

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PEDRO SGOBBI PARANHOS DA COSTA

ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DE CERVEJAS ALE E LAGER

PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2019

PEDRO SGOBBI PARANHOS DA COSTA

ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DE CERVEJAS ALE E LAGER

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de graduação em Biotecnologia.

PATOS DE MINAS – MG

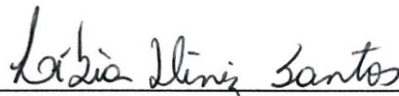
DEZEMBRO 2019

PEDRO SGOBBI PARANHOS DA COSTA

ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DE CERVEJAS ALE E LAGER

“Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia”

Banca Examinadora:



Líbia Diniz dos Santos - FEQUI
Presidente



Gilvan Caetano Duarte - IBTEC
Membro



Liliane Maciel de Oliveira - FEQUI
Membro

PATOS DE MINAS - MG

DEZEMBRO 2019

AGRADECIMENTOS

À minha família, a qual me sinto extremamente sortudo em fazer parte. Pessoas incríveis que me apoiam e me amam em todas as situações. Pai e mãe, obrigado por proporcionarem ou estarem presentes durante os melhores momentos da minha vida e por me darem força durante os períodos mais difíceis.

À Professora Dra. Líbia Diniz Santos, por ter acreditado em mim e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, foi um prazer.

Ao Professor Dr. Marcos de Souza Gomes pelo apoio e instrução na elaboração da cerveja e ao longo do trabalho.

Às amigas criadas em Patos de Minas, durante meus 4 anos em Patos de Minas encontrei pessoas incríveis que me ajudaram durante todo o tempo, cada uma de forma diferente mas todas necessárias e importantes para que tudo ficasse mais feliz, agradável e tolerável. Em especial, Bárbara (babi), Eric, Fernanda, Flávia, Laura, Luis, Tallita e Vinicius, aprendi e evolui muito com cada um de vocês, sentirei saudades dos momentos compartilhados, bons e ruins.

Aos amigos de Ribeirão Preto – SP, poder contar com vocês mesmo que muitas vezes longe foi incrível, cada retorno era como se horas tivessem passado e não semanas, até meses. Vocês sempre foram e continuarão sendo o meu porto seguro.

À toda equipe dos laboratórios dos cursos de Biotecnologia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Campus Patos de Minas – Minas Gerais por proporcionarem um ambiente amigável e de suporte aos alunos.

Aos professores da UFU Campus Patos de Minas, por acreditarem na universidade federal e na ciência feita em nosso país.

RESUMO

Bebidas fermentadas estão presentes na história da humanidade desde os primórdios do tempo. Entre as bebidas temos a cerveja, que surgiu como uma alternativa barata ao vinho e ganhou enorme popularidade em civilizações como a egípcia, mesopotâmica e romana. Atualmente, o Mercado cervejeiro do Brasil está em grande crescimento, com foco no setor de bebidas de caráter artesanal, cada vez mais buscam-se novas variedades de cervejas e bebidas de maior qualidade. Com o consumo em expansão torna-se extremamente importante o controle de qualidade da matéria-prima utilizada, da qualidade das leveduras e também do rendimento da fermentação. O presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* T58, recomendada para cervejas tipo Ale em meios para produção da cerveja e avaliar seu desempenho durante todo o processo de fermentação em condições de baixas e altas temperaturas, simulando a fabricação de bebidas Ale e Lager. As análises realizadas revelam que o desempenho da levedura T58 em condições típicas de fermentação Ale ocorreu de maneira natural. A levedura foi capaz de realizar a síntese de etanol através da fermentação dos açúcares atingindo concentrações típicas de crescimento celular ao passo que produziu alta concentração de etanol e glicerol. A fração do experimento realizada sob condições de fermentação Lager não apresentou desempenho satisfatório e viável para a produção de cerveja. Observou-se a tendência do fermento T58 em priorizar o crescimento celular e não a síntese de produtos como CO₂, glicerol e etanol na cerveja Lager se mostrando não viável para produção industrial.

Palavras-chave: Bebida fermentada. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação.

ABSTRACT

*Alcoholic beverages have been a part in human history since the dawn of time. Among the most popular ones we have beer, a drink that emerged as a cheap alternative to wine and became a huge success in ancient civilizations such as Egyptian, Mesopotamian and Roman. Currently Brazil's market is booming with emphasis on the handcrafted type of beer. New varieties of drinks are increasingly being sought and higher quality beverages are being obtained. With increasing consumption, quality control and new studies regarding the raw materials used become extremely important so does the quality of yeast and also the fermentation yield of these beers. The present study aims to study the cell viability of *Saccharomyces cerevisiae* in beer production and evaluate its performance during the whole fermentation process under low and high temperature conditions simulating the manufacture of Ale and Lager beverages. Analyzes show that the performance of yeast T58 under typical conditions of Ale fermentation occurred naturally. The yeast was able to perform the synthesis of ethanol through the fermentation of sugars, reaching typical cell growth concentrations while producing high concentration of ethanol and glycerol. The fraction of the experiment performed under Lager conditions did not present satisfactory and viable performance for industrial production. T58 yeast tended to prioritize cell growth rather than synthesis of products such as CO₂, glycerol and ethanol.*

*Kewwords: Beer. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentation.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas da produção de Cerveja representadas em esquema simplificado.....	10
Figura 2 – Teste de iodo para qualificação visual do amido.....	15
Figura 3 - Estruturas adaptadas para fermentação das cervejas ALE e LAGER. Ligado aos Erlenmeyers contendo o mosto estão tubos conectados a garrafas de água, permitindo a saída de CO ₂ do sistema fermentativo, bem como impedindo a entrada de O ₂	16
Figura 4 - pHmetro utilizado para as leituras de pH na pesquisa.....	16
Figura 5 - Materiais utilizados para preparar as amostras para a contagem de células. Nos balões foram realizadas as diluições de 100 vezes e no béquer se acrescentava o corante azul de metileno.....	18
Figura 6 - de Câmara de Neubauer, semelhante à utilizada no presente trabalho.....	18
Figura 7 - Câmara de Neubauer contendo amostra sendo visualizada em microscópio óptico em aumento de 40X. As células transparentes são células vivas, enquanto as coradas com o azul de metileno são células mortas.....	19
Figura 8 – Amostra Centrifugada.....	20
Figura 9 - Cromatógrafo Líquido utilizado para leitura das amostras.....	20
Figura 10 - Imagem aproximada do sistema de fermentação. É possível visualizar uma camada clara ao fundo do Erlenmeyer, sendo esta camada as leveduras floculadas.....	22
Figura 11 - MEB Concentração dos Açúcares Redutores Totais (ART) presentes ao longo da fermentação da cerveja do tipo ALE. O teor de ART em g/L em cada dia foi obtido através da leitura do HPLC.....	23
Figura 12 - Concentração dos de Etanol produzido ao longo da fermentação da cerveja do tipo ALE. O teor de etanol em g/L em cada dia foi obtido através da leitura do HPLC.....	23
Figura 13 - Viabilidade celular das leveduras ao longo da fermentação da cerveja do tipo ALE. A concentração de células (células por mL) foi quantificada através da contagem na câmara de Neubauer.....	24
Figura 14 - Concentração dos Açúcares Redutores Totais (ART) presentes ao longo da fermentação da cerveja do tipo LAGER. O teor de ART em g/L em cada dia foi obtido através da leitura do HPLC.....	25

Figura 15 - Concentração dos de Etanol produzido ao longo da fermentação da cerveja do tipo LAGER. O teor de etanol em g/L em cada dia foi obtido através da leitura do HPLC.....	25
Figura 16 - Viabilidade celular das leveduras ao longo da fermentação da cerveja do tipo LAGER. A concentração de células (células por mL) foi quantificada através da contagem na câmara de Neubauer usando azul de metileno como corante.....	26
Figura 17 - Concentração de Glicerol produzido ao longo da fermentação da cerveja do tipo ALE. O teor de glicerol em g/L em cada dia foi obtido através da leitura do HPLC.....	27
Figura 18 - Concentração de Glicerol produzido ao longo da fermentação da cerveja do tipo LAGER. O teor de glicerol em g/L em cada dia foi obtido através da leitura do HPLC.....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 História	9
2.2 Matérias-primas.....	10
2.2.1 Água.....	10
2.2.2 Malte – Cevada e Trigo	12
2.2.3 Lúpulo	12
2.2.4 Leveduras.....	13
2.3 Etapas de produção – cerveja.....	14
2.3.1 Fermentação	16
2.4 Glicerol e seus efeitos	18
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Material	19
4.2 Metodologias	19
4.2.1 Brassagem, filtração e fervura do mosto.....	19
4.2.2 Determinação do pH.....	21
4.2.3 Determinação da Densidade	21
4.2.4 Viabilidade celular	22
4.2.5 Análise das concentrações de açúcares e álcool.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Análise do pH durante a mosturação	25
5.2 Densidade do mosto.....	26
5.3 Análise do processo fermentativo	26
5.4 Produção de glicerol durante a fermentação	32
6. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Com o mercado cervejeiro passando por um crescimento exponencial no Brasil e possuindo crescimento ao redor do mundo é importante o desenvolvimento de pesquisas direcionadas ao processo de fabricação dessa bebida e todas as suas etapas, com o objetivo de afirmar técnicas adotadas e também na busca por novas fórmulas, com maior eficiência, segurança, menores custos e rapidez.

A cerveja é uma bebida que assim como o café está profundamente relacionada com a humanidade, estando ambas presentes em momentos de socialização e interação entre pessoas, cada qual com suas particularidades.

Com isso, avaliar a eficiência e viabilidade celular durante a fermentação da cerveja auxiliará em melhorias para essa bebida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 História

Produtos derivados da fermentação como a cerveja fazem parte da história da humanidade desde o momento em que nossos antepassados deixaram de ser nômades e passaram a cultivar cereais, ocorrendo isso por volta de 9000 a.C. (ZARNKOW, 2014). Ao longo dos milênios, a cerveja era produzida por meios incompreensíveis, havendo registros como na Inglaterra Medieval de palavras usadas para definir leveduras com significados similares a espuma (LIVENS, 2016). A cerveja mais próxima da bebida que consumimos atualmente começou a ser registrada e aprimorada cerca de 8000 anos atrás na Mesopotâmia de forma acidental, proveniente de pães que passaram pelo processo de fermentação espontânea, dando origem à ainda recorrente expressão “*pão líquido*” (SORBO, 2017).

Dados de poucos séculos depois, encontram-se registros no Egito relatando por volta de 5400 a.C. A presença de uma bebida fermentada muito próxima da cerveja mesopotâmica. Adota-se como certo de que a civilização egípcia teve grande responsabilidade na expansão da cerveja para o oriente e bacia do mar Mediterrâneo devido às suas redes e trocas comerciais com outros impérios (JÚNIOR, 2010).

Uma das muitas curiosidades sobre a história da cerveja é o fato de que até o início da Idade Média as principais responsáveis pelo processo de fabricação cervejeiro eram as mulheres (BARNETT, 2010). Muitas vezes utilizavam-se adjuntos como uva, tâmaras e ervas locais para aumentar o valor e conquistar um maior número de consumidores (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006). Apesar de ser uma bebida histórica assim como a humanidade, a cerveja não obteve fácil aceitação com a população de maior poder aquisitivo, Grécia e Roma, possuindo provas de que suas elites tinham maior apreço por bebidas como o vinho. Ao contrário, a classe baixa consumia cerveja em maior quantidade devido ao seu baixo valor comercial e simples fabricação. Já na história moderna, a cerveja chegou ao Brasil por volta de 1808 com a chegada da família real portuguesa a qual fugia da invasão de Napoleão Bonaparte (LIMA, 2014).

Do momento em que as importações de cerveja começaram a chegar em território nacional por meio da Inglaterra, na época a principal parceira portuguesa, o apreço pela cerveja foi bem aceito e difundido na colônia (ANGELONI, 2016). Atualmente há uma grande expansão no mercado de microcervejarias no Brasil assim como houve nos Estados Unidos durante os anos 80 (SANTOS, 2004). Em meio a popularidade de bebidas artesanais encontra-se no Brasil um grande entrave entre pequenos produtores e a legislação, causando situações de ilegalidade e debates entre órgãos governamentais e associações de cervejeiros (JUSBRASIL, 2017).

2.2 Matérias-primas

Os quatro ingredientes principais para a produção da cerveja são água, malte, leveduras e lúpulo.

2.2.1 Água

Ao longo da história da cerveja, um dos fatores cruciais foi a água. Porém, nos primórdios da fabricação, não se tinha o conhecimento da importância que as características minerais e iônicas desempenham no produto final, como consequência, não havia padronização entre uma cerveja produzida por exemplo no sul e outra produzida no norte do Brasil, mesmo que fosse seguida a mesma receita e maneira de preparo. Nascentes de água eram cobiçadas pelo simples motivo de fornecerem água constantemente ao cervejeiro sem grandes análises de qualidade (ANDERSON et al., 2019).

Para a obtenção de um litro de cerveja são gastos, em média, de cinco a dez litros de água, parte na trituração dos cereais, fervura do mosto, até mesmo no processo de embalagem. No entanto a etapa com maior demanda é a limpeza do maquinário e equipamentos utilizados durante todo o processo, informações essas que sustentam a busca simples e direta por grandes volumes de água (FILLAUDEAU, 2006).

A água compõe até mais de 90% da cerveja (EPA, 2013). Somente com o avanço da ciência e formas de tratamento de água que análises experimentais permitiram associar informações como: pH, sulfato de cálcio e microrganismos; com o sabor, aroma, qualidade da água e conseqüentemente as características da cerveja final (CASTRO, 2014). O dado mais simples e rápido de ser analisado é o pH. Fontes minerais potáveis possuem o pH por volta de 7.5. Cervejas Lager apresentam pH entre valores 4.0 e 5.0 e ales entre valores de pH 3.0 e 6.0. A preservação desses valores é fundamental para que o sabor esperado na bebida consiga ser alcançado (PALMER, 2013).

Íons por sua vez são de grande importância na análise da água e são divididos em dois grupos: Primário, são íons que em quantidades elevadas afetam a potabilidade da água, impossibilitando assim seu uso direto na fabricação da cerveja, exigindo maiores gastos de tempo e dinheiro ao cervejeiro; Secundário, íons que afetam o sabor e o pH da água e conseqüentemente da cerveja, porém não causam maiores problemas ou impossibilitam o consumo do produto final. Para o primeiro grupo existem padrões de segurança legislados e passam por fiscalizações, são eles: bromato, ácidos haloacéticos, trihalometano, nitrato e cloro. Para o segundo, não existe controle na legislação para suas quantidades, sendo eles: cobre, ferro, manganês e alumínio de forma que águas contendo grandes quantidades dos mesmos são utilizadas ou não puramente por questões sensoriais e adequações ao padrão desejado da cerveja final. Os íons mais importantes para a padronização da cerveja são cálcio, magnésio, sódio, cloro e sulfato. O cálcio é responsável por estabilizar a atividade enzimática no processo de trituração dos cereais. Magnésio quando em altas concentrações causa amargor excessivo na bebida, fazendo com que o produto final fique desagradável ao paladar. Íons sódio apresentam duplo efeito no resultado final da cerveja, em baixas concentrações o íon é capaz de adoçar, criando uma cerveja mais leve e palatável, porém em altos níveis interage com o cloreto e deixa a bebida salgada. A quantidade de cloro na bebida também afeta o sabor, criando um sabor adocicado agradável e é usado para abaixar a alcalinidade da água. Por fim, o sulfato é utilizado na indústria para acentuar a presença do lúpulo e criar o aspecto seco na cerveja (ANDERSON, 2019).

2.2.2 Malte – Cevada e Trigo

Com origem no Oriente Médio a cevada (*Hordeum sp.*) é o quinto grão de maior cultivo em nosso planeta, sua produção ultrapassa 100 milhões de toneladas anualmente, com uma média de 140 milhões de toneladas e com uma área de cultivo próxima de 530.000 quilômetros quadrados (EMBRAPA, 2012).

A cevada pode ser conhecida somente pelo seu uso na indústria cervejeira, porém, não só antigamente o grão era utilizado como base da alimentação no Oriente Médio, hoje com avanços tecnológicos e industriais, a cevada é cultivada mundialmente com usos no ramo alimentício, na forma de farinha, flocos utilizados para produtos de alimentação infantil, pães e doces; na indústria farmacêutica e seu principal mercado, serve como base para a criação de rações animais. Analisando o mercado brasileiro, a malteação tem respondido por cerca do consumo e utilização de 75% da produção nacional. Um grão de boa qualidade para a indústria cervejeira deve ser uma grande fonte de amido (60% do grão de cevada é reserva de amido); deve conter em sua composição enzimas capazes de catalisar a transformação do amido; possuir aminoácidos essenciais na formação de cor e aromas durante o processo de brasagem e íons cruciais para que o metabolismo das leveduras aconteça de forma natural e eficaz (ZSCHOERPER, 2014).

Trigo (*Triticumaestivum L.*), o segundo grão mais cultivado no mundo também possui grande destaque e valor na indústria cervejeira. Utilizado para proporcionar aroma e sabor característico, o trigo malteado também é responsável pela formação e estabilidade da espuma no produto final, devido à presença de polímeros de pentoses (*pentosans*) que proporciona maior viscosidade na cerveja. Negativamente, o trigo dificulta o clareamento da bebida, deixando-a com maior turbidez (BOGDAN, 2017). Quando há uso do trigo recomenda-se realizar uma moagem grossa para evitar problemas na filtração do mosto (Faltermaier, Waters, Becker, Arendt, & Gastl, 2014). Desta forma, o grão utilizado proporciona características únicas para a elaboração de produtos diferenciados e qualificados para o mercado consumidor cada vez mais exigente.

2.2.3 Lúpulo

Humulus lupulus Linnaeus é o nome científico da espécie chamada comumente de lúpulo, pertencente à ordem das Rosales e da família Cannabaceae. Trata-se da principal espécie do gênero cultivada comercialmente e em larga escala. *H. lupulus* é caracterizada

como uma trepadeira perene e tem como período de colheita o final de março até início de maio, podendo ser estendido até junho (SCHLENK, 2017).

Cultivar lúpulo em território brasileiro é um grande desafio. A planta necessita de estações bem definidas e padronizadas e é preciso grande afluência de água durante o ano, dificultando assim para o agricultor brasileiro cultivar lúpulo com êxito (PINTO, 2018).

Após a colheita, a parte de maior interesse para a indústria é a flor da planta feminina, que permanece refrigerada até que seja processada ou embalada para venda em sua forma natural (LEME, 2017). A flor do lúpulo apresenta em sua composição química elementos como: resinas amargas totais, proteínas, celulose, polifenóis, sais minerais, açúcares, lipídeos, óleos essenciais e aminoácidos (ALMEIDA e SILVA, 2005). Mesmo com 90% dos óleos perdidos até o final da fervura devido a sua alta volatilidade, pouco do seu aroma ainda é preservado e com isso, o produto final possui maior valor agregado (DURELLO, 2019).

Caso haja o objetivo de se criar uma cerveja carregada no aroma, adiciona-se as flores de lúpulo a partir da metade do tempo da fervura, mantendo maiores quantidade de compostos voláteis que serão preservados até o produto final. Em relação às resinas, consegue-se controlar e modificar o amargor durante o processo de fervura já que é a isomerização dos alfa-ácidos, encontrados nas glândulas produtoras de resinas da flor, em iso-alfa-ácidos que confere essa característica (KISHIMOTO, 2005).

2.2.4 Leveduras

As leveduras só foram reconhecidas como responsáveis pelo processo fermentativo das cervejas no século dezoito por conta de estudos realizados por Louis Pasteur. Os resultados de seus estudos não só reconheceram as leveduras como também impulsionou um ramo essencial para a ciência, a bioquímica (SCHLENK, 1985). Responsáveis pela etapa de fermentação da cerveja, as leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares, em sua maioria do Reino Fungi que se reproduzem por meio de brotamento ou gemulação. São organismos classificados por suas características fisiológicas pois apresentam diferentes modelos morfológicos entre si e por este mesmo fato, a classificação e nomes das leveduras eram constantemente alterados (DEÁK, 2008). Devido a seleção artificial feita durante séculos de maneira indireta pelos cervejeiros, as leveduras mais comuns perderam a habilidade de formar esporos, fato esse que diminui a variabilidade genética ao longo das gerações e traz consistência para a indústria (SICARD; LEGRAS, 2011). O processo

cervejeiro é em suma, resultado de múltiplos estágios envolvendo a conversão biológica de materiais *in natura* em produtos de interesse, sendo o principal produto desejado o etanol (WALKER, 2000).

Após serem descobertas e isoladas no final do século 19, as leveduras eram classificadas de acordo com a área em que ficavam ao final do processo de fermentação. As leveduras que se locomoviam para a área superior eram chamadas de "top strains" e eram selecionadas para a fabricação de cervejas Ale, Porter e Stout; leveduras que sedimentavam e permaneciam no fundo dos tanques de fermentação até o final do processo eram chamadas de "bottom strains" e recebiam maior procura dos cervejeiros interessados em fabricar cervejas lagers. Com o desenvolvimento da indústria e de pesquisas científicas, sabe-se que ambos os grupos de leveduras, ale e lager apresentam altos níveis de hibridação entre si e com diferentes espécies de leveduras como *S. pastorianus*. e *S. eubayanus*. (KARABIN, 2017).

Atualmente a indústria tem buscado maneiras de aumentar o rendimento dos microrganismos para baratear a produção e elevar as margens de lucro. Aspectos tidos como já satisfatórios e positivos nas leveduras são: habilidade de fermentar diversos compostos; altas taxas de fermentação, resistência ao estresse, facilidade para modificações genéticas e a habilidade de gerar bons sabores e manter aromas no produto final. Busca-se por outro lado melhorar a capacidade de fermentar açúcares (para a produção de cervejas) como: xilose, lactose e maltodextrina; padronizar a taxa de floculação das leveduras e reduzir mutações espontâneas. Estudos e avanços tecnológicos são necessários para que novas variedades de leveduras cheguem ao mercado e a indústria (Walker, G. M., & Walker, R. S. K., 2018).

2.3 Etapas de produção – cerveja

Criada em 1516 na Bavária, Alemanha, foi estabelecida a Lei de Pureza da Cerveja, a qual dizia estritamente que cerveja era uma bebida derivada da fermentação de malte, lúpulo e água. Leveduras não eram citadas pois ainda não haviam descobertas e a fermentação ocorria de maneira espontânea e natural. Com os ingredientes selecionados e disponíveis, a produção da cerveja pode ser iniciada. O primeiro passo para se produzir uma bebida adequada e de qualidade é a preparação do mosto e inclui etapas como moagem, mosturação, filtragem e resfriamento. O segundo passo é composto pelas etapas: fermentação e maturação. Finalizando essas etapas realiza-se a filtração, carbonatação e pasteurização, apresentada na Figura 1 (AQUARONE et al., 2001).

Figura 1 – Etapas da produção de Cerveja representadas em esquema simplificado.



Fonte: DOCPLAYER, 2016

A moagem é uma etapa inicial e necessária por disponibilizar no mosto o amido presente nos grãos de cevada, trigo, arroz e outras possíveis fontes de açúcares. Durante a moagem recomenda-se preservar a casca dos grãos para essa ajudar na filtragem do mosto posteriormente.

Feita a moagem inicia-se a etapa de brasagem ou mosturação. O malte recebe água pré-aquecida, responsável por ativar as enzimas alfa amilase e beta amilase, sendo importante a água utilizada estar com o pH entre os valores de 5 a 6. A enzima amilase quebra o amido em açúcares redutores que serão as principais fontes de energia para as leveduras na etapa de fermentação. Durante a mosturação a temperatura do mosto deve sempre permanecer abaixo dos 80°C para não proporcionar gosto adstringente derivado dos taninos presentes nos grãos de malte e também para não inativar as enzimas presentes.

Quando pronto, o mosto deve ser filtrado para que as partes insolúveis como as cascas dos grãos e proteínas coaguladas sejam removidas. Trata-se de uma etapa delicada devido a possibilidade de grande parte do extrato ser perdida ou retida no processo. A filtragem do mosto quando realizada gera um produto limpo que apresentará melhores características quando finalizado. A filtração pode ser feita utilizando peneiras de aço, painéis com filtro acoplado, malhas finas e para grandes volumes o uso de bombas se faz útil para agilizar todo o processo.

A última etapa da preparação do mosto é a fervura. Durante esse processo o mosto passa por esterilização já que os microrganismos contaminantes são mortos pela alta temperatura. Compostos indesejáveis para a cerveja também são evaporados e degradados

como os precursores de dimetil, composto responsável por dar à bebida sabor amanteigado (CONCERVEJA, 2017). Uma fervura intensa e suficiente proporciona uma cerveja final clara e biologicamente estável deixando o produto limpo e seguro. Também muito importante, ocorre a adição do lúpulo no mosto. Recomenda-se adicionar o lúpulo na metade ou final do processo para que seus óleos essenciais e características sejam preservadas, seus alfa ácidos são os responsáveis por dar o amargor desejado ao produto final (FONTOURA, 2019).

Após o processo de fermentação, descrito separadamente abaixo no trabalho, ocorre a maturação e o envase. Durante a etapa de maturação a bebida já está quase finalizada para o envase e consumo, isso faz com que muitos pequenos produtores ignorem a etapa ou reduzam o seu tempo de duração. A maturação consiste em deixar a cerveja descansando por algumas semanas, variando de uma a duas, em temperatura baixa, sempre menor do que a temperatura utilizada durante a fermentação e na remoção do fermento para que suas características se tornem constantes e uniformes. Durante o envase, deve-se tomar cuidado para evitar contaminações e é nessa etapa que pode ocorrer os processos de pasteurização e carbonatação da bebida; o processo pode ser em garrafas, latas e barris (CERVIERI et al., 2014).

2.3.1 Fermentação

Atualmente, com o mercado de cervejas artesanais em constante expansão, a indústria tem buscado aumentar a rentabilidade do processo cervejeiro e criar produtos de melhor qualidade para o consumidor geral. O consumo de carboidratos comumente residuais permitiria cervejas com maior porcentagem alcoólica, melhor aproveitamento do malte utilizado e um produto final com menor quantidade de açúcares.

Sabe-se que a fermentação pode ser resumidamente dividida em três principais estágios. A fase lag, período em que as leveduras se adaptam ao ambiente no qual foram inoculadas, não ocorre significativo consumo de carboidratos, porém as células já estão metabolicamente ativas e consomem componentes do mosto como oxigênio e nitrogênio. A fase de crescimento ou de fermentação propriamente dita é o período em que as leveduras utilizam carboidratos como glicose, frutose, maltose e maltotriose para reprodução, produção de etanol e CO₂ entre outros componentes capazes de influenciar o produto final. Por último há a fase estacionária, nutrientes do mosto já não possuem concentrações altas o suficiente para que as leveduras mantenham a metabolização dos carboidratos e as células entram em estado de quase dormência e as taxas de floculação e sedimentação das leveduras se elevam (LIVENS, 2016 & HARRISON, 2017).

A fermentação alcoólica acontece em condições anaeróbicas, com a utilização de açúcares como glicose e frutose são convertidos por meio da glicólise em ATPs, produzindo etanol e dióxido de carbono como compostos secundários originários do ácido pirúvico formado no processo (ALEXANDRINO, 2012). Por meio do quociente respiratório proposto por Kocková-Kratochvílová no ano de 1994, pode-se avaliar a forma com que a levedura está metabolizando os açúcares, trata-se de uma equação simples na qual o CO₂ produzido é dividido pelo O₂ consumido nos tanques de fermentação.

Entre os carboidratos presentes na cerveja, maltose, glicose e maltotriose respondem por até 80% do total no qual o restante é preenchido por frutose, sacarose e açúcares que não são metabolizados pelas leveduras. O consumo dos carboidratos ocorre de maneira sequencial, a levedura fermenta a sacarose, quase que simultaneamente com a glicose e após o consumo de cerca de 50% desses, começa a fermentar a maltose; somente ao final da maltose que os microrganismos começam a utilizar a maltotriose como fonte de energia (LEI, 2016). Novamente, a maltotriose é o maior problema enfrentado pelos cervejeiros pois sua taxa de fermentação é lenta e tardia, levando à menor rendimento e cervejas com altos níveis de açúcar. Alguns estudos apontam cepas que dão à maltotriose outra finalidade além da produção de etanol, como por exemplo, fonte de carbono e energia para a reprodução celular (JÚNIOR, 2010).

Para que o processo de fermentação ocorra com maior controle e de forma adequada, checar a viabilidade celular das leveduras e realizar a contagem de células se torna um bom indicativo sobre eventuais complicações. Parâmetros que servem como indicadores são: crescimento celular, floculação, consumo de carboidratos, redução de pH, produção de etanol e CO₂. Próximo do último dia de fermentação a checagem sobre a presença de bolhas de CO₂ e a medição de densidade (permite calcular a quantidade de açúcar no mosto) também são bons parâmetros para avaliar se o processo continua ocorrendo e em qual intensidade (WALKER, 2018). A fermentação pode ocorrer de diversas maneiras e varia com a quantidade de produto desejado, espaço físico disponível e o dinheiro investido no processo de criação da cerveja. Dentre as variações, contínua, batelada, batelada alimentada, semi-contínua, através de fermentação imobilizada são as mais comuns e vistas dentro das cervejarias e microcervejarias (PUTMAN, 2018).

Manter as leveduras nutridas também é um fator crucial quando se busca aumentar o rendimento alcoólico dos microrganismos, além dos açúcares. *S. cerevisiae* também necessita de minerais, nitrogênio, oxigênio para crescimento celular e um controle adequado da temperatura, que varia de acordo com a cepa utilizada e o tipo de fermentação que irá ocorrer.

A falta de nitrogênio pode paralisar a fermentação quase que completamente de acordo com o pesquisador Ingledeew. No geral, as leveduras são a peça chave para todo o processo acontecer. A indústria encontra-se com barreiras e limitações que no futuro abrirão portas para novas cepas, maior rendimento etanólico e lucros maiores para os cervejeiros.

2.4 Glicerol e seus efeitos

Descoberto em 1779 por Karl WihelmScheele através da saponificação de azeite de oliva, o glicerol é um poliálcool amplamente utilizado pela indústria moderna. Encontra-se o uso de glicerol no processo de fabricação de biodiesel, fármacos, alimentos e cosméticos (AGEITEC).

Especificamente para a indústria cervejeira, o glicerol é citado como responsável por dar viscosidade ao produto final, dar à cerveja toque adocicado em seu sabor e influenciar a resistência das leveduras frente ao estresse osmótico. Altas quantidades de glicerol também estão relacionadas a bebidas fermentadas com menores porcentagens de etanol, otimizações para a geração de glicerol são boas alternativas para a produção de bebidas mais saborosas e com menores teores alcóolicos (ZHAO, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como principal objetivo estudar a cinética da fermentação na produção de cervejas Lager e Ale utilizando a levedura SafAle T 58 - Fermentis.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* nos meios de produção;
- Avaliar o consumo de substratos durante a fermentação Ale e Lager dos mostos;
- Analisar a produção de etanol e glicerol com os diferentes tipos de fermentação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os experimentos foram realizados nos laboratórios dos cursos de Biotecnologia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Campus Patos de Minas – Minas Gerais.

Para o preparo de 10 L de mosto foram utilizados 3,250 Kg de malte, composto por 2,750 Kg de malte pilsen, e 250 g de blond malte e 250 g de malte de trigo. Todos os grãos foram moídos e misturados. A moagem dos grãos é uma etapa necessária para aumentar a superfície de contato, ocorrendo antes do processo de mosturação. Foram utilizados também 17,5 g de lúpulo, sendo 5 g do lúpulo aromático Saaz (2,87% AA) e 12,5 g do lúpulo de amargor Nugget (12,5% AA). As fermentações das cervejas Ale e Lager foram realizadas por meio da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (SafAle T 58 - Fermentis).

Utilizou-se o processo de fabricação da cerveja conhecido como metodologia BIAB (Brew In A Bag). 20% da água utilizada durante a brassagem, fervura e lavagem é perdida, portanto, foram utilizados 13 litros de água em pH 7,22 com o intuito do resultado final ser próximo a 10 litros de cerveja (BREW BLOG, 2019).

Utilizou-se um caldeirão com capacidade para 15 litros, saco voal, colher de plástico, termômetro de imersão, fogão industrial de alta pressão, bomba à vácuo e recipiente para auxiliar no resfriamento do mosto.

4.2 Metodologias

4.2.1 Brassagem, filtração e fervura do mosto

Os 13 litros de água utilizados no total foram adicionados ao caldeirão juntamente com os grãos de malte pilsen, blond e de trigo já triturados e moídos. A etapa de mosturação foi realizada inicialmente mantendo a temperatura em 62°C durante 1 hora, para a ação da beta-amilase, evitando passar dos 65°C. Ao longo da etapa, pequenas amostras eram retiradas para avaliar a quantidade de amido presente no caldo por meio do teste de iodo, teste indicativo que permite visualizar a presença ou não de amido no mosto, apresentado na Figura 2. Para finalizar a etapa elevou-se a temperatura para 75°C por 5 minutos, para inativação das enzimas, não ultrapassando os 80°C, evitando a presença de tanino na mistura.

Figura 2: Teste de iodo para quantificação visual do amido.



Para realizar a filtração, retirou-se as cascas e resíduos de malte erguendo saco voal contendo os grãos do malte e suas cascas para que todo o caldo permanecesse no caldeirão e escorresse de volta para o mesmo. Após o preparo do mosto iniciou-se a etapa de fervura que durou 60 min. Após os 10 minutos de fervura, o lúpulo Nugget foi adicionado afim de dar ao mosto características como o tradicional amargor desejado na bebida e em 50 minutos de fervura adicionou-se o lúpulo aromático Saaz, além de 125 g de açúcar mascavo.

A etapa de resfriamento, importante para conseguir o mosto a temperatura ambiente, foi realizada utilizando uma bomba a vácuo para a recirculação do fluido, gerando troca térmica com os grãos de malte e gelo gel em contato com as paredes do caldeirão.

Por fim, o mosto foi transferido para os Erlenmeyers onde ocorreram as fermentações. Para a etapa de fermentação foram utilizados 3 Erlenmeyer de 250 mL adaptados preenchidos com 225 mL de mosto e contendo 0,13 g de fermento, apresentados na Figura 3 Nas fermentações Lager a temperatura foi mantida em 10°C e nas fermentações Ale a temperatura foi mantida em 20°C, todas na incubadora BOD.

Figura 3 – Estruturas adaptadas para fermentação das cervejas ALE e LAGER. Ligado aos Erlenmeyers contendo o mosto estão tubos conectados a garrafas de água, permitindo a saída de CO₂ do sistema fermentativo, bem como impedindo a entrada de O₂.

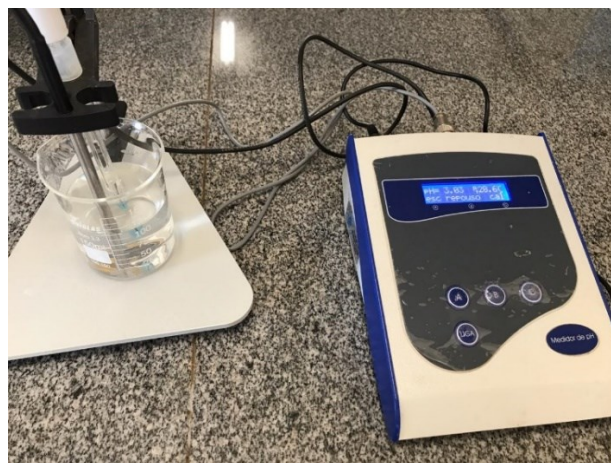


Fonte: Autor (2019)

4.2.2 Determinação do pH

A análise do pH foi realizada por um pHmetro como mostrado na Figura 4, possibilitando uma rápida e adequada medida do pH (IAL, 2008). O acompanhamento do pH foi realizado na água utilizada na etapa de brassagem, após a adição do malte e ao final da fervura.

Figura 4 – pHmetro utilizado para as leituras de pH na pesquisa.



Fonte: Autor (2019)

4.2.3 Determinação da Densidade

A densidade do mosto fabricado foi medida por meio de um densímetro, instrumento de vidro que possui escala numérica interna. Com uma proveta preenchida de mosto, colocou-se o equipamento dentro da solução para avaliar, por meio da força de empuxo qual seria o valor apontado.

4.2.4 Viabilidade celular

As amostras foram retiradas do reator diariamente e diluídas com solução 5 mM de EDTA em Tampão Citrato pH 3, mantidas nestas condições por 30 minutos para desfloculação das células, para possibilitar a contagem das mesmas em Câmara de Neubauer (MATSUMOTO et al., 2002). Para a realização das leituras em Câmara de Neubauer as amostras eram diluídas 100 vezes com tampão citrato com EDTA. Cada balão era agitado de 10 em 10 minutos por 30 minutos, tempo necessário para acontecer a desfloculação e início da contagem (Figura 5).

O tampão citrato foi obtido preparando as soluções A e B: a solução (A): Pesou-se 21,0 g de ácido cítrico em um bécker utilizando uma balança analítica e posteriormente foi diluído em 1 litro de água destilada. Para a solução (B), foram pesados 31,328 g de Citrato de Sódio Diidratado e foi diluído em 1 litro de água destilada assim como a solução A. Após o preparo de ambas as soluções, para produzir 100 mL de tampão foram necessários 46,5 mL da solução A e 3,5 mL da solução B, os outros 50 mL foram preenchidos com água destilada. Por fim, com o tampão preparado e em pH 3, adicionou-se 0,74448 g de EDTA ao tampão.

As amostras pertencentes à cerveja Ale foram analisadas todos os dias durante os seus 7 dias de fermentação e da cerveja Lager realizou-se as análises a cada 2 dias de fermentação, totalizando 7 contagens ao longo de seus 14 dias de fermentação.

Figura 5 – Materiais utilizados para preparar as amostras para a contagem de células. Nos balões foram realizadas as diluições de 100 vezes e no béquer se acrescentava o corante azul de metileno.



Fonte: Autor (2019)

O corante azul de metileno é utilizado para facilitar a visualização das células e para a distinção entre leveduras mortas e vivas como mostrado na Figura 7, as células coradas estão mortas e as células onde o corante não consegue penetrar estão ativas metabolicamente.

O cálculo realizado para determinar a quantidade de células por mL é apresentado na Equação 1, onde C1 e C2 correspondem aos retângulos no centro da placa.

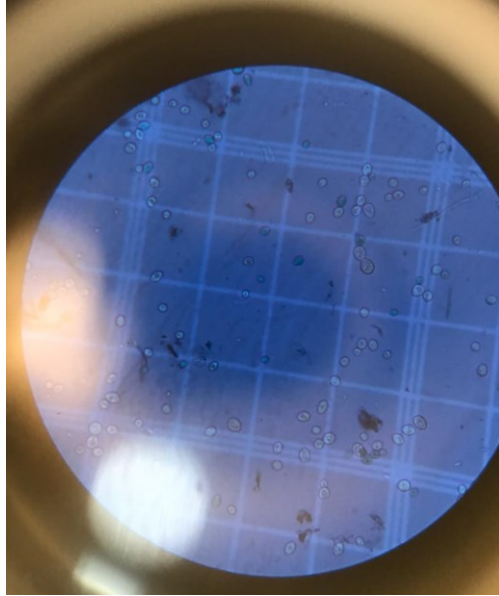
$$\text{Cél/mL} = ((C1+C2)/2) \times 2,5 \times 10^5 \times \text{Diluição} \quad (1).$$

Figura 6 – de Câmara de Neubauer, semelhante a utilizada no presente trabalho.



Fonte: E-LAB COMMERCE (2019)

Figura 7 – Câmara de Neubauer contendo amostra sendo visualizada em microscópio óptico em aumento de 40X. As células transparentes são células vivas, enquanto as coradas com o azul de metileno são células mortas.



Fonte: Autor (2019)

4.2.5 Análise das concentrações de açúcares e álcool

As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos com o objetivo de separar o material mais denso do menos denso (Figura 8). O centrifugador utilizado ao longo do estudo foi o NEOFUGE 15R que apresenta características como sistema de detecção automático de desequilíbrio, capacidade para até 16000 rpm e controle térmico entre -10 a 40 graus celsius (MEDICAL EXPO).

As concentrações de açúcares (glicose, frutose e maltose), etanol e glicerol foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em todos os experimentos. O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. A amostra foi diluída, filtrada e injetada no sistema cromatográfico, marca Shimadzu, coluna HI-PLEX Ca, na qual os componentes são separados e detectados por refração de luz. A solução de arraste utilizada foi água deionizada, o fluxo de bomba 0,5 mL/min, temperatura do forno de 80°C e volume de injeção de 20 microlitros.

Figura 8 – Amostra centrifugada.



Fonte: Autor (2019).

Figura 9 – Cromatógrafo Líquido utilizado para leitura das amostras.



Fonte: Autor (2019).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do pH durante a mosturação

Durante a fabricação da cerveja são esperadas pequenas alterações no valor medido de acordo com a etapa, fervura do mosto, fermentação e até mesmo a maturação. O mosto cervejeiro apresenta boas capacidades tamponantes, evitando que grandes alterações ocorram durante a produção da bebida (LI et al, 2015).

Neste estudo, o pH da água utilizada estava 7,22 a 28°C, temperatura ambiente. Uma vez adicionado o malte, o valor sofreu uma queda de 1,02 atingindo valor de pH igual a 6,20 na temperatura de 30,5°C e durante a fervura do mosto, alcançou-se o valor mais baixo medido, 5,75 estabilizando para 5,85 ao final da fervura. Esse valor estava adequado para a produção de cervejas de baixa gravidade que apresentam valores entre 5,5-6 e não muito distante dos valores ideais para as principais enzimas (LI et al, 2015). Determinar o valor de pH ao longo de cada etapa proporciona parâmetros preliminares do resultado final. Pouco se avalia o pH durante a brassagem dos grãos e mosto cervejeiro. Essa negligência impede correções e que remediações sejam feitas a tempo de evitar maiores problemas ao longo da cadeia de produção como por exemplo a atividade enzimática das β -amilase e α -amilase que possuem pH ótimo entre os valores de 5,2 e 5,5 respectivamente. Em outras etapas como a fervura, o valor de pH serve como parâmetro para avaliar a preservação de substâncias responsáveis pelo amargor que de acordo com a literatura apresentam valores ótimos entre 5,1-5,2 (BAMFORTH, 2001).

5.2 Densidade do mosto

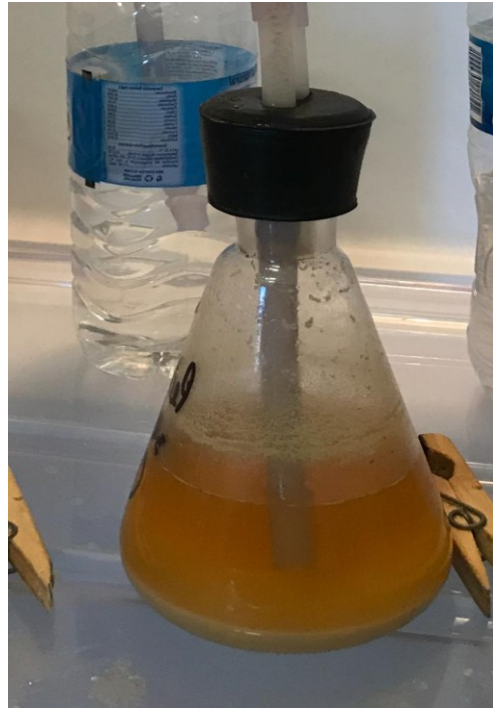
Ao final do preparo do mosto a densidade obtida foi de 1,085 g/cm³. Dado importante para o cálculo de açúcares presentes no mosto primitivo da cerveja e utilizado como marco inicial da produção antes da fermentação ter início.

5.3 Análise do processo fermentativo

Durante a etapa de fermentação das cervejas notou-se uma rápida sedimentação ao fundo dos reatores em ambos os estilos de fermentação Ale e Lager. Sabe-se por meio da literatura que a floculação prematura faz com que o rendimento na conversão do açúcar em etanol caia, gerando cervejas com maiores quantidades de açúcares não fermentados e outras substâncias indesejáveis para o consumo como as causadoras de off-flavors já que as leveduras possuem menor contato com a composição do mosto estando rodeadas de outras células (SUHRE, 2014). Uma das características mais importantes para a indústria em termos econômicos e de padronização da produção é a capacidade que as leveduras apresentam para flocular. Uma vez sedimentadas é possível removê-las com maior facilidade do reator para preservação e reutilização em futuras fermentações. A floculação é um evento facilmente identificado por aglomerar milhões de células e pode ocorrer em variados valores de pH e temperatura. É esperado que leveduras tipicamente utilizadas para fermentações Lager sedimentem no fundo do reator e leveduras Ale permaneçam em suspensão (CALLEJA,1993; BASSO, 2019). Na Figura 10 é possível observar as leveduras sedimentadas nos processos de fermentação das

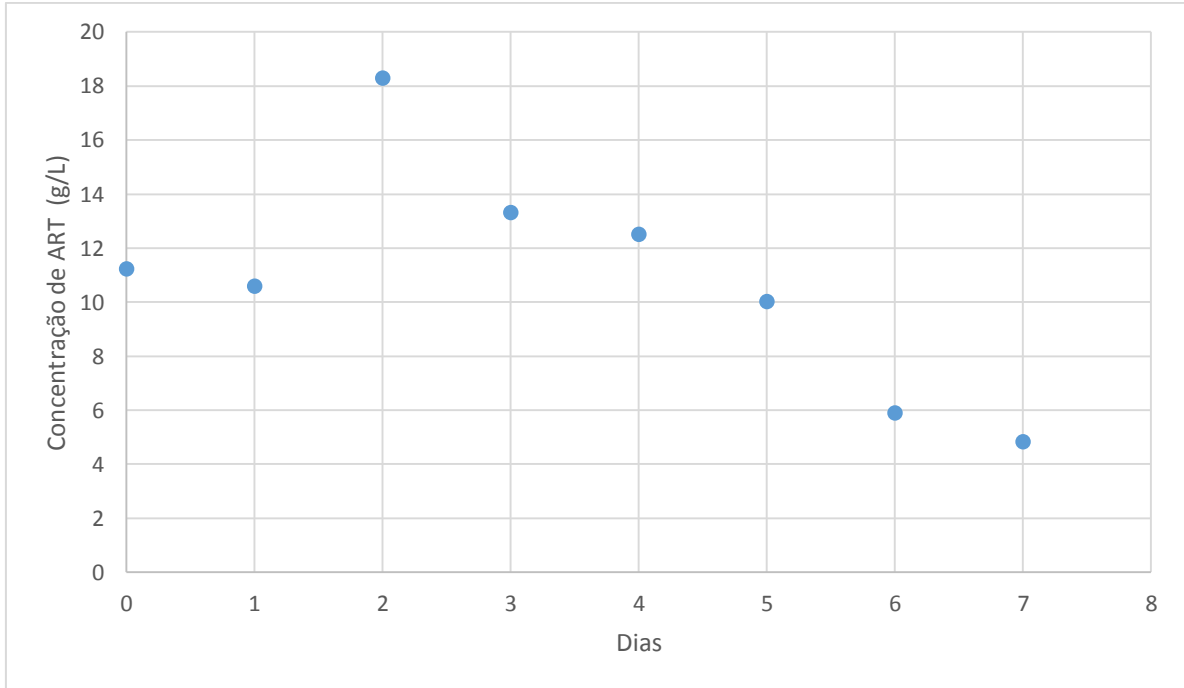
cervejas Ale e Lager. As análises de açúcares redutores, álcoois e concentração celular durante o processo de fermentação Ale são apresentados nas Figuras 11, 12 e 13 respectivamente.

Figura 10 – Imagem aproximada do sistema de fermentação. Nela, é possível visualizar uma camada clara ao fundo do Erlenmeyer, sendo esta camada as leveduras floculadas.



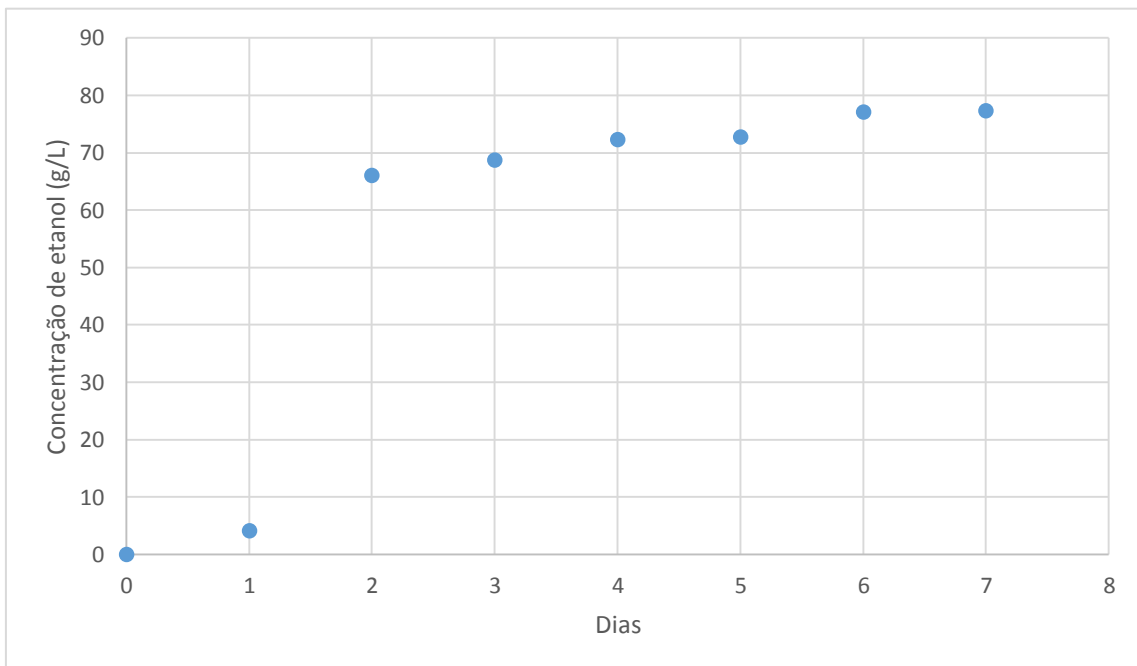
Fonte: Autor (2019).

Figura 11 – Concentração dos Açúcares Redutores Totais (ART) presentes ao longo da fermentação da cerveja do tipo ALE. O teor de ART em g/L em cada dia foi obtido através da leitura por HPLC.



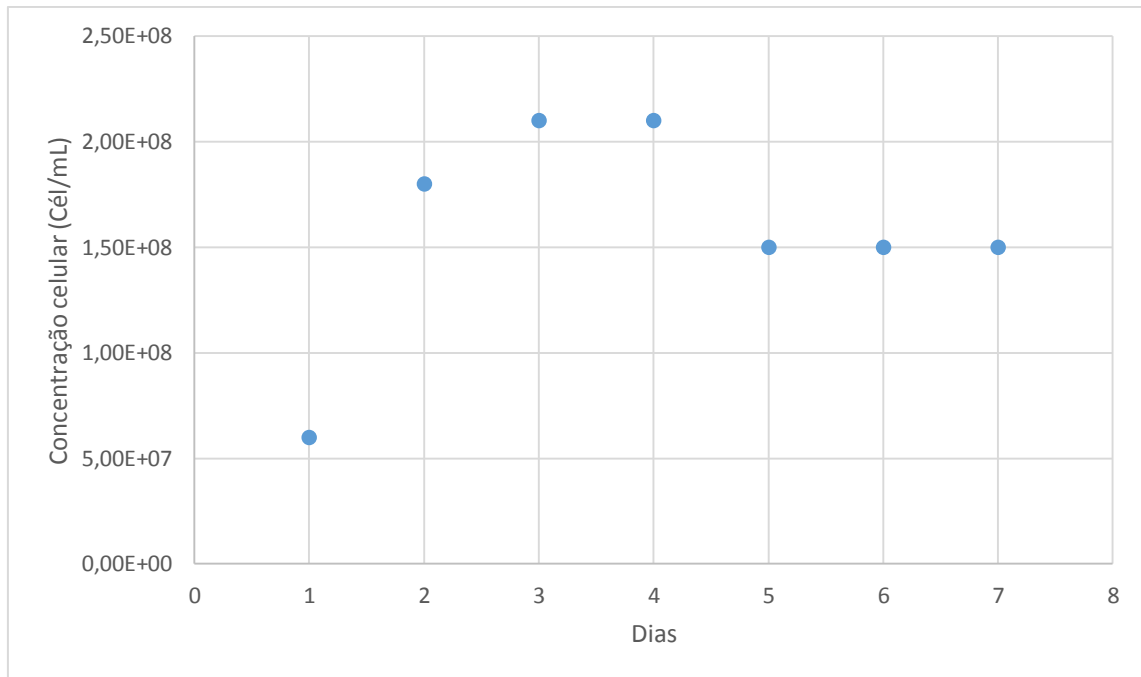
Fonte: Autor (2019).

Figura 12 – Concentração de Etanol produzido ao longo da fermentação da cerveja do tipo ALE. O teor de etanol em g/L em cada dia foi obtido através da leitura por HPLC.



Fonte: Autor (2019).

Figura 13 – Viabilidade celular das leveduras ao longo da fermentação da cerveja do tipo ALE. A concentração de células (células por mL) foi quantificada através da contagem na câmara de Neubauer usando azul de metileno como corante.



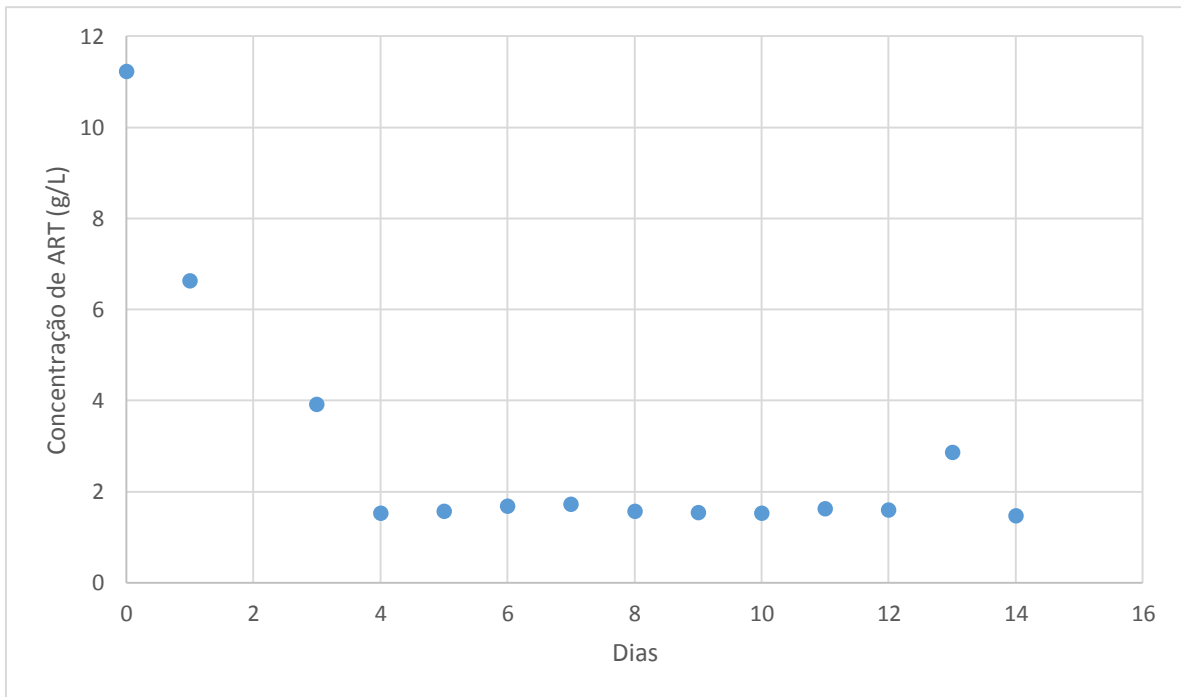
Fonte: Autor (2019).

O valor analisado no 1º dia de fermentação acredita-se ser decorrente de erro experimental, pois uma vez inativadas as enzimas não realizariam a hidrólise dos açúcares. A partir do 2º dia de fermentação observa-se um perfil de consumo de substrato atingindo 5 g/L ao final do 7º dia de fermentação.

A produção de etanol foi intensa nas primeiras 48 horas de fermentação atingindo 67 g/L de etanol, e então, manteve-se uma produção crescente, porém menos acentuada, até o fim da etapa de fermentação, alcançando 77 g/L de etanol no final do 7º dia.

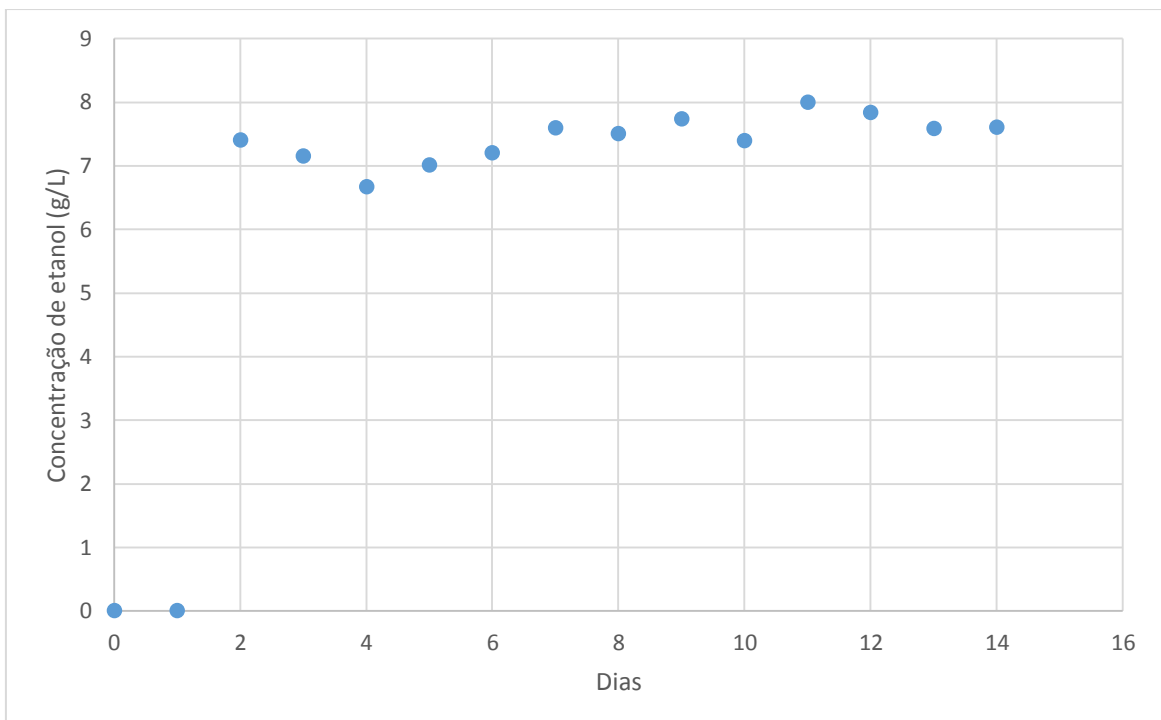
A concentração celular de *Saccharomyces cerevisiaena* cerveja ale cresceu até metade da etapa de fermentação, atingindo pico de $2,1 \cdot 10^8$ células/mL e depois estabilizou-se até o fim do processo, comportamento esperado de leveduras no fim de fermentações com a fase estacionária. As análises de açúcares redutores, álcoois e concentração celular durante o processo de fermentação LAGER são apresentados nas **Figuras 14, 15 e 16**, respectivamente.

Figura 14 – Concentração dos Açúcares Redutores Totais (ART) presentes ao longo da fermentação da cerveja do tipo LAGER. O teor de ART em g/L em cada dia foi obtido através da leitura por HPLC.



Fonte: Autor (2019).

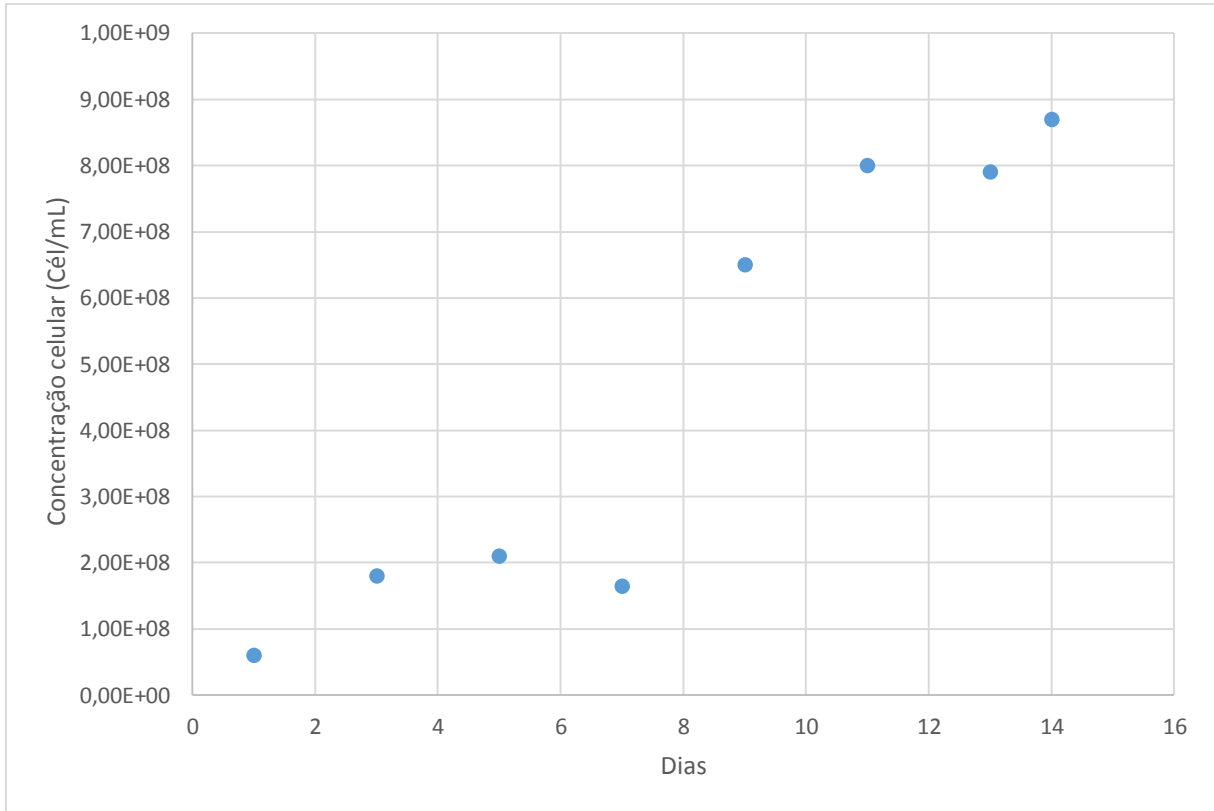
Figura 15 -Concentração dos de Etanol produzido ao longo da fermentação da cerveja do tipo LAGER. O teor de etanol em g/L em cada dia foi obtido através da leitura por HPLC.



Fonte: Autor (2019).

Figura 16 – Viabilidade celular das leveduras ao longo da fermentação da cerveja do tipo LAGER. A

concentração de células (células por mL) foi quantificada através da contagem na câmara de Neubauer usando azul de metileno como corante.



Fonte: Autor (2019).

Observando as análises obtidas durante a fermentação da cerveja Lager, pode-se notar um consumo muito intenso dos açúcares redutores presentes no mosto, com os mesmos atingindo concentrações de 1,52 g/L já no quarto dia de fermentação e as fermentações a baixas temperaturas durando em média 14 dias.

O número de células foi alto ao longo da fermentação nos reatores Lager, atingindo concentrações de $8,7 \cdot 10^8$ cél/mL, sendo bem superior ao atingido na fermentação tipo Ale. As concentrações de etanol obtidas foram baixas e manteve o valor próximo a 7,99 g/L de etanol a partir do 2º dia de fermentação, o que indica uma fermentação irrisória. Resultado este que indica que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* SafAle T 58 específica para a produção de cervejas tipo Ale com fermentações a altas temperaturas não conseguiu fermentar em condições a baixa temperatura.

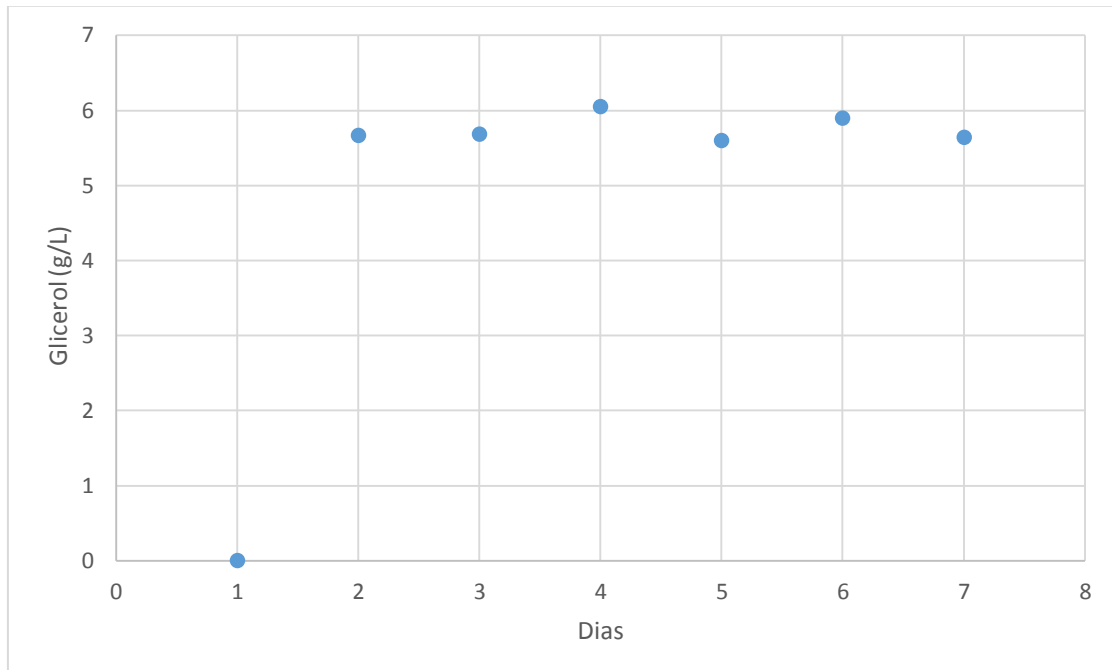
Por meio do gráfico é possível observar que em condições típicas de fermentação Lager, a levedura T58 não foi capaz de fermentar os açúcares para a síntese de etanol, observando concentrações muito inferiores às obtidas na cerveja Ale. Essas análises levam a crer que as leveduras utilizaram os carboidratos como fonte energética para outras vias metabólicas e funções fisiológicas como a reprodução (LEI, 2016).

A viabilidade celular é um dado muito importante na avaliação final do processo de fabricação cervejeiro. Por meio dessa análise pode-se obter resultados preliminares correspondentes ao possível rendimento alcoólico, consumo e uso de nutrientes disponíveis, carboidratos fermentados, além de ser um indicativo das condições as quais se realizou o experimento.

5.4 Produção de glicerol durante a fermentação

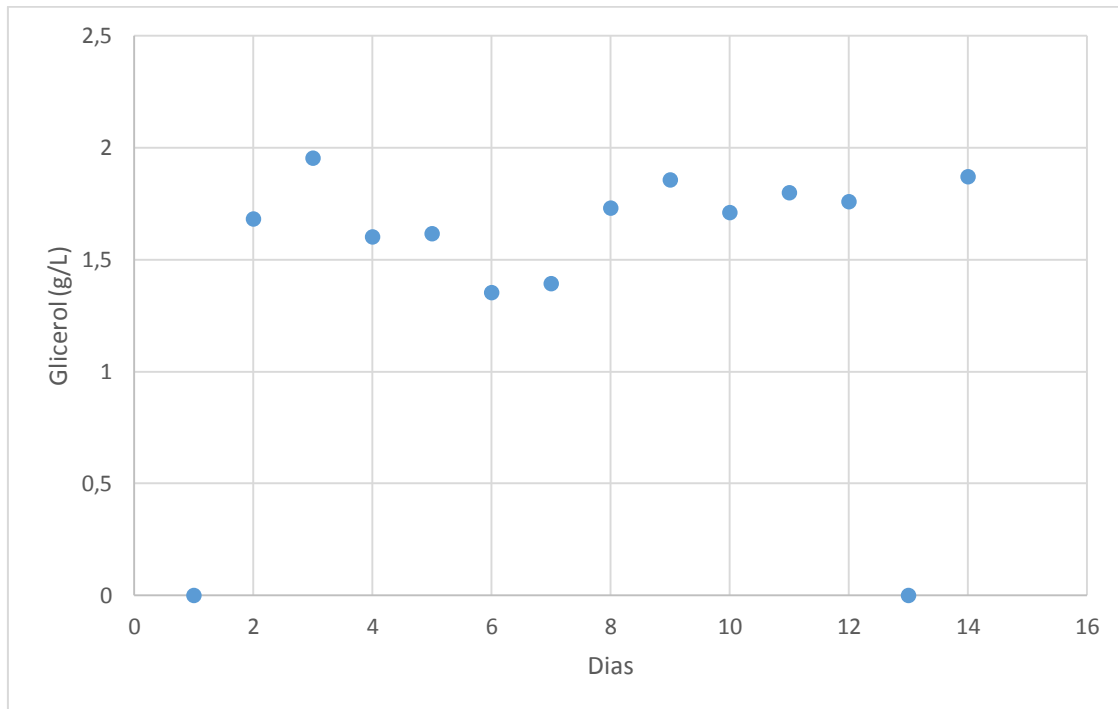
Durante análises realizadas para as cervejas Ale e Lager foram analisadas as concentrações de glicerol ao longo da etapa de fermentação mostradas respectivamente pelas Figuras 17 e 18.

Figura 17 - Concentração de Glicerol produzido ao longo da fermentação da cerveja do tipo ALE. O teor de glicerol em g/L em cada dia foi obtido através da leitura por HPLC.



Fonte: Autor (2019)

Figura 18 - Concentração de Glicerol produzido ao longo da fermentação da cerveja do tipo LAGER. O teor de glicerol em g/L em cada dia foi obtido através da leitura por HPLC.



Fonte: Autor (2019)

Comparando os dois tipos de fermentação, observa-se valores bem mais altos na produção de cerveja Ale do que na produção de cerveja Lager, mais um indício que a levedura não foi capaz de fermentar em baixas temperaturas, já que a espécie da levedura foi específica para fermentação a temperaturas mais elevadas. Ao longo da fermentação da cerveja Ale percebe-se um pico no dia 4, com concentração lida em 6,049 g/L de glicerol enquanto a média geral ao longo da fermentação foi de 4,93 g/L. Com a cerveja Lager, as concentrações de glicerol apresentou um pico no terceiro dia apresentando 1,95 g/L e uma média geral de 1,45 g/L ao longo dos 14 dias de fermentação.

Zhao (2015) cita em seu trabalho uma discordância entre dois outros trabalhos que atestam limites médios de glicerol em cervejas variando de 1-3 g/L à 10 g/L e obtém em seu trabalho por meio de otimizações para a produção de glicerol concentrações de até 8,7 g/L.

Altas concentrações de glicerol também podem ser justificadas pela ocorrência de fermentação em meios de pH maiores do que 4, que favorecem a viabilidade celular e consequentemente a produção de glicerol. Outro fator que favorece a produção de glicerol é a

temperatura em que a fermentação ocorre, temperaturas elevadas fazem com que as leveduras fiquem susceptíveis à toxicidade causada pelo etanol, levando à vias metabólicas secundárias produtoras de glicerol (FAVONI, 2018)

Desta forma, a elevada concentração de glicerol na cerveja Ale quando comparada com a leitura do reator Lager pode ter sido consequência da alta síntese de etanol obtida ao longo da fermentação aliada ao pH de valor superior a 5 do mosto utilizado no experimento.

6. CONCLUSÃO

As análises realizadas revelam que o desempenho da levedura T58 em condições típicas de fermentação Ale ocorreu de maneira natural. A levedura foi capaz de realizar a síntese de etanol através da fermentação dos açúcares atingindo concentrações típicas de crescimento celular ao passo que produziu alta concentração de etanol e glicerol.

A fração do experimento realizada sob condições de fermentação Lager não apresentou desempenho satisfatório e viável para a produção de cerveja, os açúcares foram rapidamente consumidos sem resultar na síntese de etanol. Observou-se a tendência do fermento T58 em priorizar o crescimento celular e não a síntese de produtos como CO₂, glicerol e etanol.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Acompanhar o processo fermentativo nos dois primeiros dias de 6 em 6 horas.
2. Fazer massa seca das células para comparar com as análises com a Câmara de Neubauer
3. Fazer análise por DNS para acompanhar os ART.
4. Tirar pontos durante a mosturação para verificar a ação das enzimas
5. Quantificar os esteres pelo CG durante as etapas de maturação.

REFERÊNCIAS

AGEITEC. **Glicerol**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1mqgo602wyiv802hvm3j818huet.html> . Acesso em: 18 nov. 2019.

ALEXANDRINO, Natalia. **Melhoramento de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa**. Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Basso. 2012. 102 p. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2012. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-20092012-084510/pt-br.php>. Acesso em: 30 out. 2019.

ALMEIDA e SILVA, J. B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO W. G. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. P. 347 – 378 p.

Anderson, H. E., Santos, I. C., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. (2019). A Review of the Analytical Methods used for Beer Ingredient and Finished Product Analysis and Quality Control. *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2019.07.061

ANGELONI, Luís Henrique Poletto. **Cerveja envelhecida em barril de madeira, aspectos químicos e microbiológicos**. Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Alcarde. 2016. 95 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2016. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-03022016-155528/pt-br.php>. Acesso em: 27 out. 2019.

BAMFORTH, Charles W.. PH in Brewing: An Overview. **Technical Quarterly**, Department of Food Science & Technology, University of California, Davis, CA, USA., v. 38, n. 1, p. 1-9, fev./2001.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. **Yeast**, 2010, v. 16, p. 755-771.

BASSO, Rafael Felipe. **Caracterização de leveduras não convencionais para produção de cervejas**. Orientador: Sandra Helena da Cruz. 2019. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2019. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-04092019-104704/pt-br.php>. Acesso em: 10 nov. 2019.

Bogdan, P., & Kordialik-Bogacka, E. (2017). Alternatives to malt in brewing. *Trends in Food Science & Technology*, 65, 1–9. doi:10.1016/j.tifs.2017.05.001

BREWBLOG. **Fazendo cerveja caseira através de BIAB**. Disponível em: <https://www.lamasbrewshop.com.br/blog/2018/06/fazendo-cerveja-caseira-atraves-de-biab.html> . Acesso em: 19 out. 2019.

CALLEJA, Gode B.. Hooks, loops, and the shallow minimum: mechanistic aspects of yeast flocculation . **Elsevier Science** : subtítulo da revista, D&man Institut. P-9 Dalan Races, Area 14, UP Campus. Diliman. Lunsod Quezon, Philippines , v. 2, n. 2, p. 133-149, jun./1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0927776594800286>. Acesso em: 4 nov. 2019.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1 parte – as leveduras. **Revista analytica**, São Paulo, v. 25, p. 36-42, out/nov 2006.

CASTRO, Orerves Martínez. **Obtenção de cerveja super concentrada com a utilização de xarope de milho com adjunto de malte**. Orientador: João Batista de Almeida e Silva. 2014. 149 p. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul Departamento de Biociências Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Lorena, 2014. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-24072014-151004/pt-br.php>. Acesso em: 20 out. 2019.

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. **Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo Prominence, marca SHIMADZU**. Disponível em: http://www.ccs.ufes.br/sites/ccs.ufes.br/files/equipamentos_labiom.pdf . Acesso em: 30 out. 2019.

CERVIERI JÚNIOR, Osmar e colab. O setor de bebidas no Brasil. *BNDS Setorial*, n. 40, p. 93–130, 2014. Disponível em: <[https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/3462/1/BS40 O setor de bebidas no Brasil_P.pdf](https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/3462/1/BS40%20O%20setor%20de%20bebidas%20no%20Brasil_P.pdf)>.

CONCERVEJA. **Diacetil ? Série Off Flavors (Falhas na Cerveja)**. Disponível em: <https://concerveja.com.br/diacetil/> . Acesso em: 27 out. 2019.

Deák, T., 2008. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, second ed. CRC Press, USA. du Toit, M., Pretorius, I.S., 2000. **Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons form**

nature's own arsenal — a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21, 74–96.

DOCPLAYER. **CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA E SUA INFLUÊNCIA SENSORIAL PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL**. Disponível em: <https://docplayer.com.br/65054448-Characterizacao-da-agua-e-sua-influencia-sensorial-para-producao-de-cerveja-artesanal.html> . Acesso em: 15 out. 2019.

DURELLO, Renato da Silva. **Química do sabor de cervejas**: detalhes moleculares de lúpulos (*Humulus lupulus*) cultivados no Brasil no processo cervejeiro. Orientador: Stanislau Bogusz Junior. 2019. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2019. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-03072019-104531/en.php>. Acesso em: 4 nov. 2019.

E-LAB COMMERCE. **Câmara Neubauer - Dupla Melhorada**. Disponível em: <https://e-labcommerce.com/camara-neubauer-dupla-melhorada>. Acesso em: 25 nov. 2019.

EMBRAPA. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da cevada**. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do139.htm. Acesso em: 4 set. 2019.

FALTERMAIER, A., Waters, D., Becker, T., Arendt, E., & Gastl, M. (2014). Common wheat (*Triticum aestivum*L.) and its use as a brewing cereal - a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(1), 1–15. doi:10.1002/jib.107

FILLAUDEAU, L.; Blanpain-Avet, P.; Daufin, G. Water, Wastewater and Waste Management in Brewing Industries. *J. Clean. Prod.* 2006, 14, 463-471.

flocculation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2(1-3), 133–149. doi:10.1016/0927-7765(94)80028-6

FONTOURA, C. R. D. O. *et al.* Uso do simulador de processos no estudo da engenharia química: uma aplicação no processo de produção de cerveja. **Brazilian Journal of Development**: subtítulo da revista, Av. Expedicionário Oswaldo de Almeida Ramos, nº 280 – Centro, Vassouras – RJ, Brasil, v. 5, n. 8, p. 11724-11745, ago./2019. Disponível em: <http://www.brjd.com.br/index.php/BRJD/article/view/2745/2731> . Acesso em: 27 out. 2019.

Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J. L., Maere, S., Verstrepen, K. J., & Steensels, J. (2018). Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 148–155. doi:10.1016/j.copbio.2017.08.005

Giovani Brandão Mafrá De; SILVA, Camila Vieira Bento E João Batista De Almeida E. ELEMENTOS BIOTECNOLÓGICOS FUNDAMENTAIS NO PROCESSO CERVEJEIRO: 1º PARTE – AS LEVEDURAS. **Revista Analytica**, n. 25, out./nov. 2006.

GÓES-FAVONI, S. P.; MONTEIRO, A . C. C.; DORTA, C.; CRIPPA, M. G.; SHIGEMATSU, E.. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. *Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais*, v.9, n.4, p.285-296, 2018. DOI:<http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2018.004.0023>

Harrison, M. A., & Albanese, J. B. (2017). *Beer/Brewing ☆. Reference Module in Life Sciences*. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.13014-6 HUGHES, G. **Cerveja Feita em Casa**. [S. l.]: Publifolha, 2014.

JÚNIOR, Sérgio Luiz Alves. **Genômica do metabolismo de maltotriose em *Saccharomyces cerevisiae***: o papel determinante do gene AGT1. Orientador: Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk. 2010. 135 p. Tese (Doutor em Biotecnologia) - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, São Paulo, 2010.

JUSBRASIL. **As Leis Da Cerveja Artesanal No Brasil**. Disponível em: <https://mazzara.jusbrasil.com.br/artigos/549058900/as-leis-da-cerveja-artesanal-no-brasil> . Acesso em: 10 nov. 2019.

Karabín, M., Jelínek, L., Kotrba, P., Cejnar, R., & Dostálek, P. (2018). Enhancing the performance of brewing yeasts. *Biotechnology Advances*, 36(3), 691–706. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.014

KISHIMOTO, T. *et al.* Analysis of Hop-Derived Terpenoids in Beer and Evaluation of Their Behavior Using the Stir Bar–Sorptive Extraction Method with GC-MS: subtítulo do artigo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**: subtítulo da revista, Brewing Research and Development Laboratory, Asahi Breweries Ltd., 1-21, Midori 1-chome, Moriya-shi, Ibaraki, 302-0106, Japan, v. 53, n. 12, p. 4701-4707, abr./2005.

Lei, H., Xu, H., Feng, L., Yu, Z., Zhao, H., & Zhao, M. (2016). Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(5), 583–588. doi:10.1016/j.jbiosc.2016.05.004

LEME, ALEXANDRE MONTAGNANA VICENTE. **EFEITO DE DIFERENTES LEVEDURAS E CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO NO AMARGOR DA CERVEJA**. Orientador: Flavio Luís Schmidt. 2017. 73 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas,

Campinas, 2017. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/330829>. Acesso em: 23 out. 2019.

Li, H., Liu, F., Kang, L., & Zheng, M. (2015). *Study on the buffering capacity of wort*. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(1), 138–142. doi:10.1002/jib.286

LIMA, Muriel Santos de. **Características do mercado cervejeiro no Brasil e a importância da propaganda na decisão de compra dos consumidores**. Orientador: Maria Carolina Azevedo Ferreira de Souza. 2014. 80 p. Tese (Bacharel) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE ECONOMIA, Campinas, 2014. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?view=000944450>. Acesso em: 26 set. 2019.

Livens, S. (2016). *Beer: Fermentation*. *Encyclopedia of Food and Health*, 339–344. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00059-3

MATSUMOTO, T. *et al.* Construction of Yeast Strains with High Cell Surface Lipase Activity by Using Novel Display Systems Based on the Flo1p Flocculation Functional Domain: subtítulo do artigo. **Applied and Environmental Microbiology**: subtítulo da revista, Local, v. 68, n. 9, p. 1-7, dez./2005. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/68/9/4517#ref-list-1>. Acesso em: 15 set. 2019.

MEDICAL EXPO. **CENTRÍFUGA DE LABORATÓRIO / DE BANCADA / AUTOMÁTICA / DE CAÇAMBA MÓVEL**. Disponível em: <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/heal-force/product-69536-501360.html> . Acesso em: 10 nov. 2019.

MENDES, D. **Curso básico de elaboração de cervejas artesanais**, Frei Tuck, 2006.

Monerawela, C., & Bond, U. (2017). Brewing up a storm: The genomes of lager yeasts and how they evolved. *Biotechnology Advances*, 35(4), 512–519. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.03.003

MORADO, R. **Larousse da Cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009

OLIVEIRA, A. S. P. *et al.* **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**: 1 edição digital. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. p. 103-104. OLIVEIRA, A. S. P. *et al.* **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**: 1 edição digital. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. p. 103-104. 3-104.

PALMER, C. K. A. J. **Water: A Comprehensive Guide for Brewers**. 1. ed. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2013. p. 96-127.

PINTO, MARIANA BARRETO CARVALHAL. **ISOMERIZAÇÃO DE ÁCIDOS AMARGOS DE LÚPULO CASCADE CULTIVADO NO BRASIL E SEU DESEMPENHO DURANTE A FERMENTAÇÃO DA CERVEJA**. Orientador: Flávio Luis Schmidt. 2018. 82 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2018.

PUTMAN, R. (2018). What goes around comes around. The rise and fall and rise gain of continuous brewery operations. *Brewer and Distiller International*, 14, 42e50.

SAKAMOTO, K.; MARGOLLES, A.; VAN VEEN, H. W.; KONINGS, W. N. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter. *Journal of Bacteriology*, 2001, v.183, p. 5371-5375.

SAMI, A.; IKEDA, M.; YABUUCHI, A. S. Evaluation of the Alkaline Methylene Blue Staining Method for Yeast Activity Determination. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1994, v. 78, p. 212-216.

SANTOS, S. **Os primórdios da cerveja no Brasil**. 2 ED. Cotia, SP: Atêlie Editorial, 2004.

SCHLENK, F. Early research on fermentation – a story of missed opportunities. *Trends Biochem Sciences*, 1985, v. 10, p. 252-254.

SCIENCE OF BEER. **Os segredos do lúpulo**. Disponível em: <https://www.scienceofbeer.com.br/br/equipe/interna/leonardo-sewald-25>. Acesso em: 18 set. 2019.

SICARD, D.; LEGRAS, J. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies*, 2011, v. 334, p. 229-236.

SORBO, AMANDA CRISTINA ALFREDO CONTRUCCI. **AValiação das Propriedades de uma Cerveja Artesanal Tipo Pilsen Suplementada com Polpa de Maracujá**. Orientador: Prof. Dr. Fernando Broetto. 2017. 64 p. Dissertação (Mestre em Agronomia) - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO", Botucatu, 2017.

SUHRE, Taís. **Controle de qualidade em microcervejarias: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras**. Orientador: Diego Bonatto. 2014. 48 p.

Monografia (Bacharel) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul Departamento de Biociências Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Porto Alegre, 2014. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/109901>. Acesso em: 2 nov. 2019.

THE EPA BLOG. **Good Beer? It's in the Water.** Disponível em: <https://blog.epa.gov/2013/02/07/good-beer-its-in-the-water/> . Acesso em: 7 nov. 2019.

VIDGREN, V.; MULTANEN, J.; ROUHONEN, L.; et al. The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeast. **Yeast Research**, 2010, v. 10, p. 402-411.

Walker, G. M., & Walker, R. S. K. (2018). Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Advances in Applied Microbiology*. doi:10.1016/bs.aams.2018.05.003.

WALKER, GM. Yeast Technology. In: **Yeast Physiology and Biotechnology** (ed. John Wiley & Sons), pp. 265-320, Wiley, Scotland, 2000.

Weiss, K., Kroschewski, B., & Auerbach, H. (2016). *Effects of air exposure, temperature and additives on fermentation characteristics, yeast count, aerobic stability and volatile organic compounds in corn silage. Journal of Dairy Science*, 99(10), 8053–8069. doi:10.3168/jds.2015-10323.

ZARNKOW, M. (2014). *Beer. Encyclopedia of Food Microbiology*, 209–215. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00393-1.

Zhao, X., Procopio, S., & Becker, T. (2015). **Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review.** *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7588–7598. doi:10.1007/s13197-015-1977-y.

ZSCHOERPER, Otto; REBELO, Rodolfo. **Elaboração de malte de cevada cervejeira e adjuntos.** <https://www.cervejaemalte.com.br/cursos>, 22 fev. 2014. Disponível em: <https://www.cervejaemalte.com.br/>. Acesso em: 25 set. 2019.