferior a 40% no produto seco, como foi registrado anteriormente na Biomin.

Ao longo deste projeto, informações como a porcentagem dos teores de ácidos, etanol e a composição do sobrenadante (Brix e proteína bruta) foram utilizadas para outros questionamentos referentes a outros produtos e processos, como por exemplo na instalações de novos equipamentos.

Este trabalho contribuiu para a aprovação do orçamento da instalação de um trocador de calor integrado a centrífuga que fará com que o creme seja aquecido e centrifugado em sequência, evitando a exposição a longos períodos de espera com temperaturas elevadas.

## 11. Referências Bibliográficas

- ALEXANDRE, H., & GUILLOUX-BENATIER, M. "Yeast autolysis in sparkling wines". – areview. Aust. J. Grape Wine R. **12**: 119-127, 2006.
- ALMEIDA E SILVA, J.B. Cerveja. In: Venturini Filho, G. W. "Tecnologia de Bebidas". Edgar Blucher, Brasil, p.347-380, 2005.
- ALVES, D.M.G. "Fatores que Afetam a Formação de Ácidos Orgânicos Bem Como Outros Parâmetros da Fermentação Alcoólica". Piracicaba, ESALQ, 1994. Tese de doutorado,199p.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMIS, C.W.; BLACKWELL, M. Intro. Mycol. New York, John Wiley & Sons publishers, 272-293, 1996.
- ANUPAMA, R.P. "Value-added food: single cell protein". Biotechnol. Adv **18**: 459-479, 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 14th ed. Arlington: AOAC International, 1984. (LECO).
- BABAYAN, T.L.; BEZRUKOV, M.G. "Autolysis in yeasts". Acta Biotechnol. Berlin, **5**:129-136, 1985.
- BABAYAN, T.L.; BEZRUKOV, M.G.; LATOV, B.K.; BELIKOV, V.M.; BELAVSEVA, E.M.; TITOVA, E.F. "Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. Morphological effects, rheological effects and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products". Curr. Microbiol., **5**: 163-168, 1981.
- BAGER, F.; ARESTRUP, F.M.; WEGNER, H.G. "Dealing with antimicrobial resistance – the danish experience". J Anim Sci., **80**: 223-228, 2000.
- BARROSO, D. C. et al. Adição da parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) na dieta para frangos de corte. Arquivo Brasileiro de medicina Veterinária e Zootecnia, **65**, (4): p.1139 – 1148, 2013.
- BERGEN, B.V. "*Diacetyl; identification and characterization of molecular mechanisms for reduction in yeast and their application in a novel enzyme based assay for quantification in fermentation systems.*" Doctor of Philosophy. Department of Bioresource Engineering, McGill University. Montreal. 2006.
- BERTECHINI, A. G. Nutrição de monogástrico. Lavras: Ed. UFLA, p.301, 2006.
- BÉHALOVÁ, B.; BERAN, K. "Activation of proteolytic enzymes during autolysis of disintegrated baker's yeast". Folia Microbiol., **24**: 455-461, 1979.
- BIDAN, P.; FEUILLAT, M.; MOULIN, J.P. "Les vins mousseux. Rapport Français. 65eme assemblée Generales de l'OIV". Bulletin de l'Office International de la vigne et du vin, 663-664, 1986.

BIELY, P.N., KREMnickY. "Yeast and their enzyme systems degrading cellulose, hemicellulose and pectin". Food Technol. Biotechnol., **8**, 305-312, 1998.

BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M. & AIGLE, M. "Direct selection of yeast mutants with reduced viability on plates by eritrosine B. staining". Anal. Biochem., **193** (2): 225-230, 1991.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, A. "Metabolism of wort by yeast. In: Brewing: science and practice". Cambridge: Woodhead Publishing, p.401-468, 2004.

BUENO, J.; TORRES, A.; ALMENDROS, A.; CARMONA, R.; NUNEZ, M.C.; RIOS, A.; GIL, A. "Effect of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhea". Histological and ultrastructural changes., Gut, **35** (7): 926-933, 1994.

BUTOLO, J.E. "Uso de biomassa de levedura em alimentação animal: Propriedades, custos relativos e outras fontes de nutriente". Workshop Produção de Biomassa de Levedura: Utilização em Alimentação Humana e Animal. Campinas – SP, 1997. p. 70-89.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M., PACHECO, M.T.B., SGARBIERI, V.C. "Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína em células integras ou rompidas mecanicamente". Ciênc. Tecnol. Aliment., **17** (2): 102 – 106, 1997.

CARLSON, M. "Regulation of glucose utilization in yeast". Curr. Opin. Genet. Dev., **8**, 560-564, 1998.

CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M. "Ethanol tolerance in yeasts". CRC Crit. Ver. Microb., **13**: 219-281, 1976.

CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. "High-growth brewing: effect of nutrition on yeast composition, fermentation ability, and alcohol production". Appl. Env. Microbiol., **48** (3): 639-646, 1984.

CERVBRASIL (Associação Brasileira da Indústria da Cerveja) – Anúaria2014. São Paulo, 2014. Disponível internet:<URL: <http://cervbrasil.org.br/wp-content/themes/cerv/pdf/anuariofinal2014.pdf>. [Consul. Maio. 2015].

CERVBRASIL (Associação Brasileira da Indústria da Cerveja) – Anúaria2014. São Paulo, 2016. Disponível internet:<URL: [http://cervbrasil.org.br/arquivo/anuario2016/161130\\_CervBrasilAnuario2016\\_WEB.pdf](http://cervbrasil.org.br/arquivo/anuario2016/161130_CervBrasilAnuario2016_WEB.pdf). [Consul. Agosto. 2017].

CHARPENTIER, C.; NGUYEN VAN LONG, T.; BONALY, R.; FEUILLAT, M. "Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis". Appl Microbiol Biotechnol., **24**: 405-413, 1986.

FEUILLAT, M.; CHARPENTIER, C. "Autolysis of Yeast in Champagne." *Am. J. Enol., Vitic.*, **33**: 6-13, 1982.

CHO, C.Y. "La energía en la nutrición de los peces". IN: *Nutrición en acuicultura II*. Madrid: ESPINOSA, J.M. & LABARTA, U. (Eds.). Madrid, Espanha: 197-237, 1987.

COLAGRANDE, O.; SILVA, A. "Aspects qualitatifs et technologiques de l'application des méthodes thermiques dans la production des vins mousseux". *Connaiss. Vigne Vin, Talence*, **15**:179-192, 1981.

COLAGRANDE, O.; SILVA, A. "Acides aminés dans les vins mousseux". *Connaiss. Vigne Vin, Talence*, **18**: 27-48, 1984.

CORREA, M.F. "Produção de proteína monocelular com baixo teor de ácidos ribonucleicos a partir de *Cândida utilis*". Rio Claro, Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista. 1992. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada, 99p.

CROMWELL, G.L. "Antimicrobial and Promicrobial Agents". IN: LEWIS, A.J & SOUTHERN, L.L. (ed.) *Swine Nutrition*. CRC Press, Boca Raton, FL. 2001.

DE ROOIJ, J.F.M.; HAKKAART, M.J.J. "Yeast Extract Flavour" Great Britain, Unilever PLC, 1986.

DRAGONE, G. ALMEIDA e SILVA, J.B. In: VENTURINI FILHO, W.G. "Bebidas Alcoólicas: Ciências e tecnologia". **1**. São Paulo: Edgard Blücher, 2010.

DOMBEK, K.M.; INGRAM, L.O. "Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation". *Appl. Env. Microbiol.*, **52**: 471-481, 1986.

DUPRES, V.; DUFRENE Y. F. & HEINISCH, J. J. "Measuring cell wall thickness in living yeast cells using single molecular rulers". *ACS Nano.*, **4**: 5498-5504, 2010.

DZIEZAK, J.D. "Yeasts and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing". *Food Technol.*, **41**(2):104-121, 1987.

EHSANI, M. "Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* With Reduced Ethanol Yield: Control of Acetoin Formation in Glycerol Overproducing Wine Yeast Strains". Montluel, France Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier, 2009. Tese de Doutorado.

FENTON, D.M. "Solvent treatment for b-D-galactosidade release from yeast cells". *Enzyme Microb. Technol. Surrey.*, **4**: 229-232, 1982.

FERREIRA, I.M.P.L.V O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J. G. "Brewer`s *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potencies applications". *Food Sci Technol.*, **21**: 77 – 84, 2010.

FEUILLAT, M.; CHARPENTIER, C. "Autolysis of yeasts in champagne". *Am. J. Enol. Vitic.*, **33**: 6-13, 1982.

FLEURI, L.F. & SATO, H.H. "Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas". *Quim. Nova.*, **28** (5): 2005.

GERNGROSS, T.U. "Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi". *Nature*, **22**: 1409-1422, 2004.

GIOVANI, G.; ROSI, I.; BERTUCCIOLI, M. "Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-Saccharomyces yeast during alcoholic fermentation". *Int. J. Food Microbiol.* **160**: 113–118, 2012.[CrossRef] [PubMed]

HAYS, V.W. "The Hays Report: Effectiveness of Feed Additive Usage of Antibacterial Agents in Swine and Poultry Production". Office of Technology Assessment, US Congress, Washington, DC, and Rachele Laboratories, Inc., Long Beach, C. 1981.

HALÁSZ, A. & LÁSZTITY, R. "Use of yeast biomass in food production". Boca Raton: CRC Press, FL. 312, 1991.

HERNAWAN, T.; FLEET, G. "Chemical and cytological changes during the autolysis of yeast". *J. Ind. Microbiol.*, **14**: 440-450, 1995.

HOUGH, J.S., & MADDOX, I.S. "Yeast autolysis. *Process Biochem*, **210**: 50–52, 1970.

HUIGE, N.J. "Brewery by-products and effluents". IN: PRIEST; F.G. & STEWART, G.G. (Eds.), *Handbook of brewing*, 656 - 713, Boca Raton: CRC Press, 2006.

HUNTER, J.B. & ASENJO, J.A. "A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells". *Biotechnol Bioprocess Eng.*, **31**: 929-943, 1988.

INGRAM, L.O. "Adaptation of membrane lipids to alcohols". *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **35**(B): 235-238, 1985.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. "Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables". *Proc. Biochemist.*, **16**: 42-49, 1981.

JOSEPH, R. "Yeasts: production and commercial uses, IN: (Series Ed.) Richard, K.; Robinson, A. Carl, Batt, D. Pradip, & Patel (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiol.*, 3: 2335–2341 1999.

KANDLER, O.; WEISS, N. "Regular nonsporing Gram positive Rods". IN: *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: SNEATH LW&W, **2**: 1208-1234, 1986.

KENDRICK, B. "The fifth kingdom". 3. ed. Newburyport: Focus, 373, 2000.

KIHLBERG, R. "The microbe as a source of food". *Annu. Ver. Microbiol.*, Palo Alto, **26**(4): 426-465, 1972.

KITAMURA, K. "Re-examination of Zymolyases purification". *Agricultural Biological Chemistry, Journal, Tokio*, **46**: 963-969, 1982.

KNORR, D., SHETTY, K.J., HOOD, L.F.; KINSELLA, J.E. "Na enzymatic method for yeast autolysis". J. Food Sci., **44**: 1362–1365, 1979.

KURTZMAN C.P., FELL J.W. "Definition, classification and nomenclature of the yeasts". IN: The Yeasts, A Taxonomic Study, 4th ed. Elsevier Science: Amsterdam; 3 – 5, 1998b.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; GUZMA´N-ME´NDEZ, B.E.; LOPEZ-MADRID, W. "Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)". Aquacult, **216**: 193 – 201, 2002.

LEÃO, C.; VAN UDEN, N. "Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol". Bioeng., **24**: 2601-2604, 1982.

LERNER, A.; SHAMIR, R. "Nucleotides in infant nutrition: a must or an option". IMAJ, **2**: 772-774, 2000.

LEROY, M.J.; CHARPENTIER, M.; DUTEURTRE, B.; FEUILLAT, M.; CHARPENTIER, C. "Yeast autolysis during champagne aging". Am. J. Enol. Vitic., **41**: 21-28. 1990.

LOUREIRO-DIAS, M.C.; PEINADO, J.M. "Effect of ethanol na other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*". Biotech. Lett., **4**: 721-724, 1982.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. "Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica". Ciênc.Tecnol. Aliment. Campinas., **21**(1): 63-68. 2001.

LURTON, L." Étude de la protéolyse des levures de vinification lors de l`élevage d`un vin sur ses lies". Revue Française des OEnologues, Paris, **113**: 35-41, 1989.

MILLAR, D.; GRAFFITHS-SMITH, U.; ALGAR, E.; SCOPES, R. "Activity and stability of glycolitic enzymes in the presence of ethanol". Biotechnol. Lett., **4**: 601- 605, 1982.

MIRANDA, C. R. "Ordenamento sustentável da suinocultura em Santa Catarina" Disponível em: [http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_artigos/artigos\\_k8d36l7j.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_k8d36l7j.pdf) [Consul. 07 de Setembro de 2007].

MODRA, E. J.; WILLIAMS, P.J. "Are protease active in wines and juices?" The Aust. J. Grape Wine., Adelaide, april, 42-46, 1988.

Moreno-Arribas, M.V.; Polo, M.C.; Pozo-Bayón, M.A. Peptides. "In Wine Chemistry and Biochemistry"; Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Eds.; Springer Science Business Media LLC: Berlin, Germany, 191–209, 2009.

NAYAR, S., HEGDE, S., RAO, P.S.; SUDHA, P. "Live organisms as feed in aquaculture". INFOFISH, **4**: 36 e 39, 1998.

NELSON, D.L., COX, M.M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 3ª edição. Editora Sarvier, São Paulo, SP, Brasil. ISBN: 85-7378-125-4. 2002.

Nitsche B, Jørgensen T, Akeroyd M, et al. "The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: Insights from the transcriptome and secretome. *BMC Genomics*", **13**:380, 2012.

NOBRE, T. P. Viabilidade Celular de *S. cerevisiae* Cultivada em Associação com Bactérias Contaminantes da Fermentação Alcoólica. Piracicaba, Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, 2005. Dissertação de Mestrado, 90 p.

NUNES, J.K. et al. Suplementação de extrato de levedura na dieta de poedeiras: Qualidade de ovos. *Arquivos de Zootecnia*, **59**, (227): 369 – 377, 2010.

OETTERER, M. "Tecnologia de produção de cerveja", Universidade de São Paulo, Dept. De Agroindústria, Alimentos e Nutrição, 9 – 17, 2004.

OLIVA-NETO, P. Estudo de Diferentes Fatores que Influenciam o Crescimento da População Bacteriana Contaminante da Fermentação Alcoólica por Leveduras. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos- Unicamp, 1995. Tese de Doutorado, 112 p.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. "Evaluation of bacterial contamination in fed-batch alcoholic fermentation process". *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **10**: 697-699, 1994.

OLIVA-TELES, A.; & GONÇALVES, P. "Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles". *Aquacult*, **202**: 269-278, 2001.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRIGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. "Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **85**: 41 – 50, 2002.

ORBAN, E.; QUAGLIA, G.B.; CASINI, I.; MORESI, M. "Effect of temperature and yeast concentration on the autolysis of *Kluyveromyces fragilis* grown on lactose-based media". *J. Food Eng.*, **21**: 245–261, 1994.

OSUMI, M. "The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation". *Micron.*, **29**: 207-233, 1998.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. "Microbiologia. São Paulo. McGraw Hill do Brasil, 566, 1980.

PHAFF, H.J. "Isolation of yeast from natural source. IN: Isolation of biotechnological organism from nature". Labeda (ed) US Mc-Graw-Hill Inc. 53-59, 1990.

PRETORIUS, I.S. "Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking". *Yeast*, **16**: 675-729, 2000.

QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; OLMO, M.; BARRIO, E. "Adaptive evolution of wine yeast". *Int. J. Food Microbiol.*, **86**: 3-10, 2003

RAINIERI, S. "The brewer's yeast genome: from its origins to our current knowledge". In V. R. Preedy (Ed.), *Beer in health and disease prevention*. New York, Elsevier, 89-10, 2009.

REED, G. AND NAGODAWITHANA, T.W. "Yeast Technology" (second ed.), New York: Avi Publishing, 765, 1991.

RÉVILLION, J. P.; BRANDELLI, A.A.M.A.Z. "Production of Yeast Extract from Whey using *Kluyveromyces marxianus*". *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **46** (1), 121-127, 2003.

ROSA, E.D.; TSUKADA, M.; FREITAS, L.A.P. "Secagem por Atomização na Indústria Alimentícia: Fundamentos e Aplicações". Ribeirão Preto, DEPTO DE ENGENHARIA - LABMAQ DO BRASIL LTDA., 1-12, 2006.

ROSE, A.H. "Industrial importance the *Saccharomyces cerevisiae*". IN: SKINNER, F.A. *Biology and Activities of Yeast*, Ed. Academic Press. 1980.

RUMSEY, G.L.; HUGHES, S.G.; SMITH, R.R.; KINSELLA, J.E.; SHETTY, K.J. "Digestibility and energy values of intact, disrupted and extracts from brewer's dried yeast fed to rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*)". *Anim. Feed Sci. Technol.*, **33** (3):185-193, 1991.

RUMSEY, G.L.; KINSELLA, J.E.; SHETTY, K.J.; HUGHES, S.G. Effect of high dietary concentrations of brewer's dried yeast on growth performance and liver uricase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Feed Sci. Technol.*, **33** (3): 177-183, 1991.

RUTZ, F.; ANCIUTI, A. A.; RECH, J. L.; GONÇALVES, F. M.; DELGADO, A. D.; ROSA, E. R.; ZAUK, N.; RIBEIRO, C. L. G.; SILVA, R. R.; DALLMANN, P. R. "Desempenho e características de carcaças de frangos de corte recebendo extrato de levedura na dieta". *Ciênc. Anim. Bras.*, **7** (4):349-355, 2006.

SATO, M.; MORIMOTO, H.; OOHASHI, T. 1987. "Increase of intracellular proteinase activities in extinct cells of *Saccharomyces cerevisiae*". *Agric Biol Chem, Tokio.*, **51** (9): 2609-2610, 1987.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. "Biotecnologia industrial": **3**: Processos fermentativos e enzimáticos. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo-SP, 2001.

SCOTT, J.H.; & SCHEKMAN, R. "Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis". *J. Bacteriol.*, **142**: 414-423, 1980.

SHARMA, S.; & TAURO, P. "Enzyme behavior during ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*". *W.J. Microb. Biothecnol.*, **2**: 112-115, 1987.

SHIN K-S, KWON N-J, KIM YH, et al. "Differential roles of the ChiB chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans*". *Eukaryot Cell*. **8**:738-46, 2009

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. "Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **41**: 125 – 139, 1994.

SPIES, A. "The sustainability of the pig and poultry industries in Santa Catarina, Brazil: a framework for change". Australia, School of Natural and Rural Systems Management - The University of Queensland, 2003. Tese de Doutorado, 370 p.

STEWART, G.G., & RUSSELL, I. "A introduction to brewing science & technology: brewer's yeast". London: The Institute of Brewing. 108: 1998."

STWART, G.G., & RUSSEL, L. Manual da levedura e fermentação High Gravity. Heriot-Watt University, Ricarton, Edinburg EH 14 4AS. Scotland, 2005.

SUGIMOTO, H. "Synergistic effect of ethanol and sodium chloride on autolysis of baker's yeast for preparing food grade yeast extracts". *J. Food Sci.*, **39**: 939–942, 1974.

TANGULER, R.H. & ERTEN, H. "Utilization of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature". *Food Bioprod Process.*, **86**: 317-321, 2008.

TESTA, V.M. "Desenvolvimento sustentável e a suinocultura do oeste catarinense: desafios econômicos, sociais e ambientais". IN: *Desafios para o desenvolvimento sustentável da suinocultura: uma abordagem multidisciplinar*. GUIVANT, J; MIRANDA, C.R de. Chapecó: Argos, 1991. P. 23-72.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. *Microbiologia*. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

VERDUYN, C.; SUKSOMCHEEP, A.; SUPHANTHARIKA, M. "Effect of high pressure homogenization and papain on the preparation of autolysed yeast extract". *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **15**: 57–63, 1999.

VOSTI, D.C.; & JOSLYN, M.A. "Autolysis of baker's yeast". *Applied Microbiology*, Washington, **2**: 70-8, 1954.

WALKER, G.M. "Yeasts physiology and Byotechnology". Ed John Wiley and Sons. England, 350, 1998.

WHITAKER, J.R. "Principles of enzymology for the food sciences". New York. Marcel Dekker, Food Sci., 636, 1972.

WHITE, L.A.; NEWMAN, M.C.; CROMWELL, G.L.; LINDEMANN, M.D. "Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs". *J. Animal Sci.*, **80**: 2619 - 2628, 2002.

YALÇIN, S. et al. "Effects of dietary yeast autolysate (*Sacchomyces cerevisiae*) and black cumin seed (*Nigella sativa* L) on performance, egg traits, some blood characteristics and antibody production of laying hens." *Livestock Science*, **145**: 13 – 20, 2012.

ZECH, M.; GÖRISCH, H. "Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: reversible activation by components of industrial molasses media". *Enz. Microb. Technol.*, **17**: 41-46, 1995.