



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Onildo Ribeiro Lima

**Avaliação de leveduras viáveis e não viáveis em diferentes fases da
fermentação no processo de produção de cerveja.**

São José do Rio Preto
2024

Onildo Ribeiro Lima

Avaliação de leveduras viáveis e não viáveis em diferentes fases da fermentação no processo de produção de cerveja.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPQ – Proc.: 161832/2021-0

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Lorencini
Schuina

São José do Rio Preto
2024

L732a

Lima, Onildo Ribeiro

Avaliação de leveduras viáveis e não viáveis em diferentes fases da fermentação no processo de produção de cerveja /

Onildo Ribeiro Lima. -- São José do Rio Preto, 2024

107 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi

Coorientador: Guilherme Lorencini Schuina

1. Leveduras. 2. Sobrevivência celular. 3. Microbiologia. 4.

Fermentação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Onildo Ribeiro Lima

Avaliação de leveduras viáveis e não viáveis e diferentes fases da fermentação no processo de produção de cerveja.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPQ – Proc.: 161832/2021-0

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a Mariana Damaris de Oliveira
IT’S Foods Consultoria e Assessoria – Marília

Prof^a. Dr^a Adriana Beatriz Giménez
Universidad Nacional de Cuyo – Mendoza, Argentina

São José do Rio Preto
20 de Fevereiro de 2024

*Agradeço a Deus e a todos que
me ajudaram por ter chegado até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter chegado até aqui, foi um caminho difícil, e como sempre com muitos problemas.

Agradeço meu orientador Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, pela ajuda, apoio e paciência, sua ajuda e orientação foram de fundamental importância para este trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Guilherme Lorencini Schuina, sua orientação foi de fundamental importância para este trabalho.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Alimentos por todo o conhecimento transmitido.

Também agradeço ao Dr. Igor Silva de Sá, pela ajuda neste trabalho.

Agradeço a todos que ajudaram e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A presente pesquisa foi realizada com apoio do CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, ao qual agradeço por proporcionar a bolsa de estudos por todo o período desta pesquisa.

*“A lei da mente é implacável.
O que você pensa, você cria;
O que você sente, você atrai;
O que você acredita
torna-se realidade.”*

Buddha

RESUMO

As leveduras são microrganismos que tem um papel muito importante em muitos processos industriais, e a indústria cervejeira é uma delas. As leveduras mais usadas no processo de produção de cerveja são do gênero *saccharomyces*, e o seu uso requer cuidados especiais para que tenha-se o melhor rendimento possível do processo de produção, já que as leveduras influenciam no resultado final da cerveja, não somente em termos de teor alcoólico, mas também agregando aromas e sabores. O objetivo deste estudo é entender melhor a viabilidade e o comportamento das leveduras em fermentação alta e baixa, e para isso foram produzidas cervejas para avaliar a viabilidade celular e o comportamento das leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, que é dito atuar próximo da superfície do mosto, utilizadas em cervejas Ale (alta fermentação), e *Saccharomyces pastorianus*, que é dito atuar no fundo do reator, utilizadas em cervejas Lager (baixa fermentação). Neste estudo foram utilizados dois tipos de reatores: reatores de vidro em pequena escala com 1.5L de capacidade, e reatores em escala piloto com 10L de capacidade. As fermentações foram realizadas em duas temperaturas diferentes, 12 °C e 18 °C. As amostras foram coletadas e analisadas em três diferentes alturas nos reatores (próximo a superfície do mosto, no meio e próximo ao fundo do reator) a cada 24h durante a fermentação, também realizando a caracterização físico-química avaliando sólidos solúveis totais, pH e teor alcoólico. Os resultados mostraram que a levedura de alta fermentação atuou em todo o reator, nas duas temperaturas, e nas três alturas analisadas, a fermentação ocorreu em todo o reator, e não somente na superfície, a quantidade de leveduras viáveis e a quantidade total de células por ml ficaram semelhantes nas duas temperaturas, variando entre 10^6 e 10^7 . Já a levedura de fermentação baixa, atuou na superfície do mosto nos primeiros tempos ou dias de fermentação, precipitando em direção ao fundo a partir do quinto ao sétimo tempo de fermentação, e não se limitando a atuar somente no fundo do reator. A quantidade de leveduras viáveis e a quantidade total de células por ml também variaram entre 10^6 e 10^7 nas duas temperaturas.

Palavras-chave: Leveduras, Viabilidade celular, Microbiologia, Produção de Cerveja, Fermentação alta e baixa.

ABSTRACT

Yeasts are microorganisms that play a very important role in many industrial processes, and the brewing industry is one of them. The yeasts most commonly used in the beer production process are from the *saccharomyces* genus, and their use requires special care to ensure the best possible yield from the production process, since yeasts influence the final result of the beer, not only in terms of alcohol content, but also by adding aromas and flavors. The aim of this study was to better understand the viability and behavior of yeasts in high and low fermentation. To this end, beers were produced to evaluate the cell viability and behavior of yeasts: *Saccharomyces cerevisiae*, which is said to act near the surface of the wort, used in Ale beers (high fermentation), and *Saccharomyces pastorianus*, which is said to act at the bottom of the reactor, used in Lager beers (low fermentation). Two types of reactor were used in this study: small-scale glass reactors with a capacity of 1.5L, and pilot-scale reactors with a capacity of 10L. The fermentations were carried out at two different temperatures, 12 °C and 18 °C. Samples were collected and analyzed at three different heights in the reactors (near the surface of the wort, in the middle and near the bottom of the reactor) every 24 hours during fermentation, also carrying out physicochemical characterization evaluating total soluble solids, pH and alcohol content. The results showed that the top-fermenting yeast acted throughout the reactor, at both temperatures, and at the three heights analyzed, fermentation occurred throughout the reactor, not just on the surface, and the number of viable yeasts and the total number of cells per ml were similar at both temperatures, varying between 10^6 and 10^7 . Low fermentation yeast, on the other hand, acted on the surface of the wort during the first few fermentation times or days, precipitating towards the bottom from the fifth to the seventh fermentation time, and was not limited to acting only on the bottom of the reactor. The number of viable yeasts and the total number of cells per ml also varied between 10^6 and 10^7 at both temperatures.

Keywords: Yeasts, Cell viability, Microbiology, Beer production, High and low fermentation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Grãos de cevada germinados durante a malteação	19
Figura 2	Sequência da reação de Maillard	20
Figura 3	Lúpulo	21
Figura 4	Estrutura química dos principais α -ácidos presentes no lúpulo	22
Figura 5	Fluxograma de processo da produção de cerveja	25
Figura 6	Levedura de alta fermentação <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1) e levedura de baixa fermentação <i>Saccharomyces pastorianus</i> (2)	31
Figura 7	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
Figura 8	Estrutura das leveduras	36
Figura 9	Reprodução da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
Figura 10	Fases do crescimento celular	38
Figura 11	Câmara de Neubauer	42
Figura 12	Células de leveduras e os quadrantes em câmara de Neubauer	43
Figura 13	Reatores em pequena escala e em escala piloto utilizados para os ensaios em 12 °C e 18 °C	44
Figura 14	Resfriamento do mosto	45
Figura 15	Ponto de coleta de amostras nos reatores: P1, P2 e P3	46
Figura 16	Método de coleta das amostras nos diferentes pontos dos reatores	46
Figura 17	Células viáveis sem coloração e células não viáveis com coloração azul	47
Figura 18	Método de contagem de leveduras utilizado	48
Figura 19	Análise de turbidez ou concentração de biomassa celular	49
Figura 20	Leitura da densidade utilizando um densímetro	50
Figura 21	Quantidade de células viáveis por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C	52
Figura 22	Quantidade total de células por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C	52
Figura 23	Quantidade de células viáveis por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em P.E	54
Figura 24	Quantidade total de células por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em P.E	54
Figura 25	Quantidade de células viáveis por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em P.E	56

Figura 26	Quantidade total de células na altura 1 em 12 °C e 18 °C em P.E	56
Figura 27	Densidade ótica durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E	57
Figura 28	Comportamento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em 18 °C durante a fermentação em pequena escala (P.E)	59
Figura 29	Quantidade de células viáveis por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em E.P	61
Figura 30	Quantidade total de células por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em E.P	61
Figura 31	Densidade ótica na altura 1 em 12 °C e 18 °C em E.P	62
Figura 32	Quantidade de células viáveis por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em E.P	63
Figura 33	Quantidade total de células por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em E.P	64
Figura 34	Densidade ótica na altura 2 em 12 °C e 18 °C em E.P	65
Figura 35	Quantidade de células viáveis por ml na altura 3 em 12 °C e 18 °C em E.P	66
Figura 36	Quantidade total de células por ml na altura 3 em 12 °C e 18 °C em E.P	66
Figura 37	Densidade ótica na altura 3 em 12 °C e 18 °C em E.P	67
Figura 38	Quantidade de células viáveis por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em P.E	71
Figura 39	Quantidade total de células por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em P.E	72
Figura 40	Quantidade de células viáveis por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em P.E	73
Figura 41	Quantidade total de células por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em P.E	73
Figura 42	Quantidade de células viáveis por ml na altura 3 em 12 °C e 18 °C em P.E	75

Figura 43	Quantidade total de células por ml na altura 3 em 12 °C e 18 °C em P.E	75
Figura 44	Densidade ótica durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E	76
Figura 45	Comportamento da levedura <i>Saccharomyces Pastorianus</i> em 18 °C durante a fermentação em pequena escala (P.E) do tempo 0 ao 5	79
Figura 46	Quantidade de células viáveis por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em E.P	80
Figura 47	Quantidade total de células por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em E.P	80
Figura 48	Densidade ótica na altura 1 em 12 °C e 18 °C em E.P	81
Figura 49	Quantidade de células viáveis por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em E.P	82
Figura 50	Quantidade total de células por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em E.P	83
Figura 51	Densidade ótica na altura 2 em 12 °C e 18 °C em E.P	84
Figura 52	Quantidade de células viáveis por ml na altura 3 em 12 °C e 18 °C em E.P	85
Figura 53	Quantidade total de células por ml na altura 3 em 12 °C e 18 °C em E.P	85
Figura 54	Densidade ótica na altura 3 em 12 °C e 18 °C em E.P	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Especificações para água na produção de cerveja	18
Tabela 2	Principais características do grão de cevada e malte de cevada	19
Tabela 3	Composição química do lúpulo utilizado na indústria	21
Tabela 4	Alguns estilos de cerveja produzidas com leveduras Ale e Lager	32
Tabela 5	Leveduras, cepas e suas características	34
Tabela 6	Porcentagem de viabilidade celular na altura 1 em P.E	53
Tabela 7	Porcentagem de viabilidade celular na altura 2 em P.E	55
Tabela 8	Porcentagem de viabilidade celular na altura 3 em P.E	57
Tabela 9	°Brix durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E	58
Tabela 10	pH durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E	58
Tabela 11	Teor alcoólico durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E	59
Tabela 12	Porcentagem de viabilidade celular na altura 1 E.P	62
Tabela 13	Porcentagem de viabilidade celular na altura 2 em E.P	64
Tabela 14	Porcentagem de viabilidade celular na altura 3 em E.P	67
Tabela 15	°Brix durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P	68
Tabela 16	pH durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P	69
Tabela 17	Teor alcoólico durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P	70
Tabela 18	Porcentagem de viabilidade celular na altura 1 em P.E	72
Tabela 19	Porcentagem de viabilidade celular na altura 2 em P.E	74
Tabela 20	Porcentagem de viabilidade celular na altura 3 em P.E	76
Tabela 21	°Brix durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E	77
Tabela 22	pH durante a fermentação em 12°C e 18°C em P.E	78
Tabela 23	Teor alcoólico durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E	78
Tabela 24	Porcentagem de viabilidade celular na altura 1 em E.P	81
Tabela 25	Porcentagem de viabilidade celular na altura 2 em E.P	83
Tabela 26	Porcentagem de viabilidade celular na altura 3 em E.P	86
Tabela 27	°Brix durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P	87
Tabela 28	pH durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P	88
Tabela 29	Teor alcoólico durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
CO₂	Gás Carbônico
C₂H₅OH	Etanol
C₆H₁₂O₆	Glicose
Fe⁺²	Óxido de Ferro
Fe⁺³	Oxalato de Ferro
H₂O	Água
NO³⁻	Nitrato
SiO₂	Sílica

LISTA DE SÍMBOLOS

°Brix	Grau Brix
°C	Graus Celsius
g	Gramas
kg	Quilograma
ppm	Partes por milhão
°Plato	Grau Plato
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVO	14
2.1	Objetivos Gerais	14
2.2	Objetivos específicos	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	História da cerveja	15
3.2	Matérias-primas para produção de cerveja	17
3.2.1	Água	17
3.2.2	Malte	18
3.2.3	Lúpulo	20
3.3	Processo industrial de produção de cerveja	23
3.3.1	Moagem	25
3.3.2	Mosturação	26
3.3.3	Filtração	26
3.3.4	Fervura do mosto	27
3.3.5	Resfriamento do mosto	27
3.3.6	Fermentação	28
3.3.7	Maturação	28
3.3.8	Clarificação	29
3.3.9	Pasteurização e Envase	29
3.4	Leveduras e tipos de cerveja	30
3.5	Leveduras e crescimento celular	35
3.6	Viabilidade celular e métodos de contagem	40
4.	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	Preparo dos reatores e produção da cerveja	44
4.2	Viabilidade de leveduras pelo método de azul de metileno	47
4.3	Análises físico-químicas	48
4.3.1	Sólidos solúveis totais	48
4.3.2	pH	49
4.3.3	Concentração de biomassa celular	49

4.3.4	Densidade e Teor alcoólico	50
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Análise de viabilidade celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em Pequena Escala (P.E)	51
5.1.1	Altura 1 do reator (Superfície do mosto)	51
5.1.2	Altura 2 do reator (Meio do Reator)	53
5.1.3	Altura 3 do reator (Próximo ao fundo do Reator)	55
5.1.4	Análises físico-químicas	58
5.2	Análise de viabilidade celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em Escala Piloto (E.P)	60
5.2.1	Altura 1 do reator (Superfície do mosto)	60
5.2.2	Altura 2 do reator (Meio do Reator)	63
5.2.3	Altura 3 do reator (Próximo ao fundo do Reator)	65
5.2.4	Análises físico-químicas	68
5.3	Análise de viabilidade celular da <i>Saccharomyces pastorianus</i> em pequena escala (P.E)	70
5.3.1	Altura 1 do reator (Superfície do mosto)	70
5.3.2	Altura 2 do reator (Meio do Reator)	72
5.3.3	Altura 3 do reator (Próximo ao fundo do Reator)	74
5.3.4	Análises físico-químicas	77
5.4	Análise de viabilidade celular da <i>Saccharomyces pastorianus</i> em Escala piloto (E.P)	79
5.4.1	Altura 1 do reator (Superfície do mosto)	79
5.4.2	Altura 2 do reator (Meio do Reator)	82
5.4.3	Altura 3 do reator (Próximo ao fundo do Reator)	84
5.4.4	Análises físico-químicas	87
6.	CONCLUSÕES	90
	REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

A cerveja foi descoberta de forma acidental a milhares de anos onde hoje encontram-se a China e o Oriente médio, e desde então vem sendo aprimorada, melhorando as técnicas de produção, com o uso de insumos alternativos ou adjuntos, além do malte de cevada, como, por exemplo, milho, trigo, centeio, sorgo e aveia. Na antiguidade, a fermentação era considerada mágica e divina, e posteriormente descobriu-se que a fermentação era uma reação química espontânea, e as leveduras eram consideradas apenas como mais um componente da cerveja. Por volta do início do século XIX, Louis Pasteur concluiu que as leveduras eram as responsáveis pela fermentação (MORADO, 2017).

A principal responsável pela transformação da água, malte e lúpulo em cerveja são as leveduras, que fazem o trabalho de fermentação, transformando os açúcares presentes no malte em álcool e CO₂, e como resultado é obtida a cerveja. As leveduras influenciam o aroma, sabor, cor, turbidez, formação de espuma e, portanto, a qualidade final da cerveja e sua escolha dependem do tipo de cerveja que será produzida.

As leveduras mais usadas no processo de produção de cerveja são as do gênero *Saccharomyces*, sendo classificadas em alta fermentação (Ale), fermentadas a uma temperatura de 14 °C a 25 °C, atuando predominantemente próximo da superfície do mosto, como exemplo a *Saccharomyces cerevisiae*, e fermentação baixa (Lager), sendo fermentada a uma temperatura mais baixa, 4 °C a 15 °C, atuando predominantemente no fundo do reator, exemplo a *Saccharomyces pastorianus* (KARABIN, et al., 2017).

Um dos aspectos mais importantes no processo de fermentação é a viabilidade celular, pois a fermentação alcoólica apresenta variações de rendimento, e conhecer a viabilidade celular resulta em melhor rendimento na produção de cerveja: quanto maior o número de células viáveis (leveduras vivas), melhor será o rendimento e a qualidade do produto. Entre as variáveis que influenciam a viabilidade celular, está o controle de temperatura, muito importante para o crescimento das leveduras e consequentemente para a viabilidade celular (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Dessa forma, é de fundamental importância conhecer o real comportamento das leveduras durante as fermentações alta e baixa, que irá auxiliar na escolha da levedura, de acordo com o tipo de cerveja que se deseja produzir, conferindo

caraterísticas particulares de cada levedura, e com isso melhorando o rendimento do processo de produção.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a viabilidade celular e o comportamento de leveduras do gênero *Saccharomyces* em fermentações alta e baixa durante a fermentação, em duas temperaturas e em diferentes alturas nos reatores, com o objetivo de otimizar o rendimento dos processos de produção de cerveja.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular em diferentes fases da fermentação, através de contagem em câmara de Neubauer;
- Avaliar a viabilidade das leveduras, em três diferentes alturas dos reatores, na superfície, no meio e próximo do fundo;
- Avaliar a viabilidade em diferentes temperaturas comparando os resultados;
- Avaliar a o comportamento em fermentação alta e baixa;
- Realizar a caracterização das cervejas, por meio de análises físico-químicas de sólidos solúveis totais (°Brix), pH e teor alcoólico, do início ao final da fermentação;
- Realizar as contagens de leveduras e análises físico-químicas a cada 24h.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 História da cerveja

As evidências mais antigas sobre o surgimento da cerveja datam de 6.000 anos, e provavelmente sua produção foi descoberta por acaso, mas os primeiros indícios do cultivo de cevada e trigo são por volta de 9.000 anos, no oeste da Ásia. Ainda se tem indícios de que bebidas fermentadas tenham origem na China e na Mesopotâmia, atualmente Irã e Iraque, onde foram encontrados, em escavações, resquícios de bebidas fermentadas de cereais (FILHO et al., 2016)

No início, a cerveja era considerada um alimento e uma bebida nutritiva, tão importante quanto o pão, e se transformou em uma bebida sagrada. Os sumérios, por volta de 4.000 a.C, ofereciam a cerveja à Deusa Nin-Harra, e os chineses ofereciam a Tsiou, uma cerveja produzida com painço, aos seus ancestrais. Durante o império babilônico, sucessor do império sumério, o Código de Hamurábi previa que o pagamento pela venda de cerveja não poderia ser em dinheiro, mas sim em grãos. O cervejeiro era considerado uma pessoa com alta reputação, e por conta disso era dispensado do serviço militar, com a condição de que ele produzisse cerveja para suprir as tropas (DAMEROW, 2012).

No Egito, a cerveja era uma das bebidas mais consumidas, junto com o vinho e o hidromel, sendo a cerveja a mais popular: eram produzidos dois tipos de cerveja que, segundo as Tábuas de Ebla (2.500 a.C), era a cerveja dos notáveis (cerveja de Tebas), e as cervejas aromatizadas com gengibre, tâmara e mel que eram destinadas aos nobres. A cerveja também era usada em cerimônias fúnebres e como tratamento de pele (WILKINSON, 2017).

Na Europa, acredita-se que a cerveja tenha surgido de forma independente na região onde hoje é a Escócia, antes da idade média. Os gregos conheceram a cerveja através dos egípcios e mais tarde com os romanos: no início a bebida era usada como diurético e para uso médico; o vinho, antes de grande importância, com a chegada da cerveja, perdeu um pouco de sua popularidade, e então a produção e consumo de cerveja foi crescendo. A expansão da cerveja pela Europa teve também como início a Trácia, antiga região onde hoje fica parte da Grécia, Bulgária e Turquia e então por toda Europa. Os celtas desenvolveram várias receitas e técnicas para produção de cerveja e, na Gália (atual França) e na Galícia (atual Espanha), foi onde a bebida

recebeu o nome de cerveja, com origem no latim, *cerevisia*, homenagem à deusa da colheita e da fertilidade Ceres. Até então a *cerevisia* era produzida com cevada ou outro cereal e aromatizada com mel, mas ainda não era adicionado lúpulo (HORNSEY, 2016).

Durante a idade média, os mosteiros tiveram um papel muito importante no desenvolvimento da cerveja como a conhecemos hoje. Nesses locais, os monges desenvolviam receitas e técnicas de produção: parte da cerveja produzida era distribuída gratuitamente, e usada como preventivo contra febre tifoide e cólera, por causa da presença das leveduras e álcool, e fora dos mosteiros a produção de cerveja era uma atividade caseira, para consumo doméstico. A cerveja influenciou entre os séculos VIII e XVI na formação das cidades que começavam a surgir, e durante a urbanização e industrialização passou de uma atividade caseira para uma atividade industrial e comercial. Por volta do século XIII, a produção industrial começou onde hoje situa-se Alemanha, Áustria e Inglaterra (MEUSSDOERFFER, 2009)

O primeiro registro do uso do lúpulo data do século IX. Antes, era usada uma mistura de ervas chamada Gruit, e essa mistura de ervas dependia da região e disponibilidade e poderia ter gengibre, milefolio, zimbro, entre outros. No século XV, o lúpulo se tornou um dos principais componentes na produção de cerveja (MORADO, 2017).

No Brasil, a cerveja foi trazida por Dom João VI em 1808, e boa parte dessa cerveja era de origem inglesa, devido a influência que a Inglaterra exercia sobre Portugal naquela época, e por conta disso a cerveja inglesa dominou o mercado no Brasil durante anos (COUTINHO, 2020).

O primeiro registro de uma cerveja brasileira foi um anúncio publicado em jornal do Rio de Janeiro, o Jornal do Comércio em 27 de outubro de 1836. Até 1850, existiam poucas cervejarias e em sua grande maioria eram artesanais, localizadas principalmente nos estados de Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul. Por volta de 1870, surgiu a primeira cervejaria brasileira, fundada por Friederich Christoffel em Porto Alegre, e produzindo até um milhão de garrafas. No final do século XIX, e com a chegada de equipamentos de refrigeração, houve um grande salto no processo de produção, sendo possível ter um melhor controle sobre a fermentação (e temperatura), e assim podendo definir um padrão. Nessa mesma época, por volta de 1870, surgiram duas grandes cervejarias, que dominam o mercado até os dias de hoje, a Brahma no Rio de Janeiro e a Antarctica em São Paulo (SANTOS, 2004).

3.2 Matérias-primas para produção de cerveja

3.2.1 Água

A água é o principal constituinte da cerveja, responde por mais de 90% de sua composição, e sua disponibilidade é um importante critério para a construção de uma cervejaria, principalmente para as cervejarias com alta capacidade de produção. A captação de água pode ser de diversas fontes, como poços, águas de superfície, rios e lagos, cada uma com suas particularidades, exigindo diferentes métodos de tratamento, utilizando principalmente métodos de tratamento físico (GITIS; HANKINS, 2018).

Em primeiro lugar, a água deve ser insípida e inodora, ou seja, sem sabor e cheiro, e uma água alcalina pode dissolver grandes quantidades de matérias indesejadas. Vários parâmetros são necessários para a escolha da água, que são pH, turbidez, concentração de zinco, ferro, nitrito, dureza, sílica e matéria orgânica. De acordo com a geologia de diferentes áreas de produção, a fabricação de cerveja se desenvolveu de formas diferentes, a depender dos minerais presentes na água da região. Um exemplo, são regiões com altos níveis de bicarbonato, que tendem a elevar o pH da água, afetando tanto a eficiência da mosturação, quanto o metabolismo das leveduras (EUMANN, 2012).

Os minerais presentes na água, como por exemplo Ferro (Fe^{+2} e Fe^{+3}), com concentrações acima de 0,3 mg/L, podem provocar o escurecimento da espuma, alterações na coloração, diminuindo sua estabilidade coloidal, tendo ação catalisadora na oxidação da cerveja, alterando a viabilidade das leveduras na fermentação, além de alterações de sabor. Os sulfatos em níveis baixos podem influir em sabor mais seco, e ajudar a realçar o sabor amargo do lúpulo: o maior impacto é que ela pode ser convertida em SO_2 e H_2S por leveduras e outros microorganismos, gerando sabores e odores desagradáveis (MOSHER, TRANTHAN, 2021).

Nitratos (NO_3^-) indicam o estágio final da oxidação da matéria orgânica com a presença de nitrogênio, podendo ser reduzidos a nitritos pela ação das leveduras, reduzindo sua viabilidade. Altos teores de sílica (SiO_2) prejudicam a fermentação, ocasionando turvação coloidal e alteração de sabor (SILVA, SOUZA, 2021).

Água com alto teor de cloro, maior que 0,5 ppm, como por exemplo da rede de distribuição pública, pode reduzir a atividade das leveduras e como consequência prejudicar a fermentação (PALMER, KAMINSKI, 2013).

Na tabela 1 são apresentadas as características recomendadas da água para a produção de cerveja.

Tabela 1 – Especificações para água na produção de cerveja

Parâmetro	Especificação	Unidade
Sabor	Insípida	----
Odor	Inodora	----
pH	6,5 - 8,0	
Turbidez	< 0,4	NTU
Sulfatos	1 - 30	mgSO ₄ /L
Cloretos	1 - 20	mgCl/L
Nitratos	Ausente	mgNO ²⁺ /L
Cálcio	5 - 22	mgCa ²⁺ /L
Magnésio	1 - 6	mgMg ²⁺ /L
Ferro	< 0,1	ppm
CO ₂ Livre	0, 5 - 5	mgCO ₂ /L
Matéria Orgânica	0 - 0,8	mg O ₂ /L
Sólidos Totais Dissolvidos	50 - 150	mg/L
Dureza Total	18 - 79	MgCaCo ₃ /L

Fonte: JUNIOR, VIERA, FERREIRA, 2009.

3.2.2 Malte

O malte é resultante da germinação de um determinado cereal sob condições controladas. De maneira geral, quando falamos em malte, entende-se que é obtido a partir da cevada, mas o malte pode ser produzido com milho, trigo, aveia, centeio, arroz ou sorgo. Qualquer cereal que possa ser maltado, que tenha poder diastático, que é a capacidade de hidrolisar o amido, pode ser utilizado. Para que um cereal se transforme em malte, é utilizado o processo de malteação, que faz a germinação forçada do cereal, e interrompe-se essa germinação em determinado ponto por um processo de secagem: o objetivo é ativar as enzimas amilolíticas (Figura 1) (RODRIGUES et al., 2018).

Figura 1: Grãos de cevada germinados durante a malteação.



Fonte: ANDOIGNINI, 2021.

O malte mais utilizado em cervejarias é o malte feito a partir da cevada, da variedade gramínea, gênero *Hordeum*. Essa escolha leva em conta diversos fatores, como o tipo de cerveja que será produzida, cor e sabor: maltes claros resultam em uma cerveja com cor clara, enquanto maltes escuros resultam em uma cerveja escura, ambos influenciando o sabor. A qualidade e as características do malte afetam diretamente a qualidade da cerveja produzida, e as principais características do grão de cevada e do malte de cevada podem ser visualizadas na Tabela 2. A cevada é rica em amido, que será convertido em açúcares como a maltose e a glicose, que fornecem a energia necessária para o crescimento das leveduras (KUNTZ, BANFORTH, 2007).

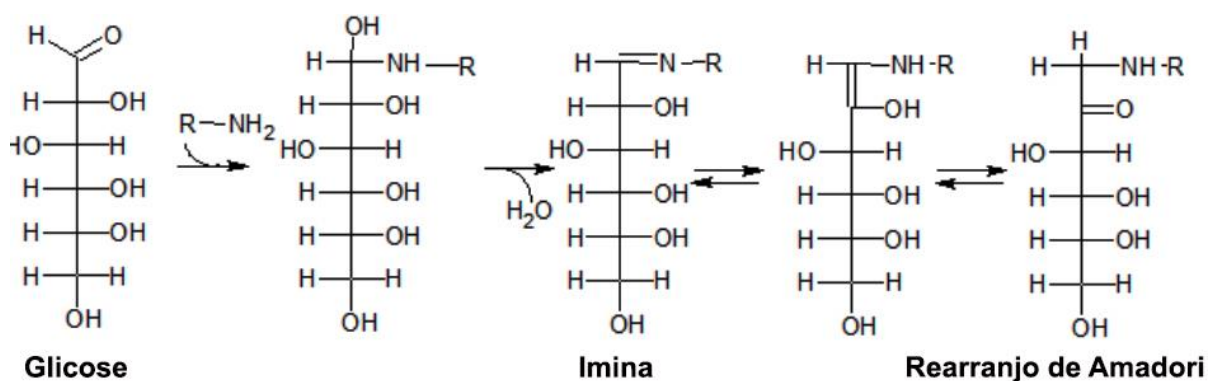
Tabela 2: Principais características do grão de cevada e malte de cevada.

Características	Grão de Cevada	Malte de Cevada
Massa do grão (mg)	32 a 36	29 a 33
Umidade (%)	10 a 14	4 a 6
Amido (%)	55 a 60	50 a 55
Açúcares (%)	0,5 a 1,0	8 a 10
Nitrogênio Total (%)	1,8 a 2,3	1,8 a 2,3
Nitrogênio Solúvel (% de N Total)	10 a 12	35 a 50
Poder Diastático % ⁰ L ⁽¹⁾	50 a 60	100 a 250
Enzima α -amilase 20 ^o unidade ⁽²⁾	Traços	30 a 60
Atividade Proteolítica	Traços	15 a 30

(1): L: Linter, índice de atividade das amilases; (2): Unidades de dextrina produzidas
 Fonte: CEREDA, 1983.

Uma das principais características sensoriais da cerveja é a cor, que, de acordo com o tipo de cerveja, pode variar de amarela a dourada para uma Pilsner, e âmbar a cobre avermelhado para uma Red Ale por exemplo. A cor da cerveja irá depender do processo de fabricação e principalmente do tipo de malte utilizado. Duas reações são responsáveis pela cor da cerveja: a primeira é a reação de Maillard (Figura 2), que acontece entre um aminoácido e uma molécula de açúcar redutor, obtendo um intermediário, a base de Schiff, então a base de Schiff sofre o Rearranjo de Amadori, formando a cetoseamina, gerando uma segunda reação, a caramelização, dando cor e aromas característicos de acordo com a cerveja que se quer produzir (BARTH, 2013).

Figura 2: Sequência da reação de Maillard.



Fonte: FOOD CRUMBLES, 2016, adaptado pelo autor.

3.2.3 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta dióica, produzindo flores masculinas e femininas, em forma de espiga (Figura 3), que possuem glândulas secretoras de resinas e óleos essenciais, que resultam no sabor amargo da cerveja (PRESTES, CORDEIRO, 2008). Na produção de lúpulo para a indústria cervejeira, utiliza-se somente as flores femininas, já que são elas que contêm a lupulina, a glândula onde se encontram as resinas e óleos essenciais.

Figura 3: Lúpulo



Fonte: CEOLA, 2021.

Os óleos essenciais presentes são uma mistura de algumas centenas de componentes, sendo os principais os hidrocarbonetos da família dos terpenos, ésteres, aldeídos, cetonas, álcoois e ácidos, que influenciam o sabor e o aroma, sendo que sua maior parte é arrastada em forma de vapor durante a fervura do mosto, evitando que a alta concentração desses óleos essenciais deixem a cerveja com sabor e aroma desagradáveis. Na Tabela 3 pode-se ver a composição química do lúpulo utilizado na produção de cerveja (KEUKELEIRE, 2000).

Tabela 3: Composição química do lúpulo utilizado na indústria.

Componentes	Concentração (%)
Água	10,0
Resinas totais	15,0
Óleos essenciais	0,5
Taninos	4,0
Monossacarídeos	2,0
Pectina	2,0
Aminoácidos	0,1
Proteína bruta	15,0
Lipídios e ceras	3,0
Cinzas	8,0
Celulose, Lignina	40,4
Total	100,0

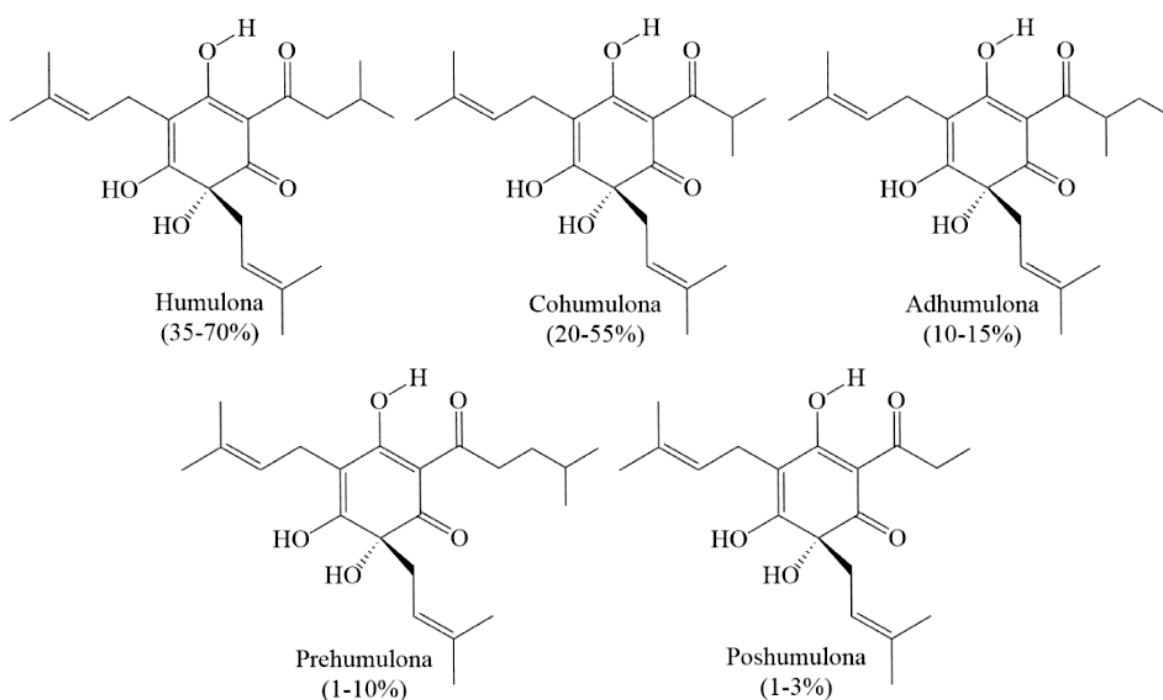
Fonte: DURELLO et al., 2019

Como mencionado anteriormente, é nas resinas que se encontra o amargor do lúpulo. Essas resinas são as resinas totais, e estas são divididas em resinas macias e resinas duras. As resinas macias constituem de 10 a 25% das resinas totais, e elas possuem uma tonalidade amarela com aspecto de fluido denso e viscoso (VERISSIMO et al., 2022).

As resinas macias são divididas em α -ácidos e fração- β . São nestas resinas que se encontram os ácidos amargos, sendo uma mistura de α -ácidos (humulonas) e fração- β (lupulonas) e podem representar de 5 a 21% da massa total do lúpulo em base seca. Os α -ácidos correspondem de 1,5 a 13% do total das resinas macias e de 9 a 10% da massa em base seca, embora existam lúpulos com mais de 20% de α -ácidos, como exemplo lúpulo Polaris, uma variedade alemã que apresenta de 18 a 26% de α -ácidos (DURELLO et al., 2019; HEALEY, 2016)

Os α -ácidos são compostos por uma mistura de cinco humulonas, sendo as principais a humulona (de 35 a 70%), a cohumuona (20 a 55%), a adhumulona (10 a 15%), a prehumulona (1 a 10%) e a poshumulona (1 a 3%). As estruturas químicas destes α -ácidos podem ser vistas na Figura 4 (ALMAGUER et al., 2014).

Figura 4: Estrutura química dos principais α -ácidos presentes no lúpulo.



Fonte: DURELLO et al., 2019

As resinas duras, que representam 3% a 5% das resinas totais, são um material sólido com cor verde escura, e seu surgimento acontece pela oxidação das resinas macias: à medida que o lúpulo vai envelhecendo, a quantidade de resinas macias diminui, enquanto a quantidade de resinas duras aumenta. As resinas duras são classificadas em resinas duras α , que compõem a menor parte, enquanto as resinas duras β constituem a maior parte (ALMAGUER *et al.* 2014; DURELLO *et al.*, 2019).

O amargor da cerveja produzido pelas humulonas do lúpulo é medido em unidades internacionais de amargor ou IBU (International Bitterness Units). Nesta escala, 1 IBU equivale a 1mg/L de Iso α -ácidos. É de fundamental importância o conhecimento da eficiência de conversão de humulonas em iso-humulonas durante a fase de fervura do mosto para que se tenha o amargor desejado (CALADO, LACERDA *et al.*, 2019; SILVA, FARIA, 2008).

Alguns fatores podem interferir na qualidade de lúpulo e nos seus componentes, apresentados na Tabela 3, como, por exemplo, técnicas de cultivo, local de produção, grau de maturação na colheita, processo de secagem, peletização e armazenamento (NETO *et al.*, 2022).

O lúpulo também tem ação na formação e estabilidade da espuma, no aumento da estabilidade biológica, e evitando que se desenvolvam alguns microrganismos por causa de suas propriedades antissépticas. O lúpulo é comercializado na forma de flores prensadas, pó, extrato e na forma de pellets, que é o mais usado, produzido a partir de flores não polinizadas, resultando em maior concentração de substâncias aromáticas (VENTURINI, 2005).

3.3 Processo de produção industrial de cerveja

Os avanços tecnológicos transformaram a produção de cerveja que antes era doméstica e artesanal (embora a produção artesanal esteja em alta ultimamente), em um processo industrial com máquinas e equipamentos projetados especificamente para os processos de produção (BELULI, 2019).

Nos últimos anos, grandes e pequenas cervejarias vêm se automatizando para obter um melhor controle dos processos de produção, com isso reduzindo perdas, aumentando a produção e mantendo um padrão contínuo de qualidade. Várias etapas do processo podem ser semi-automatizadas ou automatizadas, desde o início até o final do processo, como, por exemplo, na geração de vapor com o uso de caldeiras,

sendo controladas a temperatura, a vazão e a pressão, para as etapas de mosturação e fervura do mosto e pasteurização. E o resfriamento, através de unidades de resfriamento, para as etapas de fermentação e maturação, controlando temperatura, pH, acidez, °Plato entre outros parâmetros com dados coletados através de sensores, CLPs, entre outros equipamentos, e que podem ser acompanhados e controlados em tempo real (BEGA, 2011; KAISER, 2022; ROCKWELL, 2022).

Há alguns anos, as tendências de consumo requerem a produção de cervejas com diferentes perfis sensoriais, e, devido a essa demanda, novas tecnologias em relação ao processamento de alimentos vêm sendo desenvolvidas e aplicadas (CARVALHO, LEITE, 2023).

Algumas destas tecnologias são os campos elétricos pulsados (PEF, do inglês Pulse Electric Fields), que atuam na inativação de leveduras e contaminações, diminuindo o amargor e turbidez durante a pasteurização (MARTIN-GARCIA, TYLEWICZ, 2020; LIU, ZHANG, 2012).

Ultrassom (US, Ultra Sound), que melhora a velocidade de germinação do malte, aumenta o rendimento e diminui o tempo de processamento (CHEMAT, ROMBAUT, 2017; KALUGINA, NAFIKOVA et al., 2021).

Termossonicação (TS, Thermosonication), que também faz uso de ultrassom e na fase de pasteurização estabiliza o sabor, inibe o crescimento de leveduras e bactérias, aumentando o tempo de prateleira por até 12 meses (MILANI, SILVA, 2017; DENG, BI et al., 2017).

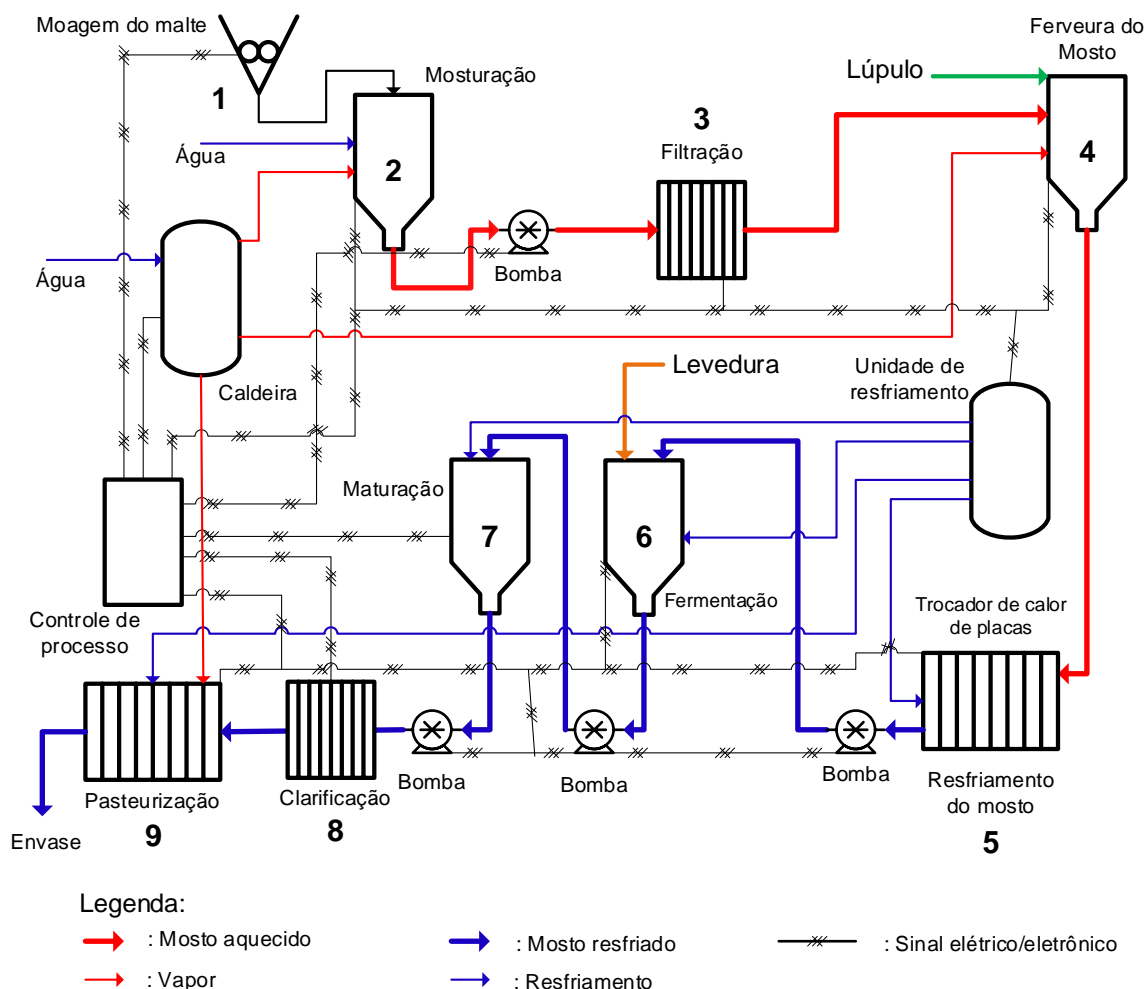
O processamento em alta pressão (HPP, High Pressure Processing), que promove estabilidade microbiológica, aumenta a atividade catalítica e hidrolítica de enzimas, diminui a intensidade da cor e reduz o tempo de filtragem (CHOI, KANG et al., 2016; SANTOS, OLIVEIRA et al., 2017).

Aquecimento Ôhmico (OH, Ohmic Heating), que pode ser uma alternativa aos métodos de pasteurização tradicionais, aquecendo o mosto instantaneamente e de forma homogênea. (LI, XU, 2019; AURINA, SARI, 2021).

O processo de produção industrial de cerveja envolve as seguintes etapas: moagem do malte, mosturação, filtração, fervura do mosto, resfriamento, fermentação, maturação, pasteurização e envase, sendo que a produção pode ser em batelada ou processo contínuo. Todas estas etapas, descritas a seguir, podem ser visualizadas através do fluxograma de processo, elaborado com o software Microsoft Visio Professional®, Figura 5, onde estão indicadas as correntes de entrada e saída, e as

linhas de controle de processo e automação (LUDWIG, 1999; WUNDERLICH, 2009; EATON, 2018).

Figura 5: Fluxograma de processo da produção de cerveja.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.1. Moagem

O malte chega na indústria no formato de grãos, e é enviado para o moinho para a moagem (Figura 5:1), diminuindo o tamanho das partículas e liberando o endosperma, aumentando a sua velocidade de hidrólise. As cascas do malte possuem a função de elemento filtrante do mosto no processo a ser realizado adiante. É recomendado que a moagem não seja muito drástica, que resulte em um malte muito

fino, que ocasionaria uma redução na velocidade de filtração e entupimento do filtro, e o malte parcialmente moído, com muitos grãos inteiros, que resultaria na dificuldade da hidrólise do amido. A moagem do malte é realizada com diversos tipos de moinhos, como, por exemplo, moinho de disco, de martelo, e de rolo, sendo o moinho de rolo o que entrega o melhor resultado na quebra dos grãos, resultando em uma moagem ideal (KREISZ, 2009).

3.3.2 Mosturação

Na mosturação ou brassagem, água e malte são misturados (Figura 5:2), e aquecidos até uma temperatura máxima de 75 °C. Esse processo é realizado em tanques ou tinas de mostura, sob agitação para que tenha a homogeneidade do mosto durante a mostura. Em processos industriais, os tanques ou tinas são encamisados e aquecidos com vapor, controlando temperatura, pH e pressões de vapor (BARNES, 2004).

Para que as enzimas sejam ativadas, são utilizadas rampas de temperatura, realizando a hidrólise do amido em açúcares fermentáveis, com ajuda das enzimas α -amilase e β -amilase, começando em 40 °C até 75 °C. A ativação das enzimas começa com a hemicelulase e exo-peptidase entre 40 °C e 50 °C, endo-peptidase e dextrinase entre 50 °C e 60 °C, β -amilase entre 60 °C e 65 °C, e α -amilase entre 70 °C e 75 °C. Como o processo é enzimático, deve se ter atenção em alguns pontos, como temperatura, tempo, pH, composição e qualidade do malte (BORTOLI et al., 2013; DE SCHEPPER, 2020; GREEN, 2008).

3.3.3 Filtração

No final da mosturação, é realizada a filtração do mosto (Figura 5:3), separando a parte líquida das partes sólidas (cascas do malte, restos da parede das células, proteínas coaguladas e material insolúvel). Esse resíduo é a chamada torta de filtro, que é retirado do mosto nesta fase. Depois da primeira filtração, aplica-se uma pulverização com água quente sobre as cascas para que ocorra uma maior retirada de açúcares ainda presentes. Essa operação deve ser realizada com temperatura em torno dos 75 °C, pois a viscosidade do mosto favorece a boa separação do resíduo, inativa enzimas indesejadas e bloqueia possível

desenvolvimento bacteriano (CRISTEA, MAZAEDA, 2013; BLŠÁKOVÁ, GREGOR, 2021).

3.3.4 Fervura do mosto

Após a filtração, o mosto é fervido, com o objetivo de inativar enzimas, esterilizar, precipitar proteínas, junto com compostos não desejados como taninos e polifenóis. É nessa fase que é adicionado o lúpulo (Figura 5:4), em geral no início e no final da fervura, para que não perca os compostos voláteis. Durante a fervura, são extraídas as resinas e os óleos essenciais do lúpulo, que irão dar sabor e aroma à cerveja, concentrando o mosto, formando substâncias redutoras e corantes, que acontecem pela caramelização dos açúcares e oxidação de taninos e formação de melanoidinas, formação de ácidos que resultam em redução de pH e eliminação de compostos voláteis indesejáveis, e solubilizando as substâncias amargas do lúpulo (BARNES, 2018; FONTOURA et al., 2019).

3.3.5 Resfriamento do mosto

Após o término da fervura, é dado início ao resfriamento do mosto (Figura 5:5), separando as partículas sólidas do lúpulo, que sedimentam e são separadas do mosto, chamadas de *trub*. Recomenda-se que essas partículas sólidas, o *trub*, sejam retiradas ainda quente, embora também possam ser retiradas a frio. Mas, quando se retira a quente, se tem uma melhoria da estabilidade físico-química e sensorial da cerveja. Depois desse processo, resfria-se o mosto em trocador de calor de placas até a temperatura desejada para o tipo de cerveja que será produzida, e de acordo com a levedura que será utilizada, para uma lager resfria-se entre 4 °C e 12 °C, para ale entre 14 °C e 25 °C, utilizando para o resfriamento água fria circulando em contracorrente, ou líquido refrigerante a base de álcool. Nessa fase é realizada a aeração do mosto, fundamental para a etapa seguinte, a fermentação (CIONT, EPURAN, 2022; BHONSALE, MORES, 2021).

3.3.6 Fermentação

Nesta etapa, são adicionadas as leveduras ao mosto (Figura 5:6), e tem início a fermentação que é dividida em três fases: a fase Lag que é o período em que as leveduras se adaptam ao meio; a fase de crescimento celular ou fase exponencial, onde o controle da temperatura tem enorme influência; e a fase estacionária, onde cessa o crescimento celular, e a fermentação diminui (KUCHARCZYK, TUSZYŃSKI, 2020).

A fermentação é um processo bioquímico que contribui com inúmeros subprodutos do metabolismo celular, onde a levedura assimila açúcares fermentáveis, aminoácidos, minerais e outros nutrientes, e ao mesmo tempo secreta uma série de compostos: etanol, CO₂, álcoois superiores e ésteres, e também compostos não desejados como acetaldeído, diacetil, compostos contendo enxofre, entre outros, que alteram o sabor da cerveja, prejudicando sua qualidade. Esta fase pode ser realizada em batelada, batelada alimentada ou processo contínuo (LIU, KERR, 2022; SCLIFOS, SCUTARU, 2022). Terminada a fermentação, é realizada a retirada da massa de leveduras, preparando a cerveja para as etapas seguintes: a retirada da massa de levedura é fundamental para obter uma cerveja limpa e com sabor e aroma adequados (TADINI et al., 2016).

A fermentação e a maturação na indústria ocorrem usualmente em tanques com fundo cônico, circundados por serpentinas e encamisados para circulação de líquido refrigerante, equipados com válvulas de controle da pressão de CO₂, sensores de temperatura, entre outros. Durante toda a fase de fermentação, o mosto deve ser mantido resfriado na temperatura correta, e, para isso, são utilizados fluidos refrigerantes, sendo os álcoois os mais utilizados. Nesse grupo, estão o etanol ou álcool etílico e o propileno glicol, que apresentam baixa toxicidade (SHILLING et al., 2008).

3.3.7 Maturação

Após a fermentação vem a etapa da maturação (Figura 5: 7), onde é realizada uma nova fermentação. Esse processo faz com que a cerveja fique em repouso, com temperatura entre 0 °C e 10 °C, onde acontece a fermentação secundária, permitindo que as leveduras lentamente metabolizem compostos indesejáveis que influenciam

no sabor, e que serão removidos, juntamente com materiais insolúveis que sedimentam e precipitam, tornando a cerveja mais clara, contribuindo para melhorar o sabor e sua estabilidade coloidal (CARVALHO, LEITE, 2023).

3.3.8 Clarificação

O principal objetivo da clarificação, como o nome já diz, é clarificar a cerveja (Figura 5: 8), retirando as células de leveduras, o complexo coloidal de proteína-tanino, reduzindo a turbidez. Este processo deve ser realizado em temperatura mais baixa possível. Nesta etapa, é realizada a carbonatação da cerveja, através da injeção de CO₂. A clarificação é realizada por filtros, que podem ser de terra diatomácea, diatomita, perlita ou celulose. Novas tecnologias de filtração estão sendo utilizadas pela indústria para clarificação de forma mais eficiente, como, por exemplo, filtração de fluxo cruzado, microfiltração dinâmica e filtro de profundidade (KAHLE, ZARNKOW, 2020; ROGENER, 2020; EATON, 2023).

3.3.9 Pasteurização e Envase

A etapa da pasteurização da cerveja é um processo que pode ocorrer de duas formas: pasteurização em túnel, onde a cerveja é pasteurizada após o engarrafamento, sendo a mais utilizada, e em trocadores de calor do tipo placas (Figura 5: 9), empregando tempos de residência curtos, utilizando altas temperaturas por alguns segundos, conhecida como pasteurização Flash ou HTST (do inglês High Temperature Short Time). Para um melhor controle do processo, utilizam-se as unidades de pasteurização (UP), onde 1 UP é definido como o aquecimento da cerveja em 60°C durante um minuto. Antes do engarrafamento, a cerveja é submetida a até 15 UP, e na pasteurização em túnel, após o engarrafamento utiliza-se de 15 a 30 UP (BHUVANESWARI, 2014).

O objetivo da pasteurização é inativar as leveduras remanescentes da fermentação e potenciais microrganismos que podem deteriorar a cerveja. Com isso aumenta-se a sua vida útil, e conseqüentemente aumentando seu tempo de prateleira. Após a pasteurização em trocadores de calor, é realizado o envase em garrafas ou latas (MILANI, SILVA, 2022).

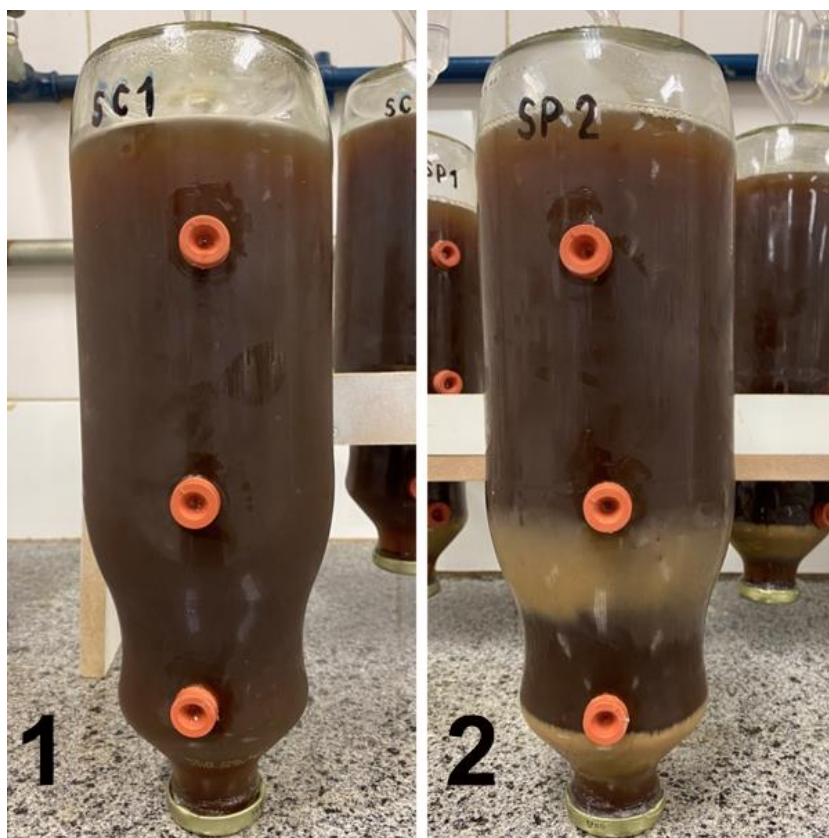
3.4 Leveduras e tipos de cerveja

As leveduras são as responsáveis pela transformação do malte e lúpulo em cerveja. As mais usadas na indústria cervejeira são do gênero *Saccharomyces*, que são unicelulares, e sua reprodução acontece por brotamento ou gemulação de forma rápida. Elas se desenvolvem em uma faixa ampla de temperaturas, que se situa entre 6 °C a 35 °C, pH entre 4,5 a 5,5. Quando adicionadas ao mosto elas metabolizam a mistura de malte e água, rica em açúcares, e as transformam em álcool e CO₂ (BOULTON, QUAIN, 2001).

A classificação das leveduras é realizada com base em seu comportamento durante a fermentação, leveduras de alta fermentação, que fermentam a uma temperatura de 14 °C a 25 °C, atuam próximo da superfície do mosto, e leveduras de baixa fermentação, que fermentam a uma temperatura mais baixa, de 6 °C a 15 °C, e atuam predominantemente no fundo do reator. Como exemplo de levedura de alta fermentação (Ale) tem-se a *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 6: 1), e de baixa fermentação (Lager) a *Saccharomyces pastorianus* (Figura 6: 2) (KARABIN et al, 2017; MOURA-NUNES et al., 2016).

A *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada em cervejas tipo ale, tem como característica atuar na superfície do mosto (alta fermentação), possui uma ação rápida de reprodução, mas não consome todo o açúcar presente no malte. Devido a isto, a cerveja pode apresentar um sabor frutado, complexo e doce. A fermentação ocorre a uma temperatura de 14 °C a 25 °C por um período curto de tempo, e possui como característica a formação de flocos. A *Saccharomyces pastorianus*, utilizada na cerveja tipo lager, possui como característica atuar no fundo do fermentador (baixa fermentação), possui uma reprodução mais lenta e menos densa, mas é mais eficaz, resultando em uma cerveja mais limpa e de sabor seco. A fermentação ocorre em uma temperatura mais baixa, 6 °C a 12 °C e por um período de tempo maior (LASANTA, DURAN-GUERRERO et al., 2020; KODAMA, KIELLAND-BRANDT, 2015).

Figura 6: Levedura de alta fermentação *Saccharomyces cerevisiae* (1) e levedura de baixa fermentação *Saccharomyces pastorianus* (2).



Fonte: Elaborado pelo autor.

As leveduras além de transformarem os açúcares do malte em álcool e CO_2 podem produzir diversos ácidos orgânicos, como ácidos acético, láctico e succínico, gerando também álcoois como etanol e glicerol, que atuam diretamente na qualidade e no tipo de cerveja a ser produzida, definindo sabores e aromas caraterísticos (CANONICO et al., 2019; VIANA et al., 2021).

Há diversas cepas de leveduras do gênero *Saccharomyces*, cada uma com as características do tipo de cerveja a ser produzida, principalmente cervejas artesanais, quando o objetivo é produzir uma cerveja onde se evidencie um sabor lupulado ou maltado, escolhe-se uma levedura neutra, com perfil baixo de sabor, para não se sobressair ao sabor desejado. Se o objetivo é produzir uma cerveja com sabor frutado, utiliza-se uma levedura que evidencie esse sabor. Outro exemplo são as cervejas do tipo Sour, fermentadas com cepas de leveduras que acidificam o mosto, produzindo ácido láctico e acético, que irão dar um sabor ácido, típico deste tipo de cerveja. As

leveduras determinam o tipo e o estilo da cerveja a ser produzida, como as descritas na tabela 4 (SPITAEELS et al., 2014; LI, LIU, 2015).

Tabela 4: Alguns estilos de cerveja produzidas com leveduras Ale e Lager

Ale	Lager
American Pale Ale	American Pilsen
American Amber Ale	American lite lager
American Brown	American Premium
Belgian dark Strong ale	Baltic porter
Belgian dubbel	Bohemian pilsner
Belgian Pale Ale	Dark American Lager
Berliner	Doppelbock
Blonde Ale	Dortmunder Export
Brown porter	Eisbock
Cream Ale	German Pilsner
Dry Stout	Munich Dunkel
English Brown	Munich Heller
Fruit Beer	Shwarzbier
English Mild	Tradicional Bock
Imperial Ipa	
Imperial Stout	
Indian Pale Ale	
Pale Ale	
Saison	
Special Bitter	
Sweet Stout	
Weizenbock	

Fonte: Elaborado pelo autor.

O isolamento de leveduras *Saccharomyces* para uso exclusivo em uma indústria é um processo caro de ser obtido, por esse motivo, muitas cervejarias compram cepas já existentes no mercado, enquanto algumas grandes cervejarias possuem capacidade científica para criar e cultivar suas próprias cepas (QUAIN, 2006).

As *Saccharomyces* e suas cepas são as mais utilizadas na indústria, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* uma das mais utilizadas. Atualmente grande parte das leveduras são híbridas, isso significa que existe mais de uma espécie ou cepa em

conjunto, e podem ser criadas ou obtidas naturalmente, ou obtidas em laboratório. A hibridização é realizada de várias formas, como, por exemplo, acasalamento esporo com esporo, acasalamento em massa, acasalamento raro e fusão de protoplastos. Uma vantagem de combinar cepas e espécies diferentes é o aprimoramento das características desejadas para a produção do tipo de cerveja que é desejado (LENGELER, STVICEK, FENNESSY, 2020).

A cerveja tipo Pilsen é uma lager que responde por cerca de 90% da produção de cerveja no mundo, e para sua fermentação utiliza-se a *Saccharomyces pastorianus*, que é um híbrido entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Sacharomyces eubayanus*. Com esse cruzamento, *Saccharomyces pastorianus* herdou a utilização eficiente da maltotriose da *Saccharomyces cerevisiae*, e a tolerância ao frio da *Sacharomyces eubayanus* (GIBSON, GEERTMAN, HITTINGER, 2017; BOND, NEAL, DONNELLY, 2004).

O rendimento e a viabilidade das leveduras são diretamente afetados pelos nutrientes presentes no mosto, e pela formação dos compostos desejados. Dessa forma, o mosto deve conter carboidratos (glicose, frutose, sacarose, galactose, rafinose, maltose e maltotriose). As leveduras ale não possuem a capacidade de fermentar melibiose presente no mosto, enquanto as lager possuem essa capacidade. Na tabela 5, são apresentadas as leveduras, cepas e características de cada uma (CAPECE et al., 2018).

As reações que ocorrem durante a fermentação, dentro das células de levedura, são as responsáveis pelo aroma e sabor da cerveja, pois são onde os açúcares do mosto são transformados em álcool e compostos voláteis, sendo esses compostos os principais responsáveis pelo sabor. Esses compostos voláteis são as carbonilas (aldeídos e cetonas), álcoois superiores, ésteres, ácidos graxos e orgânicos, e assim também como compostos de enxofre e dicetonas vicinais, alguns atuando de forma positiva e outros de forma negativa gerando *off-flavors* (KROGERUS, 2017).

Tabela 5: Leveduras, cepas e suas características

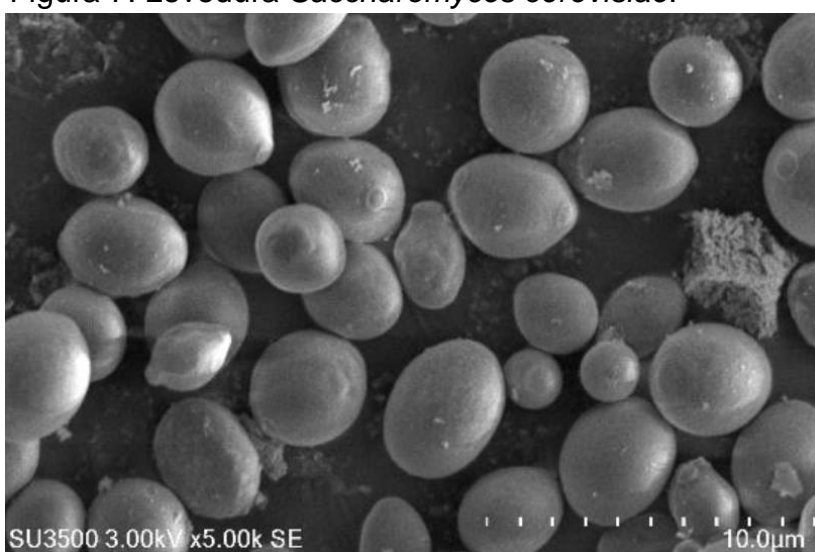
Leveduras	Cepas	Carateristicas
<i>Saccharomyces pastorianus</i> (grupo I ou Saaz)	<i>S. eubayanus</i> + <i>S. cerevisiae</i> (cepa ale)	Não são capazes de fermentar a maltotriose; aumentam a taxa de fermentação e de aromas; mais tolerantes ao frio que as Frohberg.
<i>Saccharomyces pastorianus</i> (grupo II ou Frohberg)	<i>S. eubayanus</i> + <i>S. cerevisiae</i> (cepa ale) + <i>S. cerevisiae</i> (cepa stout)	Capazes de fermentar maltose e maltotriose; crescimento e atividade fermentativa são mais rápidas.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa ale, padaria, vinho, saquê)	<i>S. kudriavzevii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	Maior formação de ésteres de acetato, mais aromático.
	<i>S. cerevisiae</i> (cepa ale) + <i>S. cerevisiae</i> (cepa saquê)	Aumentam taxa de fermentação; produzem maiores concentrações de certos compostos de aroma.
	<i>S. cerevisiae</i> (cepa ale) <i>S. cerevisiae</i> (variant diastaticus)	Aumentam níveis de atenuação e rendimento de etanol do que a cepa original de fermentação;
	<i>S. cerevisiae</i> (cepa de laboratório) + <i>S. eubayanus</i>	Melhoram utilização de açúcar e a taxa de fermentação.
	<i>S. cervisiae</i> (cepa ale, padaria, vinho, saquê) + <i>S. eubayanus</i>	Maior diversidade de aromas.
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	-	Tolerância ao frio (alternativa para <i>S. eubayanus</i>); melhor taxa de respiração no frio.
<i>Saccharomyces uvarum</i>	-	Tolerância ao frio (alternativa para <i>S. eubayanus</i>), no frio tem maior produção de etanol.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	Alta capacidade fermentativa.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	-	Reduzem calorias, digerem dextrinas.
<i>Saccharomyces eubayanus</i>	-	Tolerância ao frio.
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	-	Baixa atividade de fermentação em maltose e maltotriose (reduzem álcool).

Fonte: KROGERUS, 2005.

3.5 Leveduras e crescimento celular

As leveduras são microrganismos unicelulares, eucarióticos, pertencentes ao reino fungi, e fazem parte do grupo dos ascomicetos, denominado como fungos, possuindo formatos e tamanhos variados, com tamanho entre 1 a 5µm de diâmetro e 5 a 30µm comprimento (Figura 7). Se desenvolvem em uma faixa ampla de temperatura, que se situa entre 6 a 35 °C, pH entre 4,5 a 5,5 (CARVALHO, BENTO, 2006).

Figura 7: Levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: KARIMY, DAMAYANTI, 2020.

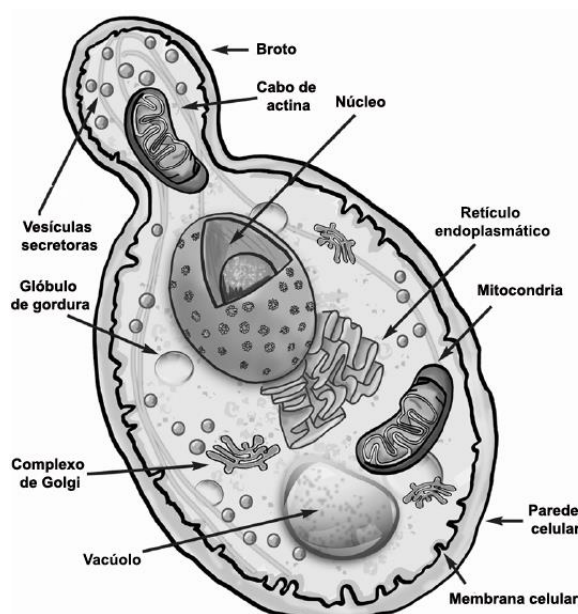
As leveduras apresentam um núcleo definido (Figura 8), e sua estrutura é composta por uma parede celular formada principalmente por β -glicana e manana, juntamente com glicoproteínas e manoproteínas (PADUA, OLIVEIRA, 2000; GLINSTON, YADAV, 2021). Envoltos nessa parede celular encontra-se a membrana plasmática, composta principalmente de fosfolípidios e proteínas, que controla a entrada e saída de substâncias da célula, e proteínas que realizam o transporte de açúcares e aminoácidos, a fluidez média e a variação da fluidez da membrana plasmática. É um importante determinante da tolerância ao estresse e uma alta variação indica a diminuição do tempo de vida da levedura (TURK, PLEMENITÁS, 2011).

O citoplasma preenche o espaço entre a membrana plasmática e o núcleo, composto por: mitocôndrias, retículo endoplasmático, ribossomos e vacúolos, que contém uma série de proteínas fibrosas denominadas citoesqueleto, e três tipos de

fibras formados por proteínas que compõem o citoesqueleto: microtubos, microfilamentos e filamentos intermediários. O citoesqueleto fornece resistência e rigidez a célula, mantendo sua forma, sendo de fundamental importância para a organização das organelas da célula (LODISH, 2014). O núcleo, onde encontra-se o DNA da levedura, circundado por uma membrana nuclear, que tem papel fundamental no controle e nas atividades da levedura (VOET, 2002). São as mitocôndrias as responsáveis pela produção de energia nas leveduras, em forma de ATP (Adenosina Tri-Fosfato) por meio da respiração celular, que é a reserva de energia da célula. A produção de ATP ocorre nos cristais mitocondriais, que são circundados por uma membrana externa e uma interna altamente invaginada (DUNN, GRIDER, 2023).

O retículo endoplasmático é uma rede de membranas que se estende pelo citoplasma, existindo dois tipos: o liso sem ribossomos e o rugoso com ribossomos, ajudando na síntese e no transporte de proteínas e lipídios. Juntamente com o retículo endoplasmático, os ribossomos são os responsáveis pela síntese das proteínas pela levedura. São encontrados no citoplasma ou aderidos no retículo endoplasmático, divididos em unidade grande e pequena, e fazem a síntese das proteínas através do RNA mensageiro (DE ROBERTS, HIB, 2014). Os vacúolos, compartimentos de armazenamento de nutrientes no citoplasma, como açúcares e aminoácidos, têm como função a regulação osmótica e o metabolismo de compostos tóxicos produzidos pela levedura (ALBERTS, BRAY, 2017).

Figura 8: Estrutura das leveduras.

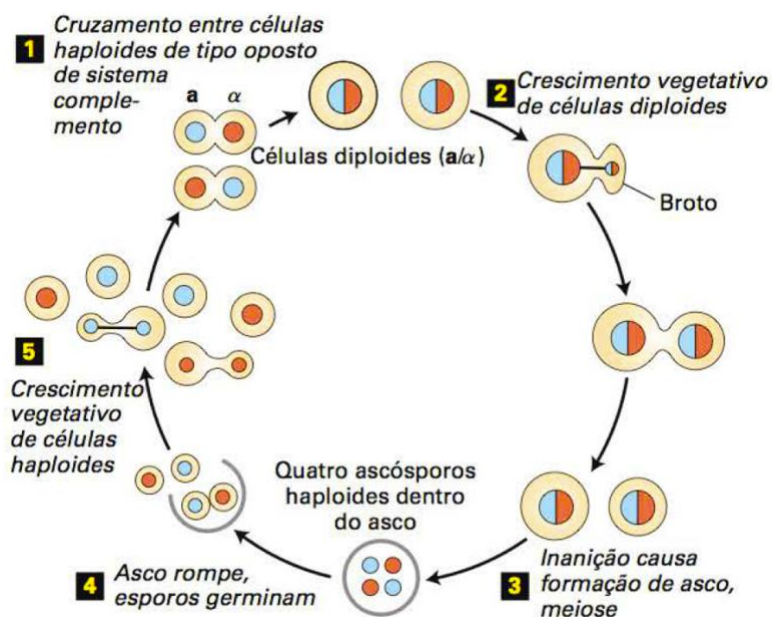


Fonte: WALKER, STEWART, 2016, adaptado pelo autor.

As leveduras possuem, como característica, a reprodução por brotamento ou gemulação, de forma assexuada. O brotamento de uma levedura acontece por mitose, e acontece quando o núcleo-filho permanece na célula-mãe, e outro núcleo-filho é deslocado para o broto, e este se soltando quando atinge o tamanho próximo da célula-mãe, surgindo uma nova célula. Após a liberação de cada célula broto, fica uma cicatriz na célula-mãe, de modo que o número de brotamentos da célula-mãe pode ser contado (SALARI, 2017).

A mitose acontece através de células haploides, que possuem uma cópia de cada cromossomo, e células diploides, contendo duas cópias de cada cromossomo. Em condições de falta de nutrientes ou inanição da levedura, acontece em células diploides outro tipo de divisão celular, a meiose, com a formação de ascósporos, onde a ruptura de um ascósporo libera quatro esporos haploides, que germinam em células a e α , multiplicando assexualmente (Figura 9) (FELDMANN, 2012; LEGRAS, MERDINOGLU, 2007).

Figura 9: Reprodução da levedura *Saccharomyces Cerevisiae*.



Fonte: LODISH, 2014.

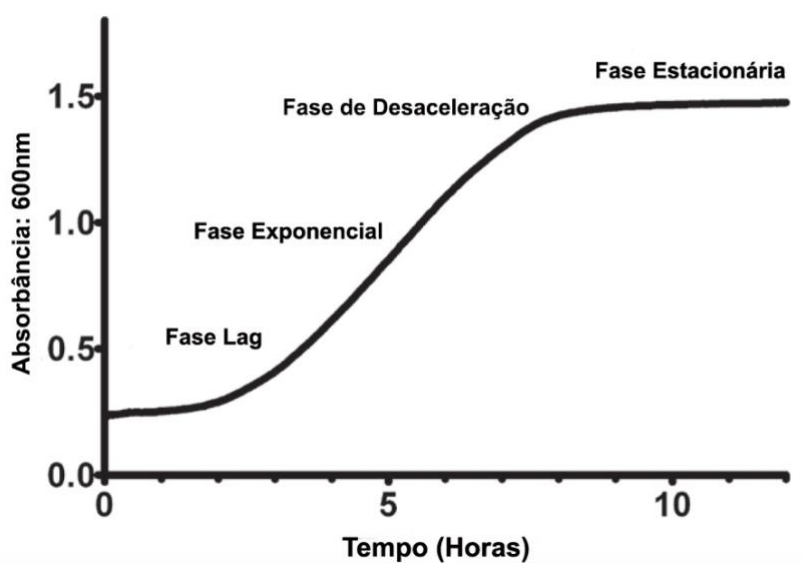
Para que aconteça o crescimento celular, é necessário um suprimento de nutrientes, pH e temperatura adequados, para que as leveduras sintetizem os compostos macromoleculares das células e compostos de baixo peso molecular presentes no mosto. Sendo as leveduras heterotróficas, seu metabolismo quebra compostos orgânicos, obtendo a energia necessária para transformar compostos de

carbono e nitrogênio em novos compostos que serão excretados pelas leveduras. (DARAMOLA, ZAMPRAKA, 2008).

Em processos aeróbios (reatores abertos), as leveduras podem oxidar, de forma total, alguns substratos em CO_2 e H_2O , obtendo a energia necessária para a conversão do substrato, aumentando a massa celular através da reprodução das leveduras. Em processos anaeróbios (reatores fechados), as leveduras produzem energia em nível citoplasmático para que realizem seu crescimento, e transformando açúcar em álcool e CO_2 , através das enzimas, conhecidas como via glicolítica, e essas enzimas podem ser influenciadas por diversos fatores, como temperatura e pH, que podem afetar o rendimento da fermentação (CECCATO-ANTONINI, 2008).

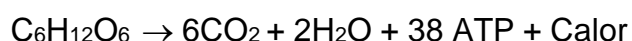
A reprodução e o crescimento das leveduras possuem três fases durante a fermentação, Figura 10, começando pela fase lag, onde as leveduras passam por um processo de adaptação ao meio (mosto), não ocorrendo crescimento celular. Após sua adaptação, vem a fase exponencial, onde começa a reprodução das leveduras através da divisão das células, com rápido consumo de substrato e consequente aumento da massa celular. Após o crescimento exponencial das leveduras, elas entram na fase estacionária, com o número de células viáveis e não viáveis se mantendo constante. Na última fase, as leveduras não viáveis ultrapassam a quantidade de viáveis, devido as condições do mosto ficarem impróprias para as leveduras sobreviverem, pois o substrato foi consumido durante as fases exponencial e estacionária (WHITE, ZAINASHEFF, 2010).

Figura 10: Fases do crescimento celular.



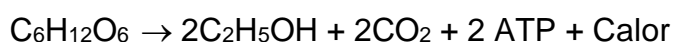
Fonte: HELD, 2022, adaptado pelo autor.

As leveduras obtêm a energia necessária (ATP) para sua reprodução e crescimento através da hidrólise dos açúcares presentes no mosto, onde uma parte dos açúcares é usada para o crescimento celular e outra parte para geração de subprodutos como álcoois superiores, glicerol e ácidos orgânicos, durante o processo de fermentação (PIRES, 2014). Catabolismo e anabolismo são dois processos importantes no metabolismo das leveduras. Em uma reação catabólica, moléculas complexas são quebradas ou degradadas em moléculas simples, gerando energia (reação exotérmica). Nas leveduras, o catabolismo quebra os açúcares presentes no mosto, com a oxidação dos açúcares gerando CO₂ e H₂O, produzindo energia conforme a reação abaixo:



O anabolismo acontece de forma inversa ao catabolismo, nessas reações acontece a formação de moléculas complexas a partir das moléculas simples produzidas pelas próprias leveduras (CAMPBELL, 2017).

Durante a fermentação do mosto, os açúcares são parcialmente quebrados, para a formação de álcool e CO₂, produzindo 2 moléculas de ATP, para o crescimento celular. Esse processo tem baixo rendimento, mas a reação abaixo é fundamental para produção de cerveja e bebidas alcoólicas (RETTORY, VOLPE, 2000; JUNIOR, VIEIRA, 2009).



Os principais açúcares fermentáveis encontrados no mosto são: a maltose (40 a 65%), maltotriose (15 a 20%) e glicose (10 a 15%), juntos compõem até 80% dos carboidratos que estão presentes no mosto. Os outros 20% são compostos pela frutose (2 a 5%), sacarose (3 a 6%) e açúcares não fermentáveis (20 a 30%), que as leveduras metabolizam de forma lenta ou não metabolizam (WILLAERT, 2001; GIBSON et al., 2007).

Durante a fermentação, as leveduras metabolizam esses carboidratos em sequência, começando com a sacarose, e ao mesmo tempo metabolizando a glicose, consumindo por volta de 50%, quando começa metabolizar a maltose, e finalmente metabolizando a maltotriose, sendo a maltotriose metabolizada de forma lenta, o que

pode ocasionar menor rendimento, resultado em cervejas com baixo teor alcoólico, e níveis de açúcar elevados (LEI, XU, 2016).

3.6 Viabilidade celular e métodos de contagem

A eficiência do processo de fermentação depende de um controle rigoroso das leveduras envolvidas no processo. O mestre cervejeiro deve estar atento aos fatores internos e externos que influenciam a viabilidade das leveduras, evitando que ocorra contaminações que irão reduzir sua viabilidade, reduzindo a produção e a qualidade do produto final (RODHOUSE, CARBONERO, 2017).

Diversos fatores interferem na viabilidade celular, como por exemplo as contaminações que podem ser microbianas, que podem ser de uma enorme variedade de fontes, e classificadas em: primários, originados das matérias-primas e equipamentos de produção, e os secundários, quando a cerveja é contaminada durante a fase de engarrafamento. Os contaminantes de origem primária são os mais perigosos para a viabilidade das leveduras, pois podem resultar em uma perda total da produção. Um exemplo são as leveduras selvagens que podem ser de vários tipos, como *brettanomyces* e *debaryomyces*, que causam formação de película na superfície da cerveja, causando turbidez, odor, e sabores estranhos, e possível redução no rendimento da fermentação (OJO, 2010; SCHNEIDERBANGER, 2018).

As contaminações bacterianas, que também podem ocorrer, provocam inúmeras perdas na produção, como, por exemplo, as contaminações por bactérias, classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas. Entre as Gram-positivas, as bactérias ácido-láticas, dos gêneros *lactobacillus* e *pediococcus*, são as mais perigosas, pois causam aromas indesejados, provocados pelo diacetil (2,3-butanodiona) (VAUGHAN, SULIVAN, 2005).

Entre as Gram-negativas, as contaminações bacterianas podem ser provocadas por bactérias do gênero *pectinatus* e *megasphaera*, sendo as mais comuns *pectinatus cerevisiiphilus* e *pectinatus frisingensis*. Ocasionam sabores de aromas indesejados, provocados pelos ácidos acético, propiônico, succínico e láctico, gerando turbidez e odor característico de ovo podre, devido a formação de sulfeto de hidrogênio e metil mercaptano (HELANDER et al., 2004; TURVEY et al., 2017).

Os ácidos láctico e acético também influenciam na viabilidade das leveduras, atuando como inibidores do crescimento celular, reduzindo o processo fermentativo,

e interferindo na viabilidade das leveduras e na qualidade do produto final (SAKAMOTO et al., 2001; MUNFORD et al., 2017; RODRIGUES-SAAVEDRA, GONZÁLES DE LLANO, 2020).

NOBRE, HORII, ALCARDE (2007), em estudo sobre a viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae*, concluíram que a presença de bactérias, como a *L. Fermentum* e *B. subtilis*, provocaram uma redução de viabilidade da levedura, enquanto que as bactérias *L. plantarum*, *B. coagulans* e *B. stearothermophilus* não provocaram redução de viabilidade, concluindo que a acidez do meio, em conjunto com a presença das bactérias utilizadas no estudo, foram as principais responsáveis pela redução da viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae*.

Outro fator que também pode influenciar a viabilidade das leveduras, não somente na produção de cerveja, mas também em outros processos fermentativos, como açúcar e álcool, é o reuso de leveduras, uma prática comum na indústria, como forma de redução de custos, onde a viabilidade pode ser reduzida a cada batelada, devido a possíveis mutações (PAULA, FARIA, 2017).

Leveduras vivas não significam que estejam fermentando adequadamente, já que determinadas cepas podem ser comprometidas por mutações que vão se acumulando ao longo do tempo, entre outros fatores. Como consequência, as leveduras podem apresentar baixa taxa de crescimento, fase lag muito longa, baixas taxas de atenuação, e geração de possíveis *off flavors* e turbidez (JENKINS et al., 2003).

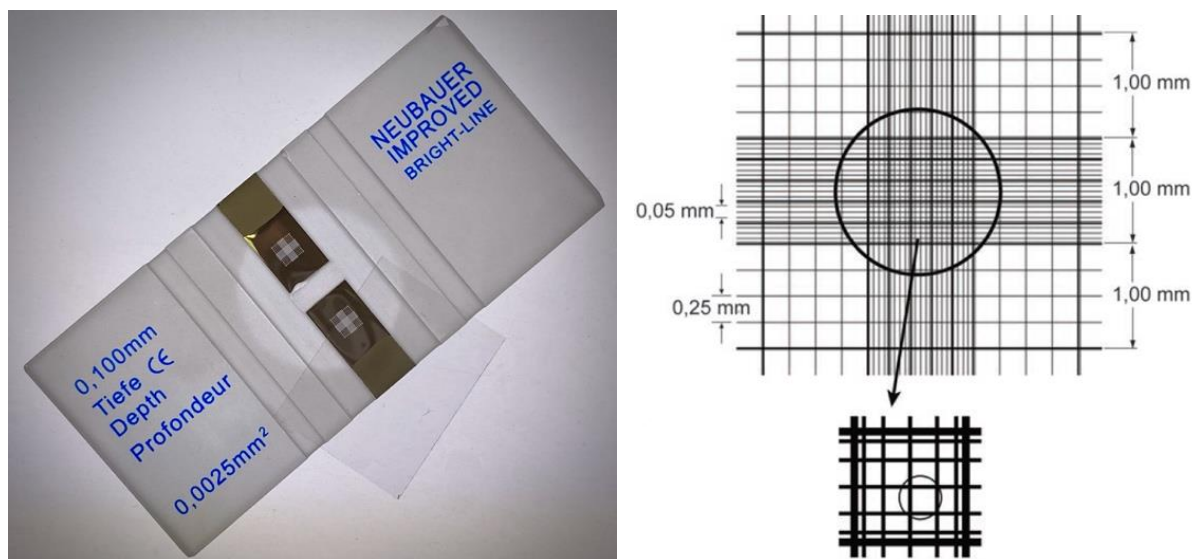
Dessa forma, quanto maior a quantidade de células viáveis, maior será a conversão dos açúcares presentes no mosto em álcool, e por isso, a análise de viabilidade é fundamental no processo de produção de cerveja.

Existem diversos métodos de avaliação de viabilidade de leveduras. Os mais utilizados são o método por acidificação do meio, onde é avaliado o poder de acidificação por meio das leveduras. Essa acidificação pode ser resultado da produção de CO₂ e da extrusão da proteína H⁺ pela proteína PMA1, H⁺-ATPase da membrana da *Saccharomyces cerevisiae*. O teste avalia a capacidade das células em manter diferentes concentrações de ions H⁺ intracelular e extracelular, quando em água destilada, medindo também mudanças induzidas pela presença de glicose. É um método simples e eficiente para avaliar a viabilidade de leveduras (GABRIEL, DIENSTBIER, et al, 2008).

No método de contagem por análise microbiológica em placas de petri, as amostras são inoculadas em um meio de cultura, como por exemplo PDA (Potato Agar Dextrose), sendo realizado o plaqueamento em temperatura apropriada, por até 5 dias, quando as colônias ficam visíveis, e podem então ser contadas, sendo que cada colônia é uma célula viável (SILVA, JUNQUEIRA, 2017).

O método de contagem de azul de metileno é amplamente usado, e consiste em contar as células de leveduras viáveis pela sua coloração intracelular através do microscópio. Este método é realizado utilizando uma câmara de Neubauer, uma lâmina de vidro com profundidade específica para depositar a amostra e no centro existem duas câmaras, como linhas divididas formando quadrantes, ou malhas de leitura, e cada quadrado possui 1mm^2 . A câmara é utilizada com uma lamínula de vidro, e o espaço entre a lamínula e câmara possui um volume em cada quadrado de $0,1\text{mm}^3$ ou $0,0001\text{mL}$, Figura 11 (ATANASOVA, 2019; STODART, 2011).

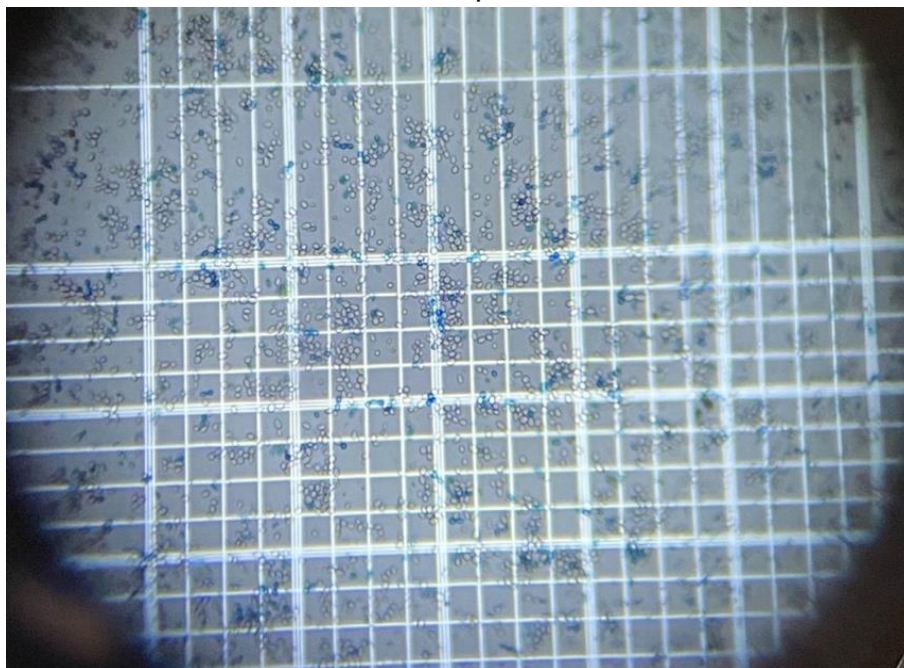
Figura 11: Câmara de Neubauer.



FONTE: Elaborado e adaptado pelo autor, 2023.

Para a contagem, utiliza-se uma solução de azul de metileno e, na amostra diluída com as leveduras, todas as células viáveis permanecem sem cor, incolores, e as células não viáveis apresentam a cor azul (Figura 12).

Figura 12: Células de leveduras e os quadrantes em câmara de Neubauer.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Outro método utilizado é a avaliação de turbidez, ou concentração de biomassa celular, utilizando um espectrofotômetro, com um feixe de luz em determinados comprimentos de onda, como por exemplo 600 ou 660 nm. Ao atingir a amostra com determinada suspensão celular, a luz sofre desvios, e a luz não desviada é medida pelo sensor do espectrofotômetro, calculando a absorbância e então a densidade óptica, que é a quantidade de luz absorvida proporcionalmente com a quantidade de células presentes na amostra. As características das leveduras que variam de uma espécie para outra ou entre cepas, como por exemplo tamanho das células, podem influenciar nos resultados (KOCH, 2007).

A contagem de leveduras pode ser realizada de forma manual, contando uma a uma, ou de forma automatizada, com ajuda de computadores por meio de visão computacional de aprendizagem supervisionada, através de diversos algoritmos, onde, através das imagens em plaqueamento ou microscópio, o software identifica atributos de cor, forma e textura, classificando em viáveis e não viáveis de forma rápida (BAHRI, ZOUAKI, 2013; SOUZA, WEBER, 2020).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo dos reatores e produção da cerveja

1º Passo: Os materiais utilizados na presente pesquisa foram adquiridos no comércio local de São José do Rio Preto – SP: extrato de malte DME, lúpulo, leveduras e reatores de vidro. Bomba de alta temperatura, e reatores de fundo cônico foram adquiridos on-line. O início da pesquisa começou com o preparo dos reatores de vidro e de fundo cônico, com a furação para a colocação dos pontos de coleta de amostras, e montagem do suporte para os mesmos.

2º Passo: Foram realizados dois tipos de ensaios, pequena escala e escala piloto: em pequena escala foram preparados 3 reatores de vidro, utilizando garrafas com capacidade de 1,5L cada (Figura 13: 1), e em escala piloto foram utilizados reatores de fundo cônico com 10L de capacidade, marca Damek[®], fabricados com polipropileno de alta densidade com 3 mm de espessura, e fundo cônico com 60º de inclinação, (Figura 13: 2). Os ensaios foram realizados com duas leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*.

Figura 13: Reatores em pequena e escala piloto utilizados para os ensaios em 12 °C e 18 °C.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

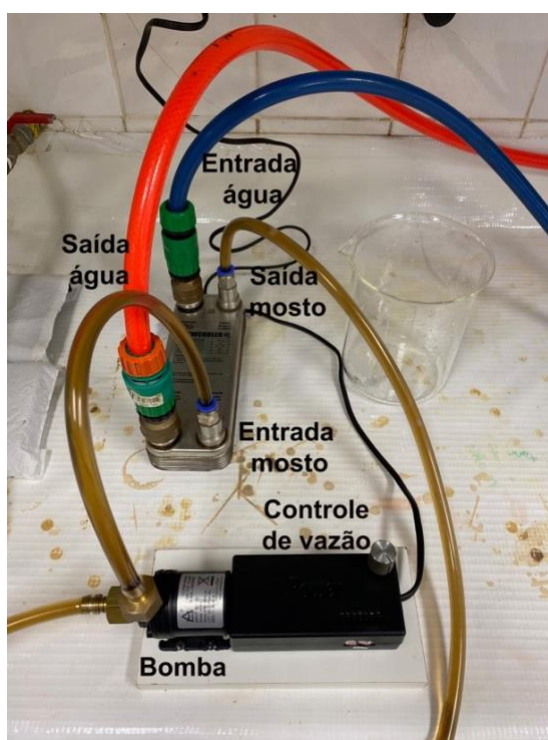
Em pequena escala, foram preparados seis reatores de vidro, três para cada uma das leveduras que foram utilizadas, e, em escala piloto, dois reatores de 10L, um para

cada uma das leveduras. Os mostos foram preparados e inoculados em batelada e em períodos diferentes, e a fermentação ocorreu em temperatura controlada em geladeiras BOD.

3º Passo: Após o preparo dos reatores, foram produzidos os mostos para cada tipo de cerveja, Ale e Lager, utilizando extrato de malte seco (DME), sendo adicionado o extrato de malte na proporção de 150 g/L, tendo como resultado 15ºBrix. Foi iniciada a fervura do mosto por 30 minutos, após foi adicionado o lúpulo Saaz 7,5% (República Tcheca), na proporção de 1 g/L, e continuou a fervura por mais 30 minutos, finalizando com 1 hora de fervura. Esperou-se vinte minutos para a decantação do *trub*, e então o mosto foi resfriado em um trocador de calor de placas tipo *chiller*, bombeando com controle de vazão (Figura 14), utilizando água em temperatura ambiente para o resfriamento, baixando a temperatura de 80°C para 25°C, para então fazer a transferência do mosto para outro recipiente.

Foram utilizados dois tipos de leveduras, Ale e Lager: para a cerveja ale, utilizou-se a levedura SafAle S-04 *Saccharomyces cerevisiae*, marca Fermentis®, na proporção de 0,8g/L; para cerveja lager, utilizou-se a levedura Saflager W-34/70 *Saccharomyces pastorianus*, marca Fermentis®, na proporção de 1,2g/L, não foi adicionada fonte de nutrientes para as leveduras.

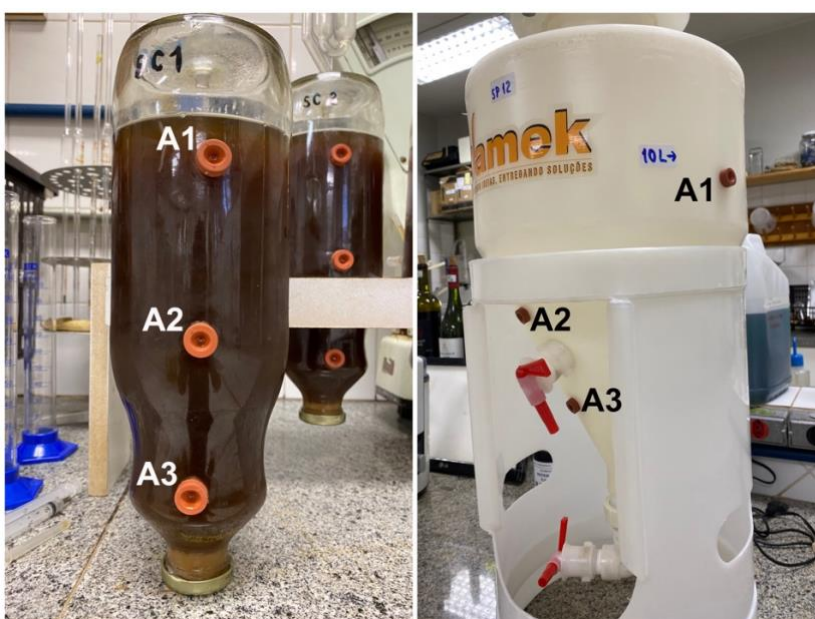
Figura 14: Resfriamento do mosto.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

Os reatores foram resfriados nas temperaturas de 12 °C e 18 °C por um período de 9 dias para pequena escala, e 15 dias para escala piloto. A coleta das amostras foi realizada a cada 24 horas (sempre no período da manhã), e avaliada a viabilidade das leveduras durante a fermentação em três diferentes alturas nos reatores, sendo a Altura 1 (A1) na superfície, Altura 2 (A2) no meio do reator e Altura 3 (A3) próxima ao fundo do reator (Figura 15). As amostras foram coletadas nas diferentes alturas dos reatores, utilizando uma seringa de 3ml e agulha (Figura 16).

Figura 15: Alturas de coleta de amostras nos reatores: A1, A2 e A3.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 16: Método de coleta das amostras nas diferentes alturas dos reatores.

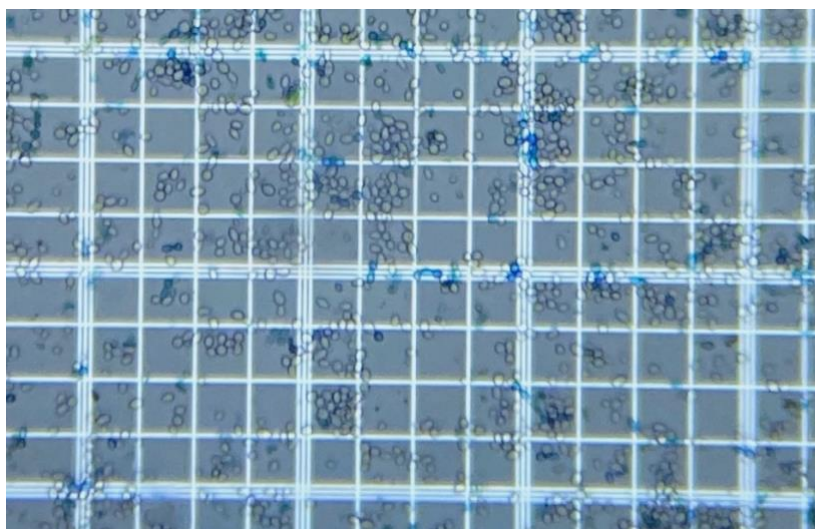


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

4.2 Viabilidade de leveduras pelo método de azul de metileno

Para a análise de viabilidade celular, foi utilizado o método do azul de metileno, onde células viáveis ficam sem coloração e células não viáveis com coloração azul, e dessa forma é realizada a contagem (Figura 17).

Figura 17: Células viáveis sem coloração e células não viáveis com coloração azul.



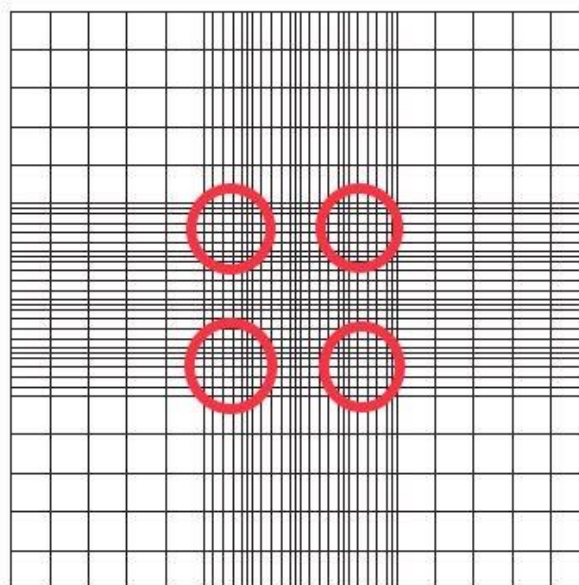
Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Para o início da contagem, foi necessário realizar a diluição das amostras de cerveja (em triplicata), uma vez que, sem diluição, em alguns casos, não é possível realizar a contagem, devido a elevada quantidade de células. Então diluiu-se a amostra na proporção de 1/10, sendo adicionados em um tubo de ensaio 9ml de água deionizada e 1ml da amostra.

Após a diluição, transferiu-se se 1ml da amostra diluída em um tubo de ensaio e em seguida foi adicionado 1ml da solução de azul de metileno a 0,01%. Com uma pipeta Pasteur, foi adicionada uma pequena quantidade de amostra em um dos canais da câmara de Neubauer, até que os canais da câmara estivessem preenchidos juntamente com espaço entre a lamínula e a câmara na sua parte espelhada.

Então foram colocadas em um microscópio (Marca MLW-Junior Lab), primeiro utilizando a objetiva de 10x para localizar os quadrantes, e após usando a objetiva de 40x para realizar a contagem, sendo definido que a contagem seria realizada nos quadrados médios no centro da câmara, realizando a contagem em 4 quadrados situados nos cantos, circulado em vermelho, de acordo com a Figura 18. Todas as amostras foram coletadas em triplicata (CECCATO-ANTONINI, 2012; WANG, LIU, 2020).

Figura 18: Método de contagem de leveduras utilizado.



Fonte: Adaptado pelo autor, 2022.

Após a contagem, foram realizados os cálculos de quantidade de células presentes em cada um dos pontos dos reatores e a porcentagem de células viáveis, com os cálculos abaixo:

- Quantidade de células: $(\text{número de células contadas} / 4 \times 25) \times 4 \times 10^6$

Onde: 4 é o número de sub-quadrantes onde foi realizada a contagem, 25 é o número de sub-quadrantes presentes no quadrante central e 4×10^6 é a extrapolação entre a quantidade de células em um quadradinho para a quantidade de células por ml.

- Porcentagem de células viáveis: $(\text{quantidade de células viáveis} / \text{quantidade de células totais}) \times 100$

4.3 Análises físico-químicas

4.3.1 Sólidos solúveis totais

A análise de sólidos solúveis totais (°Brix) foi realizada através de refratometria: foram coletadas as amostras em triplicata, em cada uma das alturas de coleta dos reatores, colocando três gotas da amostra de cerveja sobre a superfície do prisma do refratômetro portátil (Marca: Gran Index®), e foi observada a leitura através do visor (OIV, 2021).

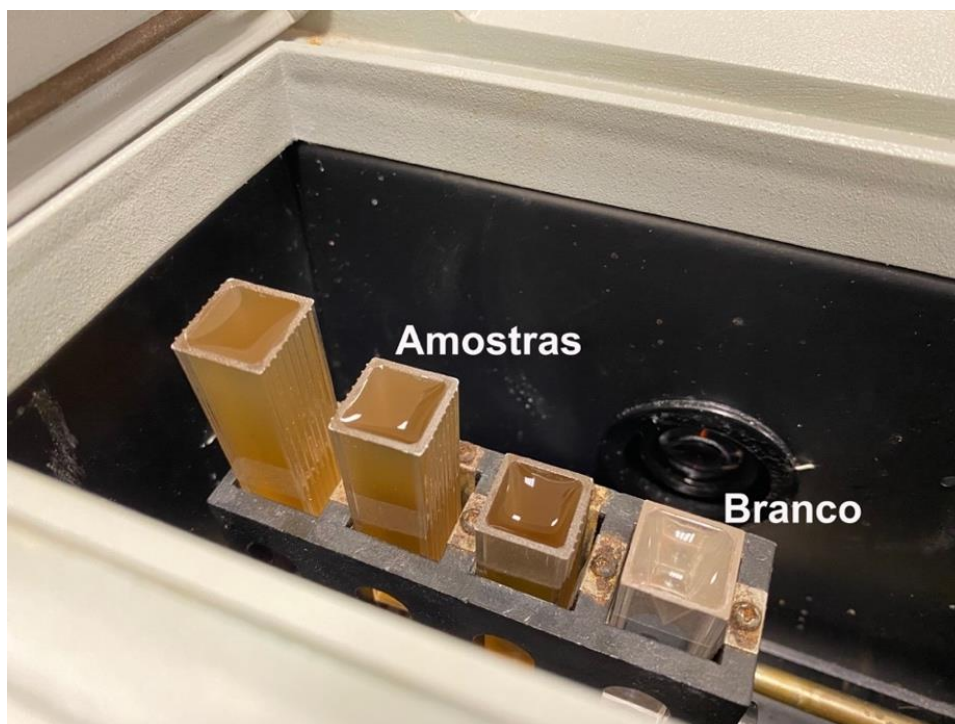
4.3.2 pH

Para a análise de pH foram coletadas amostras em triplicata, em cada uma das alturas de coleta dos reatores. As amostras de cerveja foram colocadas em três béqueres de 100ml e então foi utilizado um pHmetro portátil (Marca: Hanna®), com a amostra cobrindo o bulbo do eletrodo do pHmetro e foi observada a leitura (IAL, 2008).

4.3.3 Concentração de biomassa celular (Densidade ótica)

Para realizar a análise de concentração da biomassa celular, foi utilizada como amostra de referência uma cubeta com água deionizada (Branco), então foram coletadas as amostras de cerveja em cada uma das três alturas de coleta nos reatores em pequena escala, e em escala piloto, em triplicata. As amostras foram diluídas na proporção de 1/2, adicionadas em cubetas de acrílico, e colocadas no espectrofotômetro (Marca: Biospectro, modelo: SP-22), sendo escolhido o comprimento de onda de 600nm. Foi observada a leitura e os dados obtidos foram correlacionados com as leituras em câmara de Neubauer.

Figura 19: Análise de concentração de biomassa celular.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

4.3.4 Densidade e Teor alcoólico

A análise de densidade foi realizada por dois métodos: o primeiro utilizando uma proveta de 100ml, onde foram adicionados 100ml da amostra de cerveja, coletada na altura 3 dos reatores. Para a leitura da densidade, foi utilizado um mini-densímetro e foi observada a leitura (Figura 20). Através desta leitura, realizou-se o cálculo para a obtenção do teor alcoólico, utilizando o método ABV (Alcohol By Volume) através da seguinte equação: (AOAC, 2005, IAL, 2008)

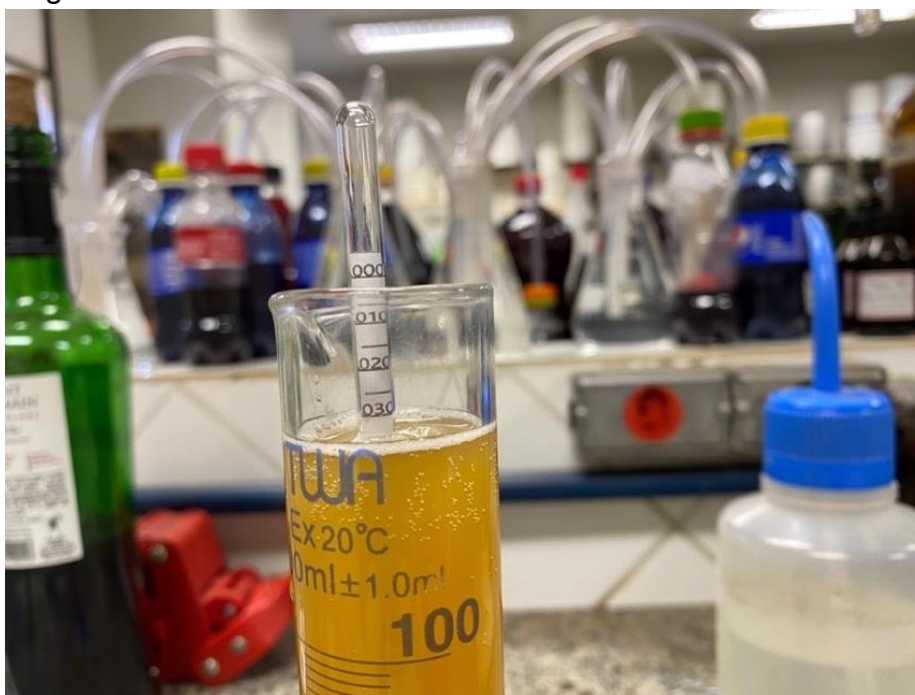
$$(D_i - D_f) \times 131,25 = \text{Teor alcoólico}$$

Onde:

D_i : Densidade inicial

D_f : Densidade Final

Figura 20: Leitura da densidade utilizando um mini densímetro.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

A análise estatística das análises físico-químicas foi realizada através dos softwares Microsoft Excel® e Minitab®, com os resultados sendo mostrados em média \pm desvio padrão e avaliada através de análise de variância fator único (One Way Anova) e teste de comparação múltipla de Tukey com significância de 0,05% ($P \leq 0,05$), e nos gráficos as linhas vermelhas nas colunas indicam o desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados a seguir foram obtidos utilizando as leveduras SafAle S-04 *Saccharomyces cerevisiae*, para cerveja Ale, de fermentação alta, e a levedura Saflager W-34/70 *Saccharomyces pastorianus*, para cerveja Lager, de fermentação baixa. Os mostos foram fermentados em duas temperaturas, em reatores de vidro para pequena escala (P.E) (1,5L de capacidade) e reatores em polipropileno de alta densidade para escala piloto (E.P) (10L de capacidade). As amostras para as análises de viabilidade foram coletadas em cada uma das alturas nos reatores, a cada 24h, conforme descrito no tópico 4.1, onde cada altura pode ser interpretada como um reator dentro do reator. A partir deste tópico, os reatores em Pequena Escala e Escala Piloto serão mencionados no texto como P.E e E.P respectivamente.

5.1 Análise de viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* em Pequena Escala (P.E)

5.1.1 Altura 1 (Superfície do mosto)

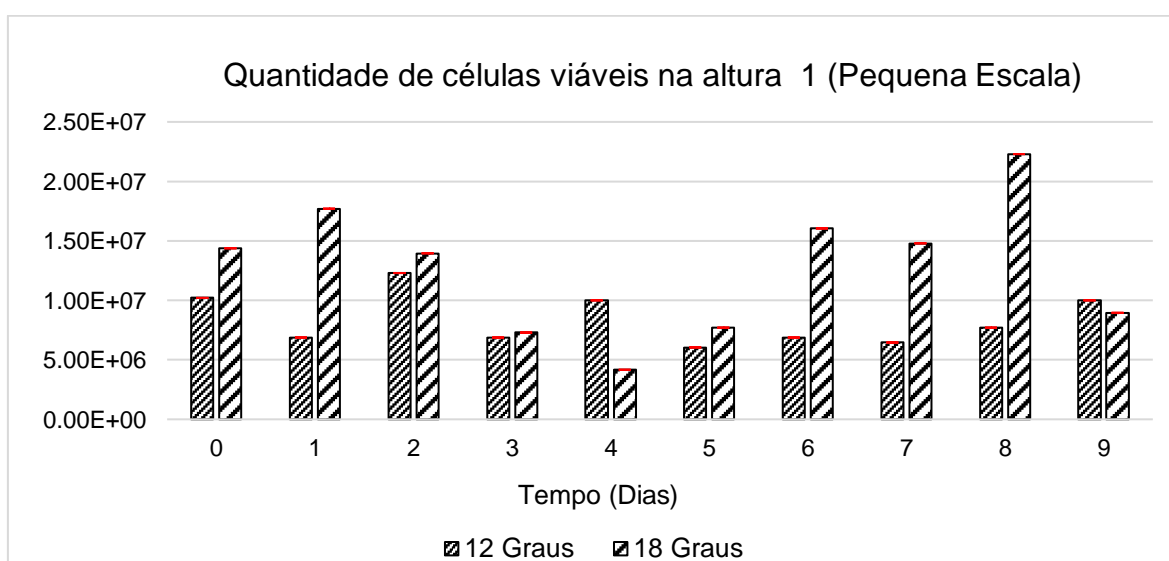
A *Saccharomyces cerevisiae* tem como característica ser uma levedura de fermentação alta, como já dito anteriormente, com temperaturas de fermentação entre 14 °C e 25 °C, sendo assim a temperatura de 12 °C causa possível estresse estando abaixo da temperatura ideal, e 18 °C estando dentro de sua faixa de temperatura ideal.

Nas figuras 21 e 22, estão os dados de viabilidade celular obtidos na altura 1 (próximo da superfície do mosto) no reator, (reator de vidro de 1,5L) em 12 °C e 18 °C, no período do tempo 0 ao 9. Pode-se ver nas figuras 21 e 22, que viabilidade celular e a quantidade total de células (viáveis e não viáveis) durante a fermentação ocorre de forma semelhante ao longo do tempo nas duas temperaturas. Em ambas temperaturas, a fase exponencial (Figura 21) aconteceu do tempo 0 ao 2, ficando em 10^7 , e se estabilizando a partir do tempo 5 para o 6 até tempo 8, quando a quantidade de leveduras voltou a subir em 18 °C.

A temperatura de 12 °C inibiu o aumento na quantidade leveduras na superfície do mosto, mas do tempo 0 a 9, tanto a quantidade de leveduras viáveis quanto a quantidade total de células ficaram praticamente estabilizadas. É importante notar que em 12 °C, a mesma quantidade de leveduras viáveis presentes no tempo 0 ($1,02 \times 10^7$)

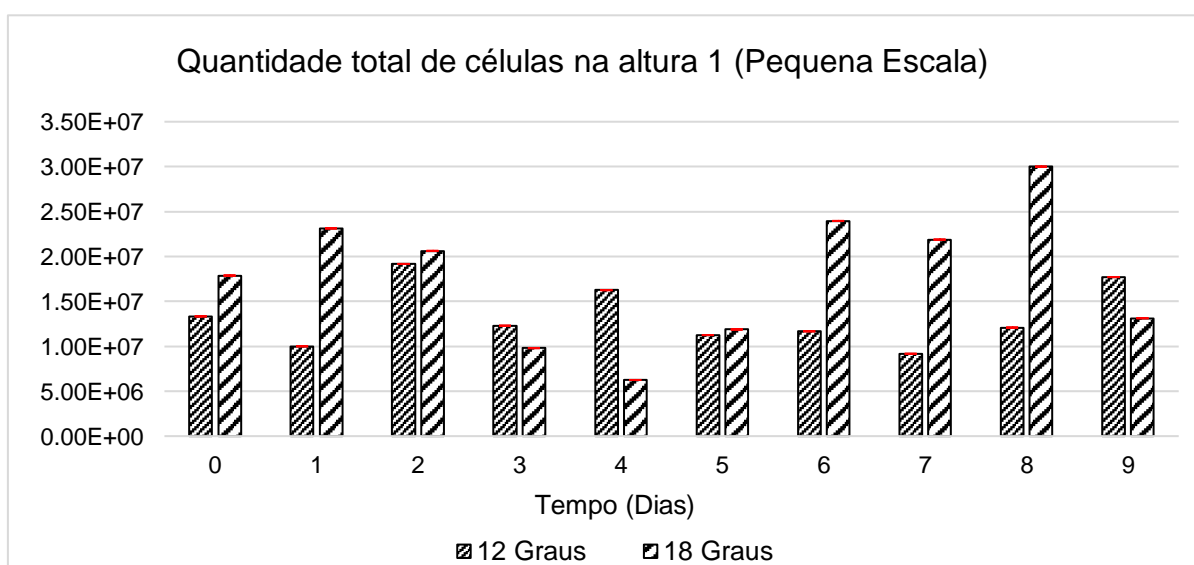
se manteve no final da fermentação tempo 9, finalizando com $1,00 \times 10^7$, e o mesmo se aplica para quantidade total de leveduras, quando se observa o tempo 0 e o tempo 9. A porcentagem de células viáveis ao longo dos tempos foi semelhante nas duas temperaturas, maior em 18 °C, iniciando em 81%, e diminuindo a partir do tempo 1, finalizando em 56% no tempo 9. Em 12 °C, a porcentagem de leveduras viáveis iniciou-se com 77% diminuindo também a partir do tempo 1 e finalizando a partir do tempo 9 em 68%, tabela 6.

Figura 21: Quantidade de células viáveis por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 22: Quantidade total de células por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 6: Porcentagem de viabilidade celular na altura 1 em P.E.

Altura 1		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	77%	81%
1	63%	69%
2	64%	68%
3	56%	74%
4	67%	62%
5	54%	65%
6	59%	76%
7	70%	68%
8	64%	74%
9	68%	56%

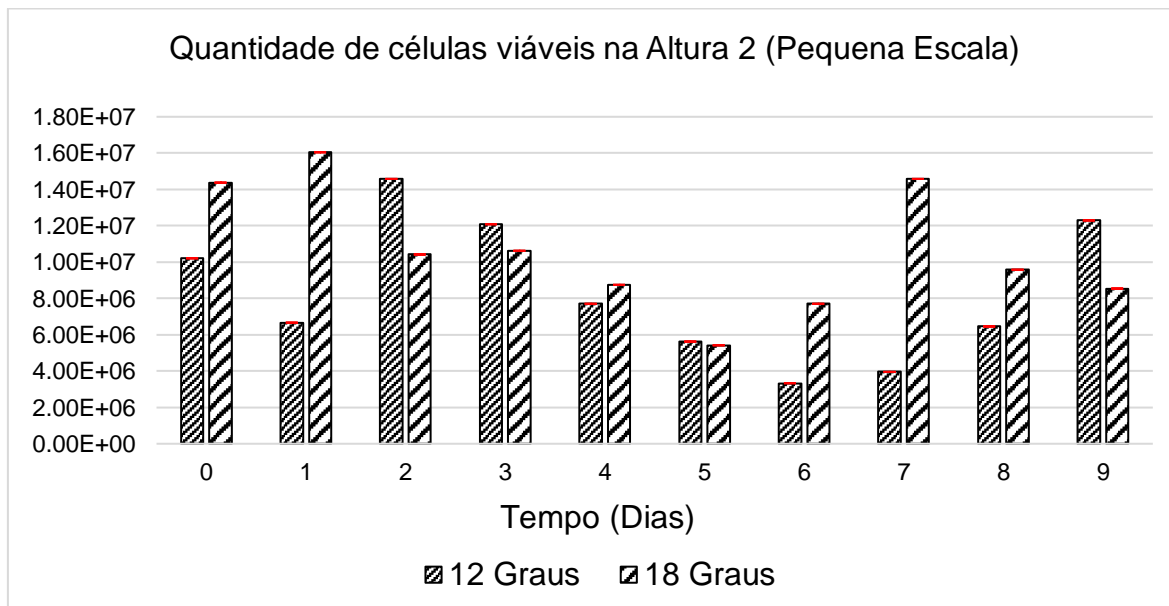
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.2 Altura 2 do reator (Meio do Reator)

Na altura 2, vemos que a fermentação teve uma menor quantidade de células viáveis (Figura 23), tendo uma fase de subida ou fase exponencial em 18 °C no tempo 0 e 1, se mantendo em 10^7 , caindo e ficando estável até o tempo 5, o mesmo acontecendo com a quantidade total de células nesta altura do reator, ou seja, no meio do reator (Figura 24), do tempo 6 ao 7 houve um salto tanto na quantidade de leveduras viáveis quanto na quantidade de leveduras totais em 18 °C, tendo uma segunda fermentação.

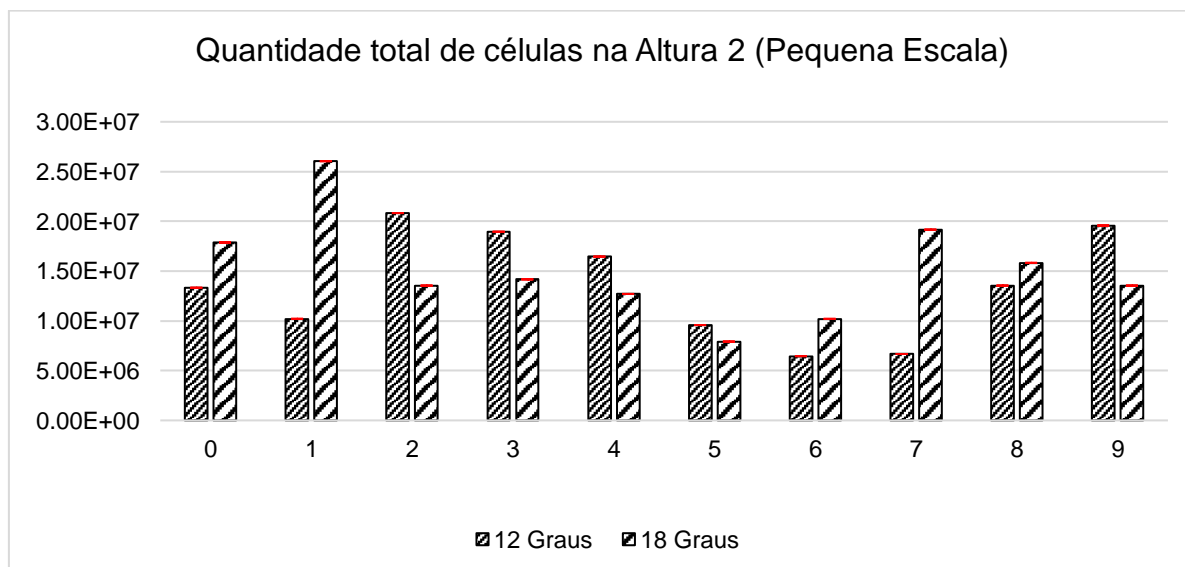
Em 12 °C, a fase lag da levedura foi maior, e a fase de crescimento celular foi no tempo 2 e logo após decaindo e voltando a subir a partir do tempo 6 até o 9, onde pode ser observado uma segunda fermentação, mais lenta que em 18 °C, tanto para quantidade de leveduras viáveis quanto para células totais (Figuras 23 e 24). Até esta altura no reator, a fermentação ocorreu de forma semelhante não se limitando apenas a altura 1. Na tabela 7, temos as porcentagens de leveduras viáveis na altura 2 do reator em P.E, iniciou com as mesmas porcentagens da altura 1, e foi reduzindo a partir do tempo 1, e finalizando com 63% para 12 °C e 59% para 18 °C.

Figura 23: Quantidade de células viáveis por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 24: Quantidade total de células por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 7: Porcentagem de viabilidade celular na altura 2 em P.E.

Altura 2		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	77%	81%
1	59%	65%
2	70%	77%
3	64%	75%
4	69%	47%
5	59%	68%
6	52%	76%
7	59%	76%
8	48%	61%
9	63%	59%

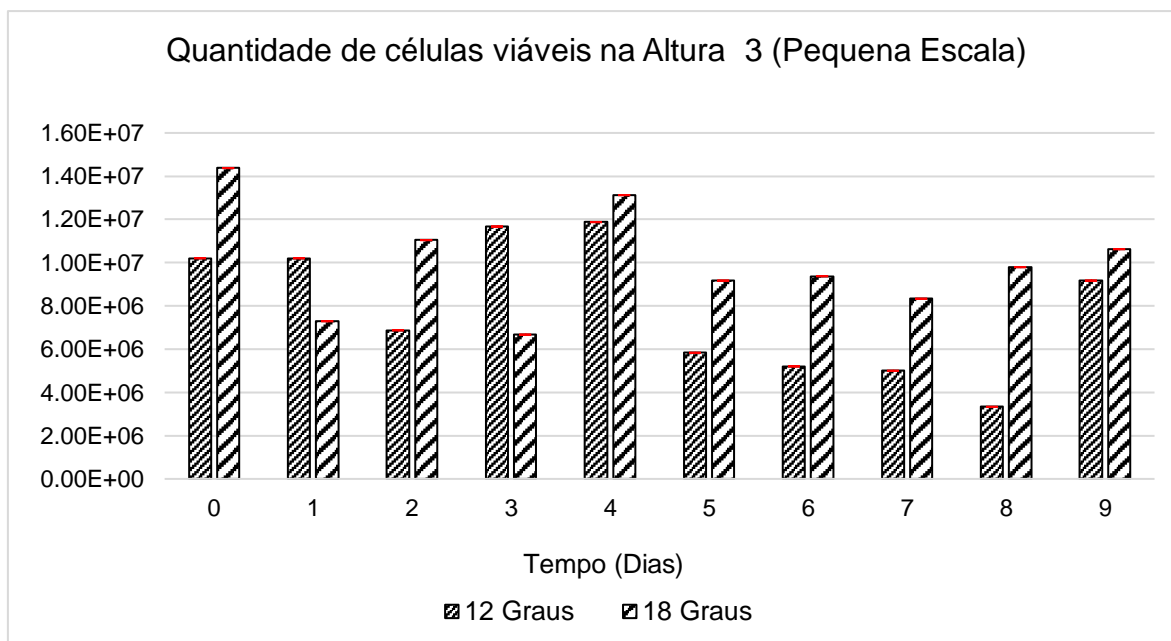
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.3 Altura 3 do reator (Próximo ao fundo do Reator)

Descendo para a altura 3, que é próximo ao fundo do reator, vemos que a fermentação não ocorreu de forma uniforme, tanto em relação a quantidade de leveduras viáveis, quanto em relação a quantidade total de leveduras (viáveis e não viáveis), Figuras 25 e 26. Em 18 °C, a viabilidade celular e a quantidade total de leveduras ficaram oscilando entre os tempos 0 e 4, entre 10^6 e 10^7 , diminuindo no tempo 5 e subindo levemente até o tempo 9, o mesmo acontecendo com a quantidade total de leveduras, se estabilizando e indicando o final da fermentação. Em 12 °C, a viabilidade celular se manteve estável nos tempos 0 e 1, estando em 10^7 e diminuindo para 10^6 no tempo 2, nos tempos 3 e 4 a viabilidade aumentou novamente para 10^7 e a partir do tempo 4 foi diminuindo para 10^6 novamente, indicando o fim da fermentação. No tempo 9, houve um aumento tanto da quantidade de leveduras viáveis quanto da quantidade total de leveduras.

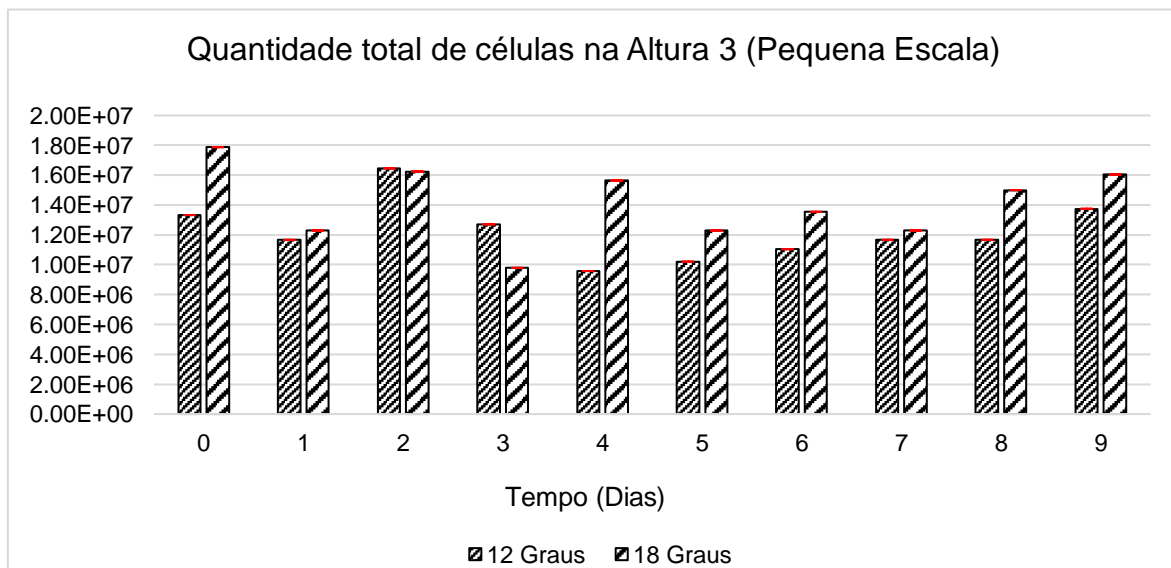
Na altura 3, a porcentagem de leveduras viáveis, da mesma forma que nas alturas 1 e 2, estiveram maiores na fermentação de 18 °C, iniciando em 81% e 77% para 12 °C, ao final dos 9 tempos ou dias analisados a viabilidade se reduziu para 62% e 66% para 12 °C e 18 °C respectivamente, Tabela 8.

Figura 25: Quantidade de células viáveis por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26: Quantidade total de células por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

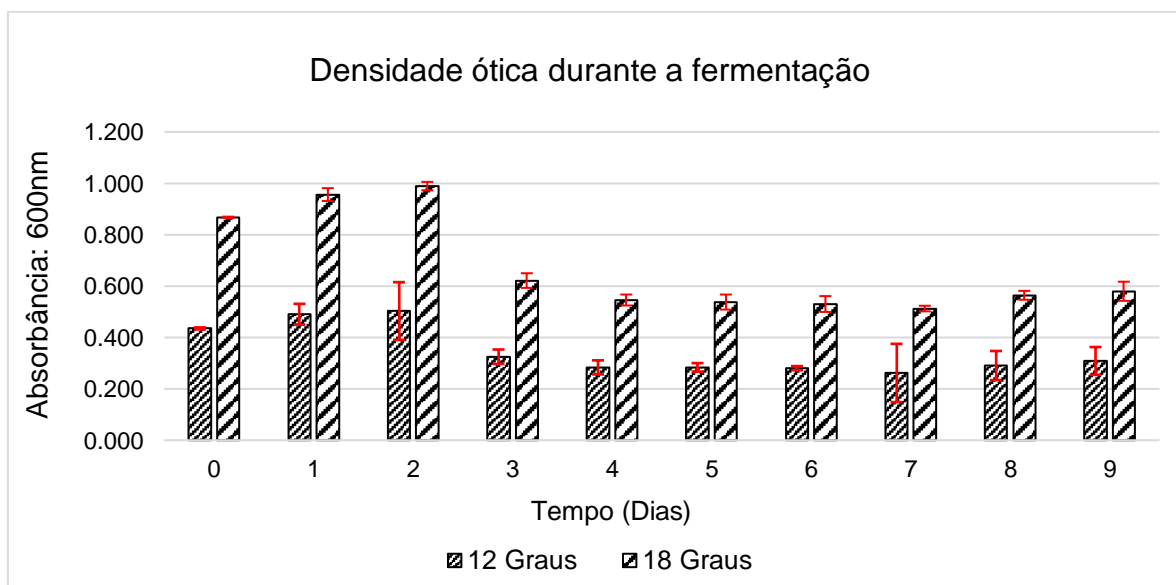
Tabela 8: Porcentagem de viabilidade celular na altura 3 em P.E.

Altura 3		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	77%	81%
1	59%	52%
2	66%	68%
3	68%	62%
4	63%	83%
5	57%	75%
6	55%	69%
7	57%	68%
8	64%	65%
9	62%	66%

Fonte: Elaborado pelo autor.

A densidade ótica mostra que durante a fermentação houve uma precipitação das leveduras ao longo dos 10 tempos analisados (Figura 27), a maior quantidade de leveduras viáveis e não viáveis ficaram em 18 °C, onde pode-se ver a fase exponencial da fermentação nos tempos 0 a 3, a partir do tempo 3 se estabilizando até o tempo 9, o mesmo comportamento ocorreu com a fermentação em 12 °C. Na figura 28, vemos o comportamento da *Saccharomyces cerevisiae* em 18°C do tempo 0 ao 7, onde pode ser observado uma precipitação das leveduras a partir do tempo 2 para o 3, em 12 °C acontece o mesmo comportamento de forma mais lenta.

Figura 27: Densidade ótica durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

5.1.4 Análises Físico-químicas

O °Brix inicial para 12 °C e 18 °C foi de 16,4 e 16,2, respectivamente. Em 12 °C, o °Brix se estabilizou em 14,1 a partir do tempo 6, finalizando em 14,0 no tempo 9. Em 18 °C, o °Brix se estabilizou em 14,0 do tempo 6 para o 7, finalizando em 14,0 no tempo 9. Houve diferença estatística nos tempos e nas duas temperaturas, Tabela 9.

Todas as fermentações foram realizadas em períodos diferentes e com diferentes marcas de extrato de malte, o que pode explicar a baixa fermentação.

Tabela 9: °Brix durante a fermentação em 12°C e 18°C em P.E.

Tempo (Dias)	°Brix			
	12 Graus		18 Graus	
0	16.4	±0.115 ^a	16.2	±0.058 ^a
1	16.0	±0.058 ^a	16.0	±0.058 ^a
2	15.4	±0.058 ^a	15.2	±0.058 ^a
3	15.3	±0.058 ^a	14.8	±0.346 ^a
4	15.1	±0.058 ^a	14.6	±0.346 ^a
5	15.0	±0.058 ^a	14.2	±0.058 ^a
6	14.0	±0.058 ^a	14.1	±0.058 ^a
7	14.0	±0.058 ^a	14.0	±0.058 ^a
8	14.1	±0.058 ^a	14.0	±0.058 ^a
9	14.0	±0.058 ^a	14.0	±0.058 ^a

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

O pH para 12 °C iniciou em 5,63 e finalizou em 3,89 no tempo 9. Já em 18 °C teve início em 5,67 finalizou também em 3,89 no tempo 9. Nas duas temperaturas, não houve diferença estatística, Tabela 10.

Tabela 10: pH durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E.

Tempo (Dias)	pH			
	12 Graus		18 Graus	
0	5.63	±0.015 ^a	5.67	±0.006 ^a
1	4.41	±0.012 ^a	4.32	±0.006 ^a
2	4.25	±0.012 ^a	4.19	±0.010 ^a
3	4.21	±0.006 ^a	4.11	±0.006 ^a
4	4.15	±0.006 ^a	4.05	±0.010 ^a
5	4.12	±0.006 ^a	4.03	±0.012 ^a
6	4.04	±0.006 ^a	4.00	±0.006 ^a
7	3.97	±0.006 ^a	3.90	±0.006 ^a
8	3.98	±0.006 ^a	3.92	±0.006 ^a
9	3.89	±0.010 ^a	3.89	±0.012 ^a

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

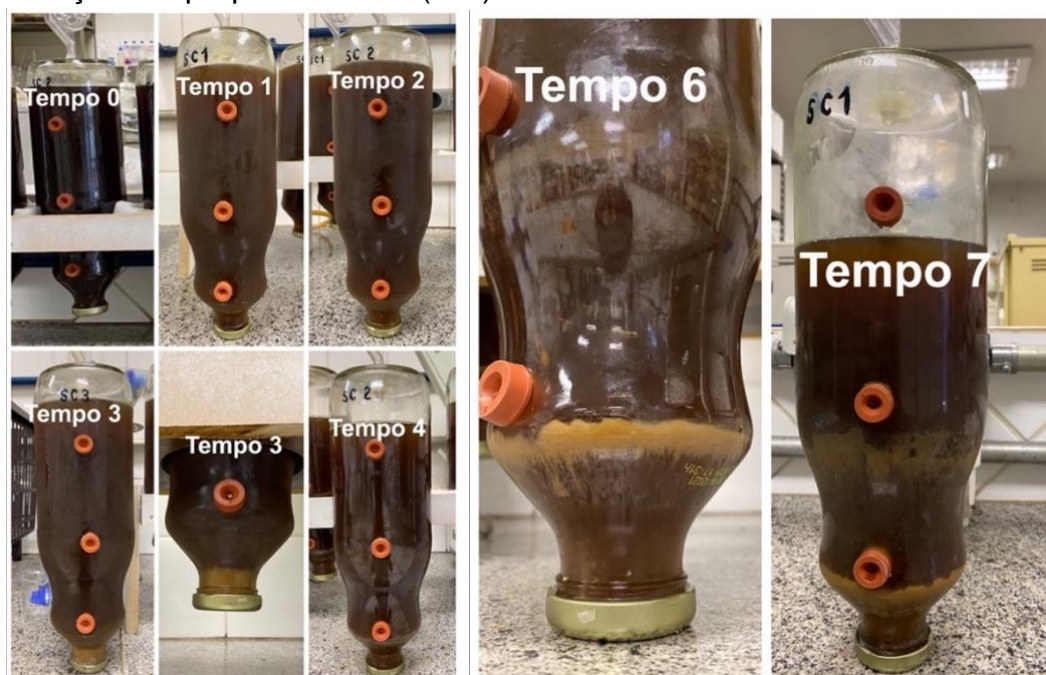
O teor alcoólico ficou baixo (Tabela 11), tanto em 12 °C, como em 18 °C, finalizou no tempo 9 com 1,24% para 12 °C e 1,23% para 18 °C. De acordo com legislação brasileira, a cerveja produzida com teor alcoólico acima de 0,5% e igual ou inferior a 2,0% é classificada como cerveja de teor alcoólico reduzido ou cerveja com baixo teor alcoólico. Assim, seguindo a legislação brasileira a cerveja produzida foi uma ale com teor alcoólico reduzido (BRASIL, 2019). Não houve diferença estatística entre as duas temperaturas.

Tabela 11: Teor alcoólico durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E.

Tempo (Dias)	Teor alcoólico			
	12 Graus		18 Graus	
0	0.00%	±0.000 ^a	0.00%	±0.000 ^a
1	0.19%	±0.001 ^a	0.09%	±0.000 ^a
2	0.57%	±0.001 ^a	0.60%	±0.000 ^a
3	0.62%	±0.001 ^a	0.80%	±0.002 ^a
4	0.70%	±0.001 ^a	0.91%	±0.002 ^a
5	0.75%	±0.001 ^a	1.12%	±0.001 ^a
6	1.30%	±0.001 ^a	1.22%	±0.000 ^a
7	1.31%	±0.001 ^a	1.23%	±0.000 ^a
8	1.24%	±0.001 ^a	1.21%	±0.000 ^a
9	1.24%	±0.001 ^a	1.23%	±0.000 ^a

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28: Comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em 18 °C durante a fermentação em pequena escala (P.E).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

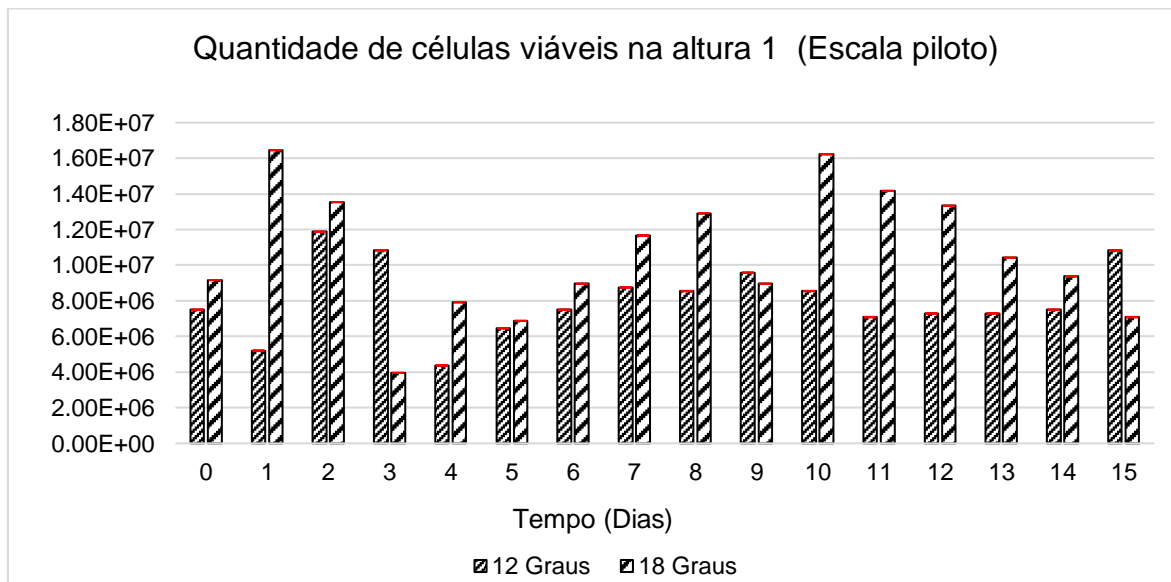
5.2 Análise de viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* em Escala Piloto (E.P)

5.2.1 Altura 1 (Superfície do mosto)

As fermentações em ambas as temperaturas utilizadas aconteceram de forma semelhante com a altura 1 em P.E, na altura 1 em E.P (Figura 29), tendo a fase exponencial no tempo 1 em 18 °C, com $1,65 \times 10^7$ células de levedura por ml, e se mantendo em 10^7 até o tempo 2, diminuindo para 10^6 no tempo 3, quando a quantidade de células viáveis sobe novamente de forma instável até o tempo 10 chegando a $1,62 \times 10^7$ (segunda fermentação), mesma quantidade do tempo 1, quando começa cair novamente finalizando no tempo 15 com $7,08 \times 10^6$ células de levedura por ml. Em 12 °C, o comportamento da levedura foi mais lento, com a fase exponencial no tempo 2, oscilando até o final no tempo 15. Comparando com 18 °C, as fases da fermentação foram mais acentuadas, devido a baixa temperatura.

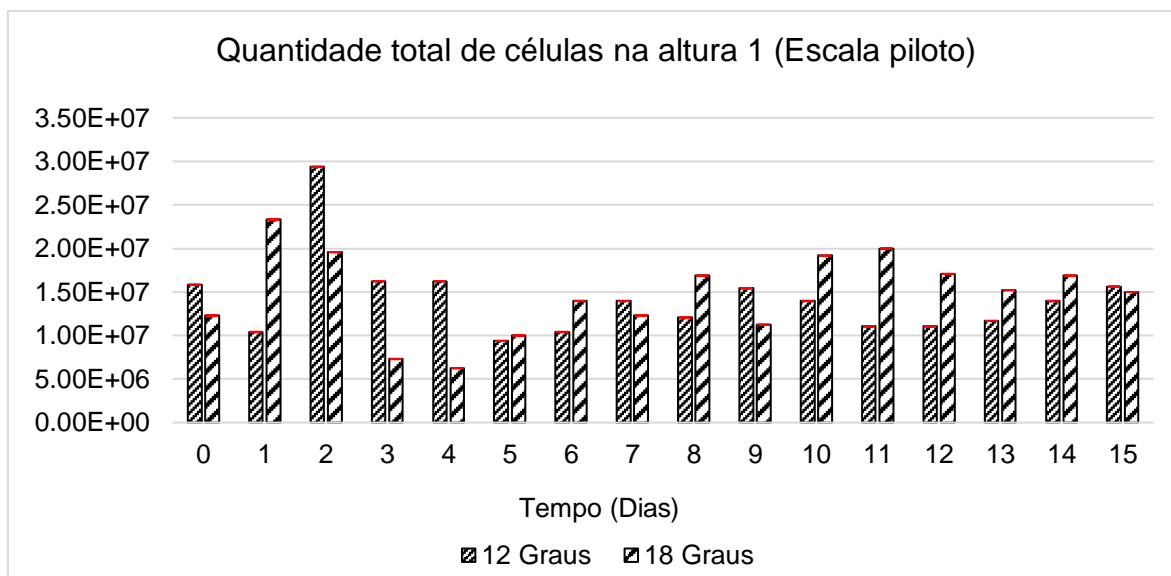
Observa-se que a quantidade de células viáveis no tempo 0, início da fermentação e no tempo 15, o final, foi próxima nas duas temperaturas. A quantidade total de leveduras também mostra esse comportamento (Figura 30) das leveduras na superfície do mosto. A porcentagem de leveduras viáveis, ao longo dos 16 tempos ou dias de fermentação, esteve maior, a exemplo da fermentação em P.E, na temperatura de 18 °C, na maior parte dos tempos, iniciando em 62% em 12 °C e 75% para 18 °C, sendo que nos tempos 9 e 10 em 18 °C, a viabilidade esteve acima de 80%, e no final do período de fermentação, no tempo 15, a fermentação de 12 °C apresentou maior viabilidade com 69%, em 18 °C com 56%, Tabela 12.

Figura 29: Quantidade de células viáveis por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 30: Quantidade total de células por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

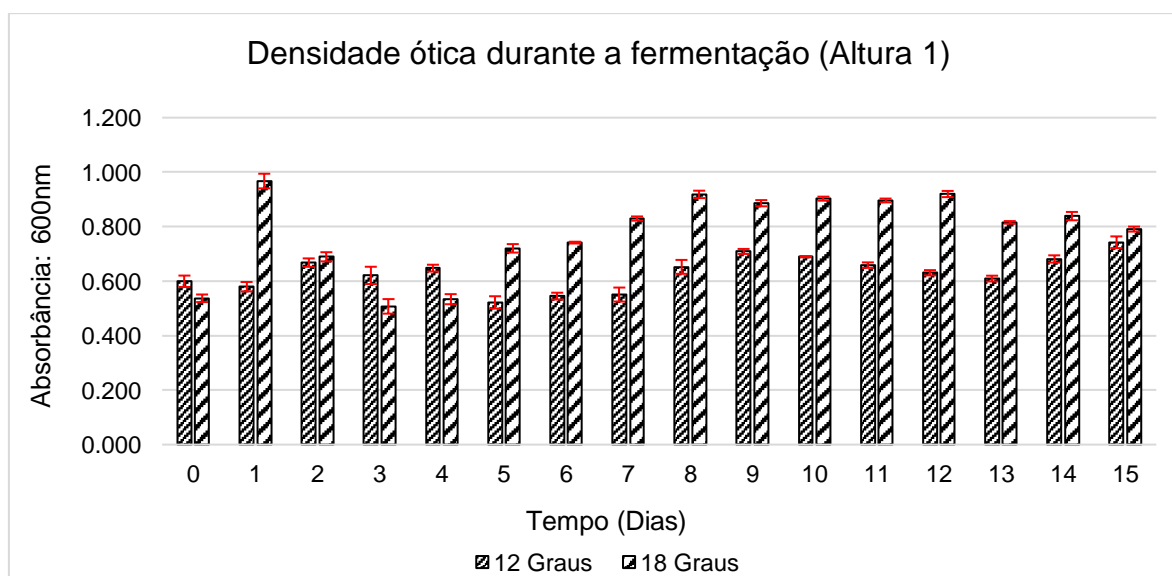
Tabela 12: Porcentagem de viabilidade celular na altura 1 E.P.

Tempo	Altura 1	
	%Viabilidade	
	12 Graus	18 Graus
0	62%	75%
1	50%	71%
2	64%	69%
3	67%	54%
4	49%	70%
5	69%	70%
6	72%	64%
7	63%	76%
8	71%	77%
9	62%	80%
10	61%	85%
11	64%	71%
12	66%	78%
13	63%	68%
14	54%	56%
15	69%	56%

Fonte: Elaborado pelo autor.

A densidade ótica da altura 1 (Figura 31) mostra uma maior quantidade de leveduras em 18 °C, que diminuem do tempo 2 até o tempo 4, e a fermentação se mantendo estável até o final no tempo 15, o mesmo ocorrendo com a fermentação em 12°C.

Figura 31: Densidade ótica na altura 1 em 12 °C e 18 °C em E.P.

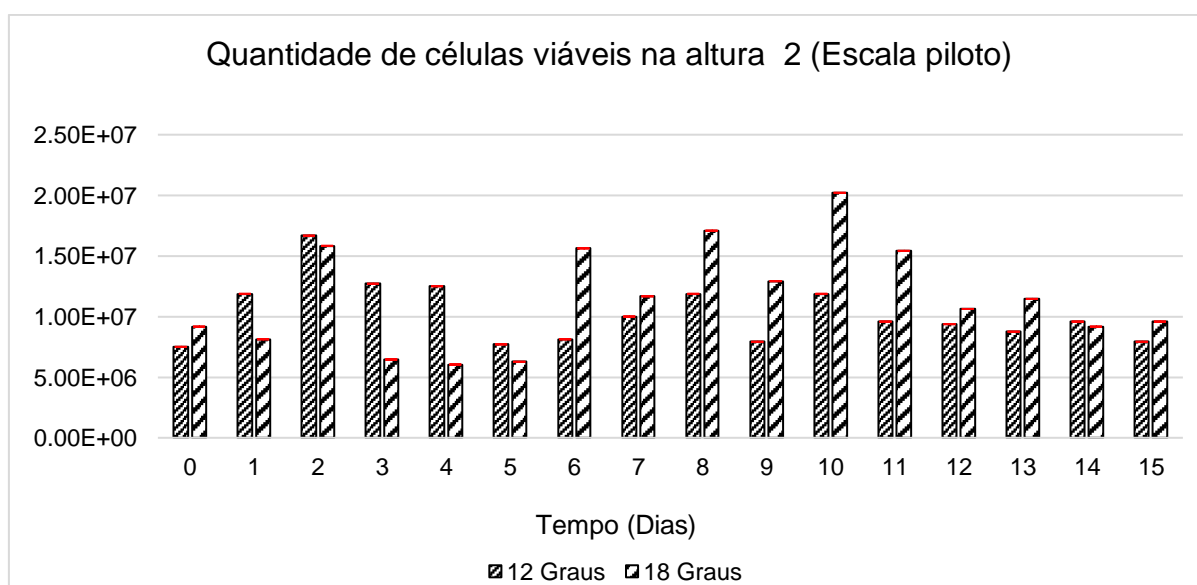


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

5.2.2 Altura 2 do reator (Meio do Reator)

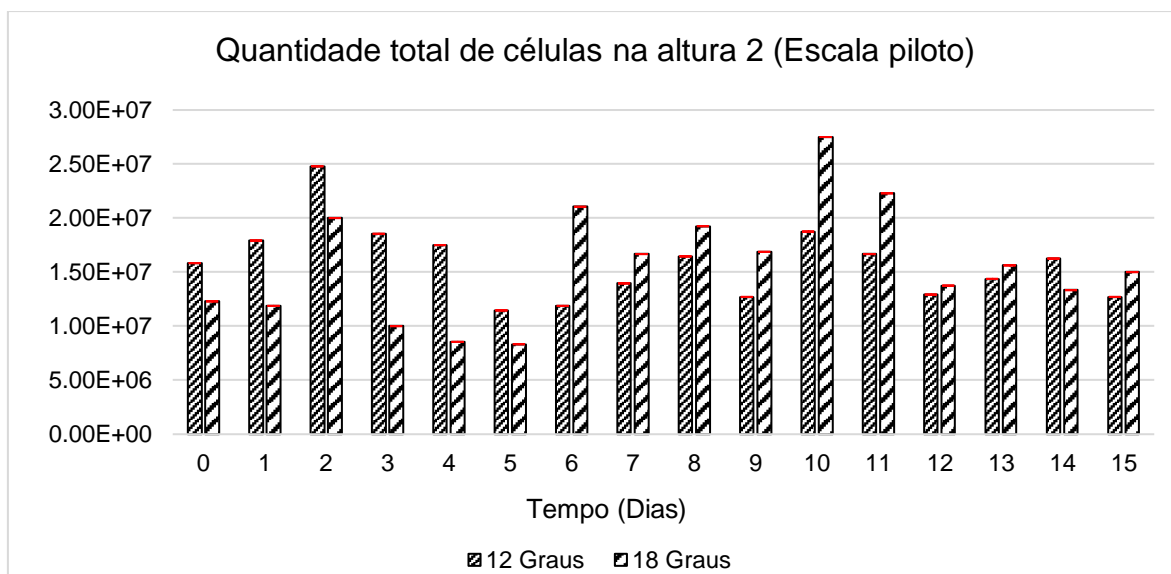
Na altura 2, no meio do reator, a fermentação teve um melhor desempenho no início, do tempo 0 ao 4 na temperatura mais baixa, em 12 °C, tanto em relação a quantidade de células viáveis, quanto em relação a quantidade total de células de leveduras (viáveis e não viáveis), Figuras 32 e 33, mas, a partir do tempo 6, a fermentação em 18 °C se inverte em relação a fermentação em 12 °C. As duas temperaturas se mantiveram em 10^7 na maior parte do período de 15 dias da fermentação. Nas figuras 32 e 33, vemos as fases da fermentação acontecendo nas duas temperaturas no meio do reator, com a fase exponencial no tempo 2 e acontecendo uma segunda fermentação a partir do tempo 9. Na tabela 13, temos os dados de porcentagem de viabilidade das leveduras na altura 2, continuando com a maior viabilidade em 18 °C, com início em 75%, atingindo o máximo de 79% de viabilidade no tempo 2, e 78% no tempo 5, e finalizando no tempo 15 com 64%. Em 12 °C teve início com 72%, caindo e subindo no tempo 3 para 76%, e finalizando com 62% no tempo 15.

Figura 32: Quantidade de células viáveis por ml na altura 2 em 12°C e 18 °C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 33: Quantidade total de células por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 13: Porcentagem de viabilidade celular na altura 2 em E.P.

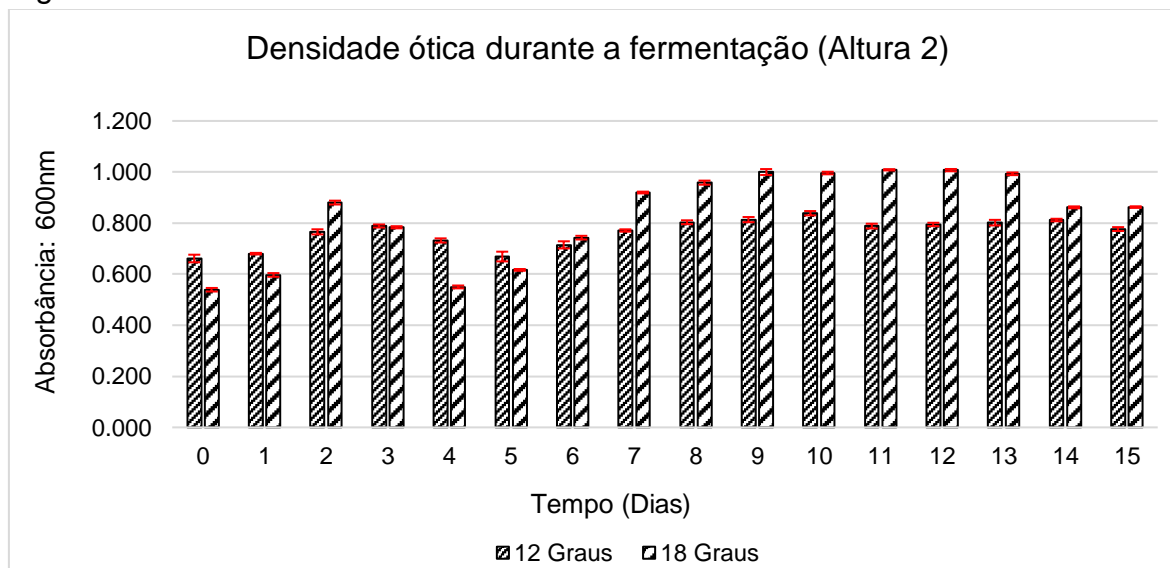
Altura 2		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	72%	75%
1	66%	68%
2	67%	79%
3	76%	65%
4	71%	71%
5	67%	78%
6	68%	74%
7	72%	70%
8	72%	77%
9	62%	77%
10	63%	73%
11	58%	69%
12	73%	77%
13	61%	73%
14	59%	56%
15	62%	64%

Fonte: Elaborado pelo autor.

A densidade ótica (Figura 34) mostra que a o trabalho das leveduras na altura 2 ocorreu de maneira mais equilibrada durante todo o período de 15 dias das duas temperaturas utilizadas. Como esperado a temperatura com a maior quantidade de

células de levedura é 18 °C, mas em 12 °C a quantidade de células de levedura ficou bem próxima.

Figura 34: Densidade ótica na altura 2 em 12 °C e 18 °C em E.P.

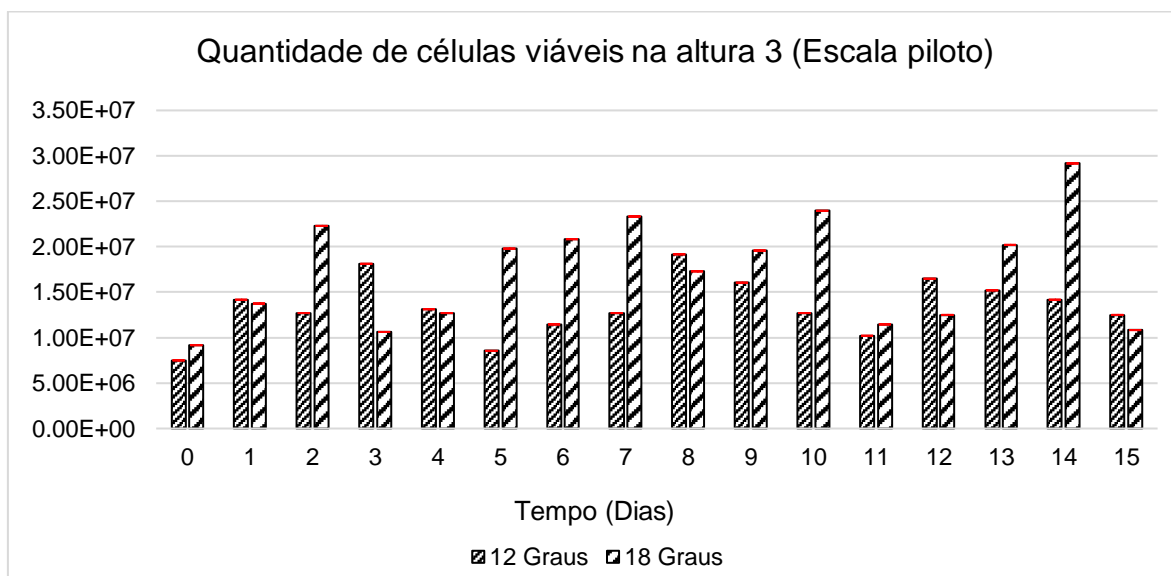


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

5.2.3 Altura 3 do reator (Próximo ao fundo do Reator)

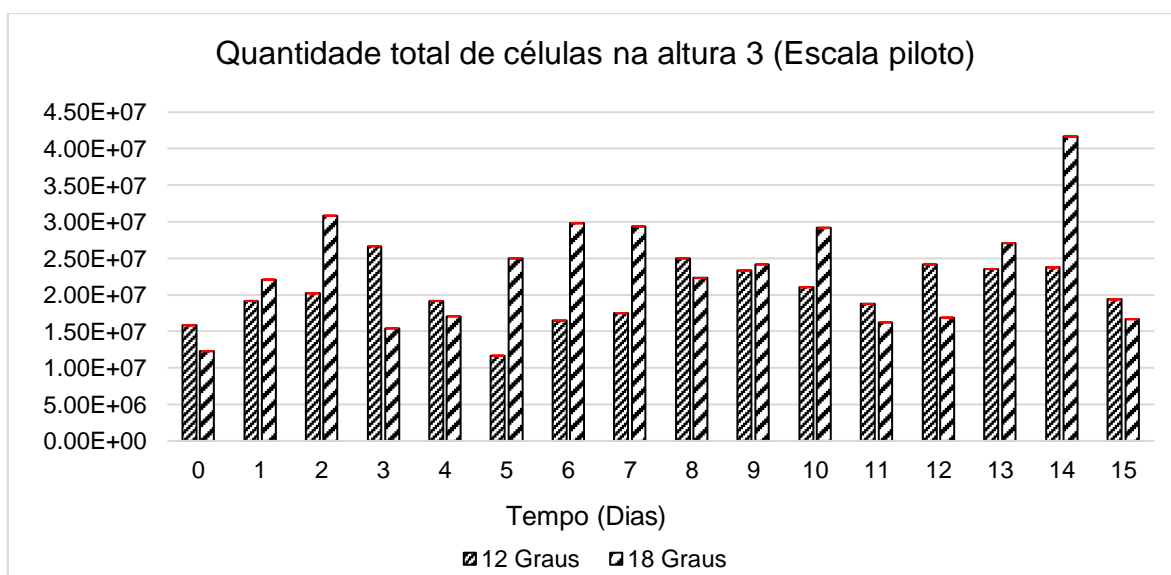
Chegando na altura 3, próximo ao fundo do reator, a maior quantidade de leveduras viáveis (Figura 35) ficaram em 18 °C, iniciando em $9,17 \times 10^6$, com oscilações em 10^7 , tendo um pico de $2,92 \times 10^7$ no tempo 14. Em 12 °C, a fase exponencial ocorreu entre os tempos 1 e 3, diminuindo para 10^6 , subindo e se mantendo em 10^7 com oscilações até o final, no tempo 15. Com a quantidade total de leveduras, o comportamento da levedura ocorreu de maneira semelhante (Figura 36), com a maior quantidade de leveduras viáveis e não viáveis em 18 °C, com um pico de $4,17 \times 10^7$ no tempo 14, sendo que as duas fermentações se mantiveram em 10^7 durante os 15 tempos ou dias, com oscilações. Próximo do fundo do reator, a porcentagem de células viáveis (Tabela 14) foi maior que nas alturas 1 e 2 na fermentação de 18 °C, iniciando em 75% e subindo para 81% e 82% nos tempos 8, 9 e 10, finalizando em 65%. Em 12 °C, começou com 72% no tempo 0, com maior viabilidade no tempo 8 em 77%, e finalizando no tempo 15 em 65%, Tabela 14.

Figura 35: Quantidade de células viáveis por ml na altura 3 em 12 °C e 18°C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 36: Quantidade total de células por ml na altura 3 em 12 °C e 18 °C em E.P



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

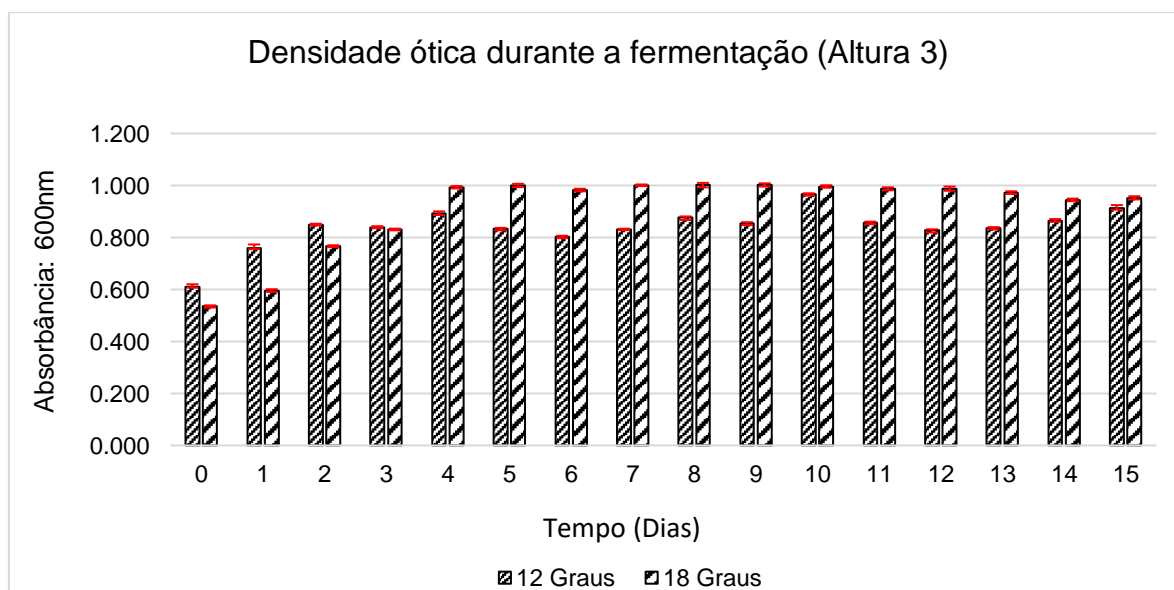
Tabela 14: Porcentagem de viabilidade celular na altura 3 em E.P.

Altura 3		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	72%	75%
1	72%	64%
2	63%	72%
3	68%	69%
4	68%	74%
5	73%	79%
6	70%	79%
7	73%	78%
8	77%	81%
9	69%	82%
10	60%	82%
11	54%	71%
12	61%	74%
13	65%	75%
14	60%	70%
15	65%	65%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Da mesma forma que na altura 2, a densidade ótica mostra que o comportamento da levedura se manteve estável durante os 15 tempos analisados, subindo do tempo 0 até o 4 e se mantendo estacionado com pequena variação até o final no tempo 15.

Figura 37: Densidade ótica na altura 3 em 12 °C e 18 °C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

5.2.4 Análises Físico-químicas

O °Brix inicial em 12 °C e 18 °C foi de 16,0 e 15,3 respectivamente (Tabela 15), o consumo de substrato ocorreu com maior velocidade em 18 °C, baixando de 15,3 no tempo 0 para 11,3 °Brix no tempo 15. Em 12 °C, o consumo de substrato ocorreu de forma mais lenta por conta da temperatura mais baixa, e finalizando em 13.1 °Brix. Na tabela 15, vemos que houve diferença estatística entre as temperaturas 12 °C e 18 °C.

Tabela 15: °Brix durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P.

Tempo	Brix			
	12 Graus		18 Graus	
0	16.0	±0.000 ^a	15.3	±0.058 ^b
1	15.3	±0.058 ^a	15.0	±0.058 ^b
2	15.0	±0.058 ^a	14.0	±0.058 ^b
3	14.8	±0.346 ^a	14.1	±0.058 ^b
4	14.6	±0.346 ^a	14.0	±0.058 ^b
5	14.4	±0.058 ^a	13.5	±0.058 ^b
6	14.2	±0.058 ^a	13.0	±0.058 ^b
7	14.1	±0.058 ^a	13.0	±0.058 ^b
8	14.0	±0.058 ^a	12.5	±0.058 ^b
9	14.0	±0.000 ^a	12.4	±0.058 ^b
10	13.4	±0.058 ^a	12.3	±0.058 ^b
11	13.3	±0.058 ^a	12.3	±0.058 ^b
12	13.3	±0.058 ^a	12.1	±0.058 ^b
13	13.3	±0.058 ^a	12.0	±0.000 ^b
14	13.3	±0.058 ^a	11.4	±0.058 ^b
15	13.1	±0.058 ^a	11.3	±0.058 ^b

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

O pH para 12 °C e 18 °C iniciou em 5,92: em 12 °C finalizou em 4,11 no tempo 15, e em 18 °C teve início em 5.72 e finalizou em 4,02 também no tempo 15. Houve diferença estatística entre as duas temperaturas, Tabela 10.

Tabela 16: pH durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P.

Tempo	pH			
	12 Graus		18 Graus	
0	5.92	± 0.012 ^a	5.72	± 0.014 ^b
1	4.89	± 0.012 ^a	4.36	± 0.015 ^b
2	4.65	± 0.006 ^a	4.32	± 0.012 ^b
3	4.55	± 0.010 ^a	4.26	± 0.006 ^b
4	4.48	± 0.000 ^a	4.17	± 0.012 ^b
5	4.39	± 0.006 ^a	4.07	± 0.015 ^b
6	4.34	± 0.017 ^a	4.05	± 0.006 ^b
7	4.28	± 0.006 ^a	4.07	± 0.006 ^b
8	4.21	± 0.006 ^a	4.04	± 0.012 ^b
9	4.21	± 0.006 ^a	4.05	± 0.012 ^b
10	4.17	± 0.006 ^a	4.04	± 0.000 ^b
11	4.15	± 0.006 ^a	4.04	± 0.006 ^b
12	4.14	± 0.012 ^a	4.05	± 0.012 ^b
13	4.12	± 0.006 ^a	4.02	± 0.012 ^b
14	4.10	± 0.006 ^a	4.04	± 0.006 ^b
15	4.11	± 0.006 ^a	4.02	± 0.012 ^b

±a Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

O teor alcoólico ficou abaixo do esperado (Tabela 17), tanto em 12 °C, como em 18°C, finalizando no tempo 15 com 1,60% para 12 °C e 2,19% para 18 °C. De acordo com legislação brasileira, a cerveja produzida com teor alcoólico acima de 0,5% e igual ou inferior a 2,0% é classificada como cerveja de teor alcoólico reduzido ou cerveja com baixo teor alcoólico, e acima de 2,0% é classificada como cerveja. Seguindo a legislação brasileira, a cerveja produzida em 12 °C foi uma ale com teor alcoólico reduzido, e a ale produzida em 18 °C classificada como cerveja, devido ao teor alcoólico estar acima de 2,0% (BRASIL, 2019). Seguindo os resultados em P.E, em E.P também não houve diferença estatística entre as temperaturas utilizadas.

Tabela 17: Teor alcoólico durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P.

Tempo	Teor alcoólico			
	12 Graus		18 Graus	
0	0.00%	±0.000 ^a	0.00%	±0.000 ^a
1	0.37%	±0.000 ^a	0.13%	±0.001 ^a
2	0.54%	±0.000 ^a	0.70%	±0.000 ^a
3	0.67%	±0.002 ^a	0.68%	±0.001 ^a
4	0.79%	±0.002 ^a	0.71%	±0.000 ^a
5	0.92%	±0.000 ^a	1.01%	±0.001 ^a
6	0.99%	±0.000 ^a	1.25%	±0.001 ^a
7	1.05%	±0.000 ^a	1.25%	±0.000 ^a
8	1.10%	±0.000 ^a	1.52%	±0.001 ^a
9	1.12%	±0.000 ^a	1.59%	±0.000 ^a
10	1.47%	±0.000 ^a	1.64%	±0.000 ^a
11	1.48%	±0.000 ^a	1.64%	±0.001 ^a
12	1.52%	±0.000 ^a	1.78%	±0.001 ^a
13	1.52%	±0.000 ^a	1.83%	±0.000 ^a
14	1.52%	±0.000 ^a	2.13%	±0.000 ^a
15	1.60%	±0.000 ^a	2.19%	±0.001 ^a

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Análise de viabilidade celular da *Saccharomyces pastorianus* em pequena escala (P.E)

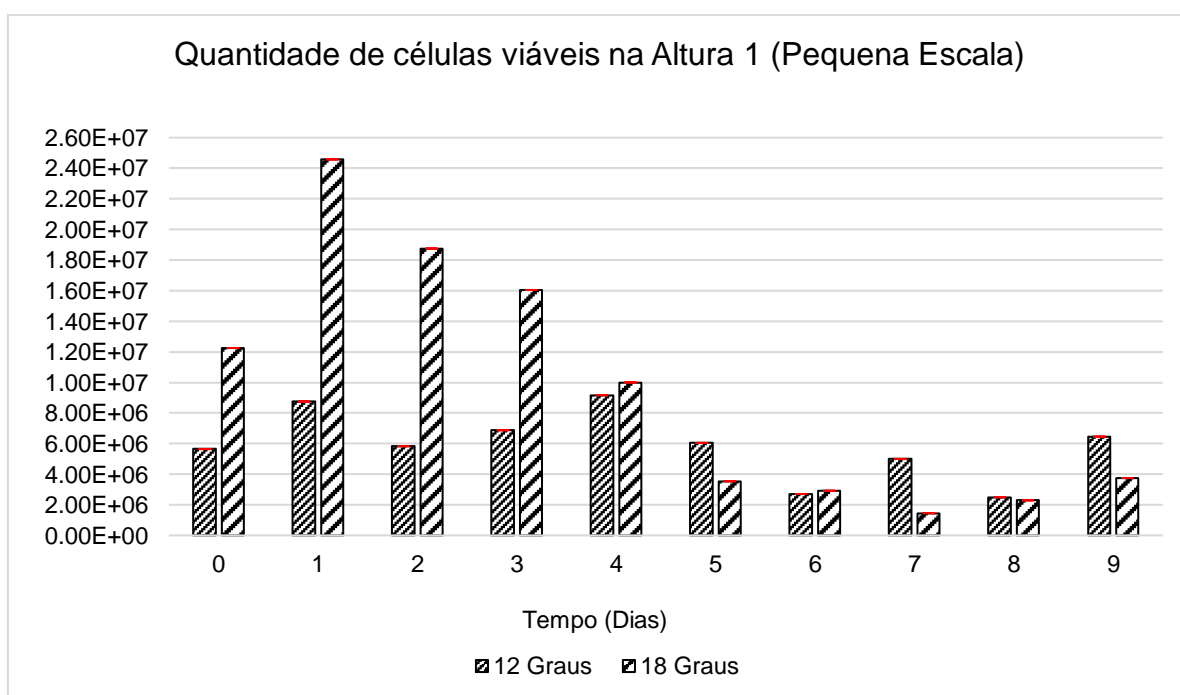
5.3.1 Altura 1 (Superfície do mosto)

A *Saccharomyces pastorianus* tem como característica ser uma levedura de fermentação baixa, com temperaturas de fermentação entre 6 °C e 15 °C, sendo assim a temperatura de 18 °C causa um possível estresse na levedura, estando acima da temperatura ideal, e 12 °C estando dentro de sua faixa de temperatura ideal. Nas figuras 38 e 39, estão os dados de viabilidade celular e quantidade total de células obtidos na altura 1 (próximo da superfície do mosto) no reator P.E, (reator de vidro de 1,5L) em 12 °C e 18 °C, no período do tempo 0 ao 9. Em 18 °C houve uma maior quantidade de leveduras, tanto em relação as viáveis, quanto em relação a quantidade

total, nos tempos 0 até 4, ficando em 10^7 , com fase exponencial entre os tempos 0 e 1, quando começou a baixar. A quantidade total de leveduras (Figura 39) mostra a precipitação das leveduras a partir do tempo 3 em 12 °C até o tempo 9, mas podemos ver, nas fotos da Figura 45, que a precipitação começa a partir do tempo 1 da fermentação.

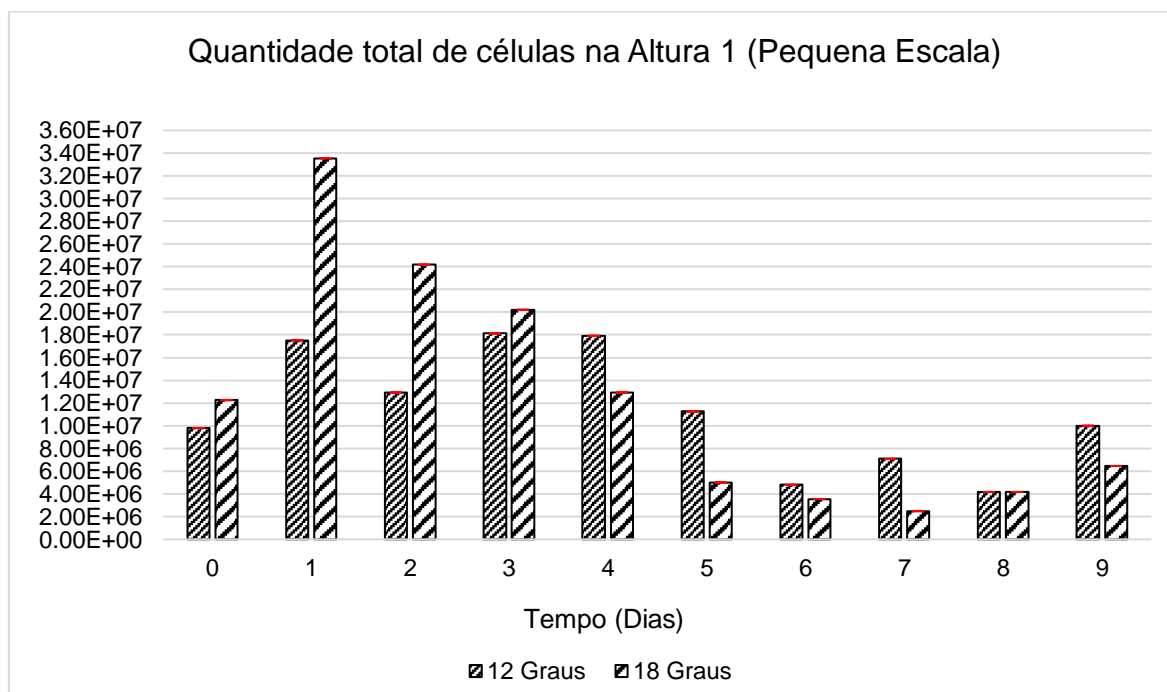
Em 12 °C, a levedura não obteve o comportamento esperado, ficando praticamente estável em 10^6 , ao longo do tempo de fermentação. Esperava-se que em 12 °C a levedura obtivesse um comportamento acima do que houve em 18 °C. A porcentagem de células viáveis (Tabela 18) nas duas temperaturas ficaram próximas, iniciando em 81% e finalizando em 56% em 18 °C. Em 12 °C, iniciou em 77% finalizando em 68%.

Figura 38: Quantidade de células viáveis por ml na altura 1 em 12 °C e 18°C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 39: Quantidade total de células por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 18: Porcentagem de viabilidade celular na altura 1 em P.E.

Altura 1		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	77%	81%
1	63%	69%
2	64%	68%
3	56%	74%
4	67%	62%
5	54%	65%
6	59%	76%
7	70%	68%
8	64%	74%
9	68%	56%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

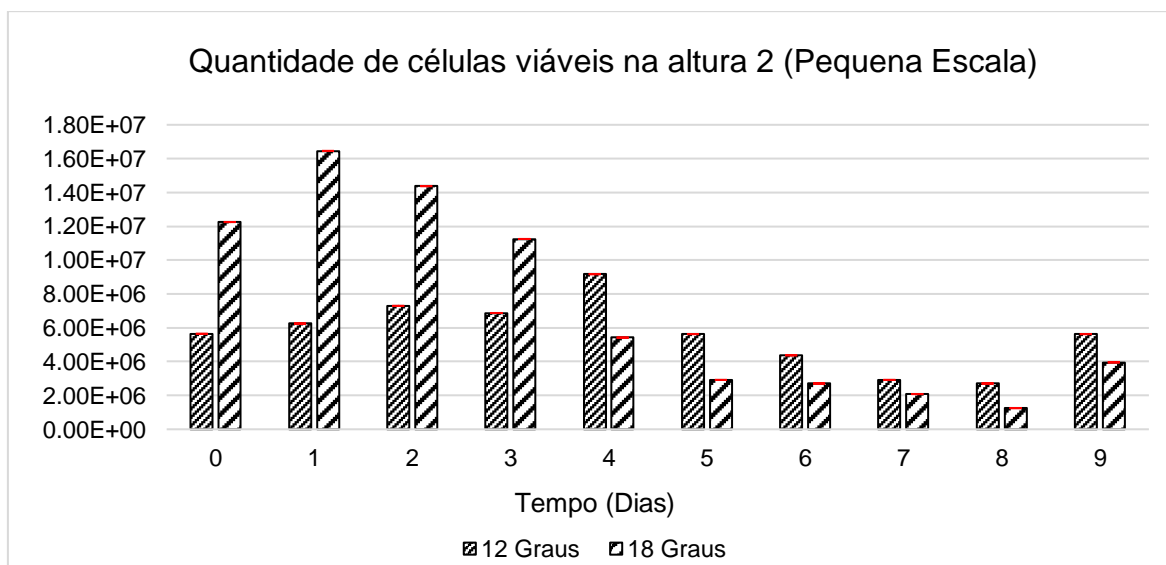
5.3.2 Altura 2 do reator (Meio do Reator)

Descendo para a altura 2, vemos que a fase de crescimento celular ou fase exponencial da fermentação em 18 °C ocorreu nos tempos 0 e 1, quando começa a

baixar, mantendo-se em 10^7 até o tempo 3, tanto em quantidade de células viáveis, quanto em quantidade de total de células (viáveis e não viáveis), Figuras 40 e 41.

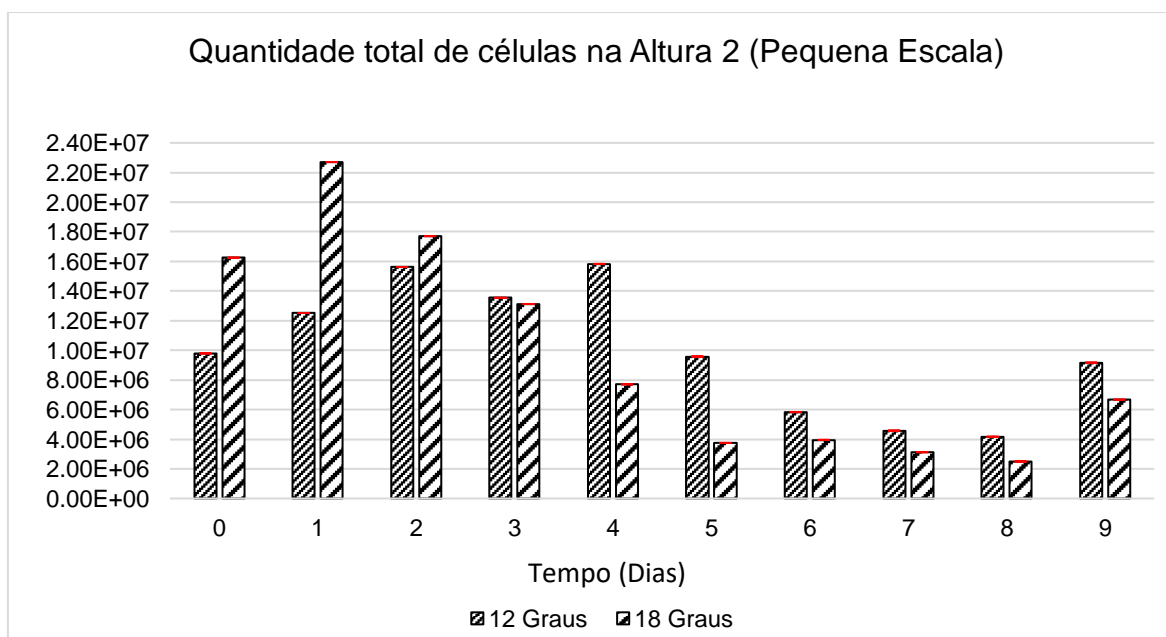
Em 12 °C, a quantidade de células viáveis e a quantidade de total de células ficaram acima da fermentação de 18 °C a partir do tempo 4, até o final no tempo 9, igual ao que ocorreu na altura 1. A porcentagem de células viáveis ficou maior em 18 °C, Tabela 19.

Figura 40: Quantidade de células viáveis por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 41: Quantidade total de células por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 19: Porcentagem de viabilidade celular na altura 2 em P.E.

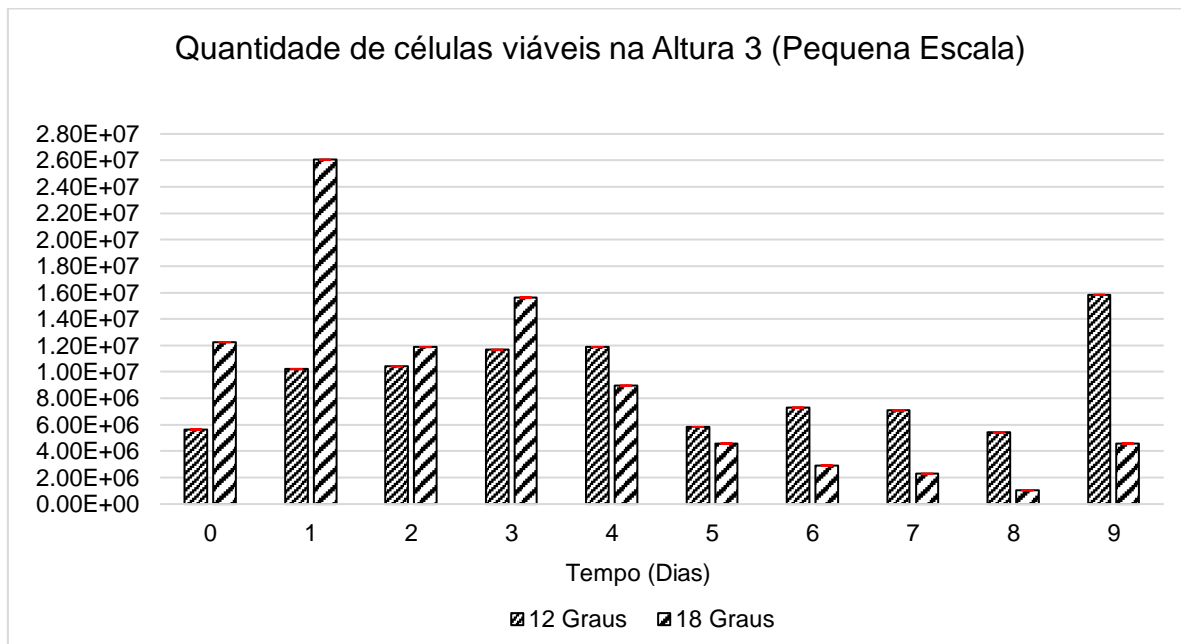
Altura 2		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	77%	81%
1	59%	65%
2	70%	77%
3	64%	75%
4	69%	47%
5	59%	68%
6	52%	76%
7	59%	76%
8	48%	61%
9	63%	59%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

5.3.3 Altura 3 do reator (Próximo ao fundo do Reator)

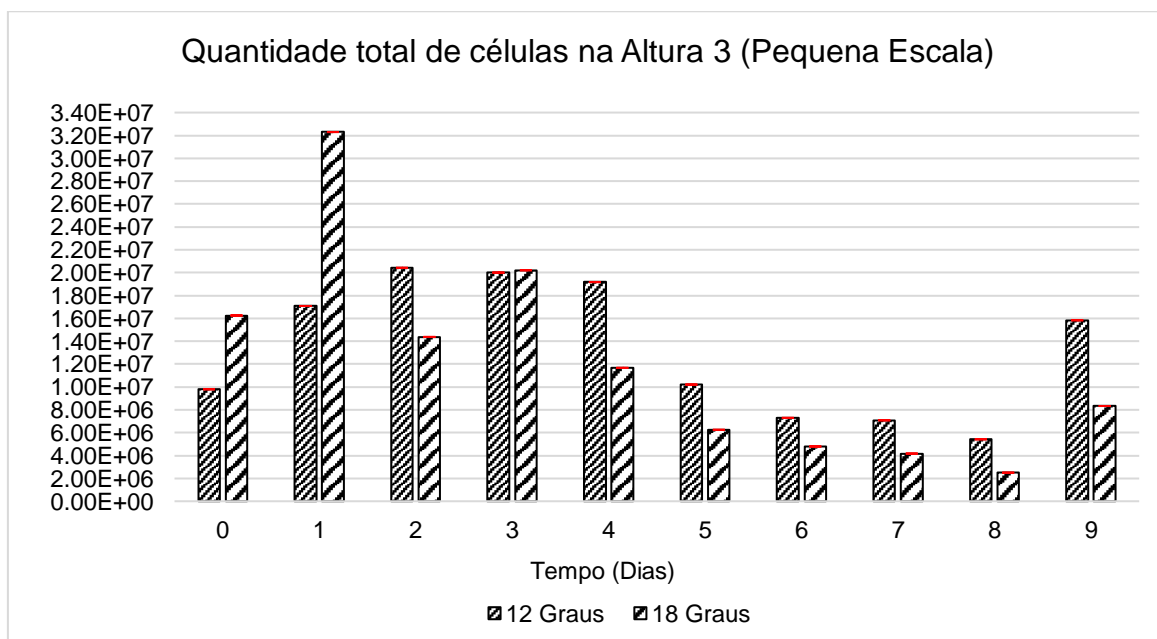
Chegando próximo ao fundo do reator, na altura 3, vemos que a levedura obteve melhor desempenho em 18 °C, mantendo-se em 10^7 , com fase exponencial do tempo 0 para o tempo 1, até o tempo 4, para quantidade de leveduras viáveis e quantidade total de leveduras (Figuras 42 e 43). A partir do tempo 4, esse desempenho se inverte, com a fermentação em 12 °C tendo melhor desempenho à medida que as leveduras descem ou se precipitam em direção ao fundo do reator. Essa precipitação pode ser vista na figura 45, a partir do tempo 1. A porcentagem de leveduras viáveis, assim como nas alturas 1 e 2, esteve maior na fermentação de 18 °C, mas em 12 °C essa porcentagem esteve próxima da fermentação de 18 °C em alguns tempos analisados, Tabela 20.

Figura 42: Quantidade de células viáveis por ml na altura 3 em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 43: Quantidade total de células por ml na altura 3 em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

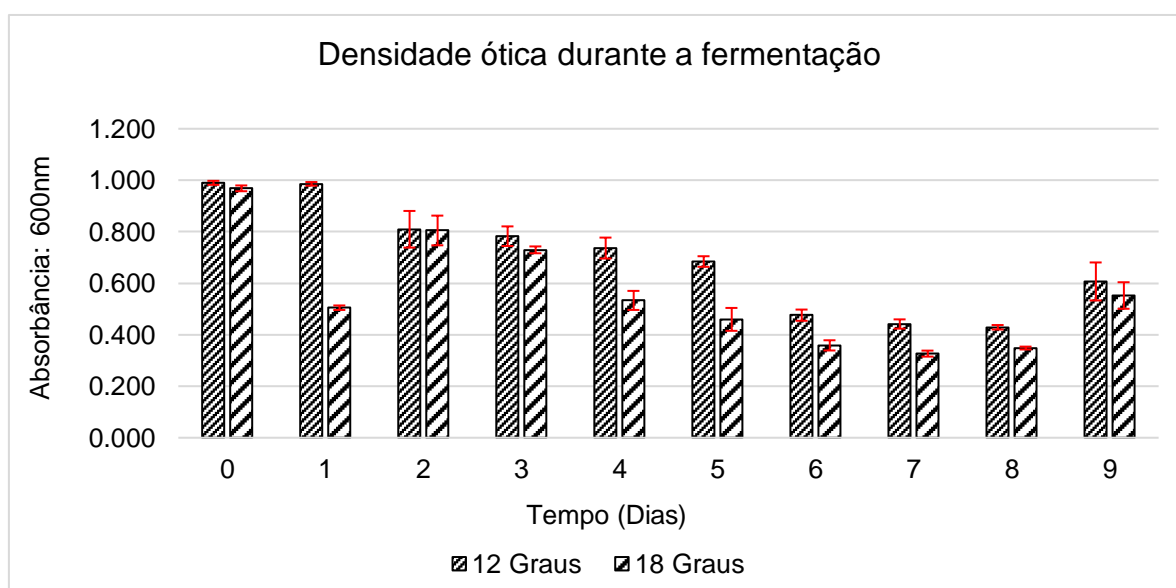
Tabela 20: Porcentagem de viabilidade celular na altura 3 em P.E.

Altura 3		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	77%	81%
1	59%	52%
2	66%	68%
3	68%	62%
4	63%	83%
5	57%	75%
6	55%	69%
7	57%	68%
8	64%	65%
9	62%	66%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A análise de densidade ótica mostra a quantidade de leveduras ao longo dos 10 dias de fermentação, Figura 44. A maior quantidade de leveduras esteve em 12 °C, no tempo 1 e nos tempos 3 ao 9, com a precipitação das leveduras em direção ao fundo, começando no tempo 1 para 2. Na figura 45, pode-se ver como acontece a precipitação da *Saccharomyces pastorianus* dos tempos 0 a 5, e de 6 a 9 não houve mudança na aparência das leveduras no reator.

Figura 44: Densidade ótica durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

5.3.1 Análises Físico-químicas

Na análise de sólidos solúveis totais °Brix (Tabela 21), em 12 °C iniciou em 16,4 no tempo 0 e baixando para 15,0 no tempo 2, e estabilizou na casa de 13 °Brix nos tempos 5 a 7. E finalizando em 12,2 °Brix no tempo 9. Em 18 °C, houve um melhor desempenho das leveduras, com °Brix iniciando em 16,3, se estabilizando no tempo 6 e finalizando em 11,2 °Brix no tempo 9. Na tabela 21, vemos que houve diferença estatística entre as temperaturas 12 °C e 18 °C.

Tabela 21: °Brix durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E.

Tempo (Dias)	°Brix			
	12 Graus		18 Graus	
0	16.4	± 0.115 ^a	16.3	± 0.058 ^b
1	15.4	± 0.058 ^a	15.1	± 0.058 ^b
2	15.0	± 0.058 ^a	14.0	± 0.058 ^b
3	15.0	± 0.058 ^a	13.3	± 0.058 ^b
4	14.1	± 0.058 ^a	12.3	± 0.058 ^b
5	13.6	± 0.346 ^a	12.2	± 0.058 ^b
6	13.3	± 0.058 ^a	11.8	± 0.289 ^b
7	13.1	± 0.058 ^a	11.3	± 0.058 ^b
8	12.3	± 0.058 ^a	11.2	± 0.058 ^b
9	12.2	± 0.058 ^a	11.2	± 0.058 ^b

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

O pH, em 12 °C e 18 °C (Tabela 22), iniciou em 5,57 e 5,31 respectivamente. Em 12 °C, houve uma queda mais lenta, ficando entre 4,30 e 4,0 a partir do tempo 2 até o tempo 5, finalizando no tempo 9 com 3,89. Em 18 °C, a queda do valor do pH foi mais rápida em comparação com 12 °C, baixando de 5,31 para 4,09 no tempo 1 e variando entre 3,98 e 3,95 até o tempo 9. Podemos ver também na tabela 22 que não houve diferença estatística entre as temperaturas.

Tabela 22: pH durante a fermentação em 12°C e 18°C em P.E.

Tempo (Dias)	pH			
	12 Graus		18 Graus	
0	5.63	± 0.015 ^a	5.31	± 0.006 ^a
1	4.41	± 0.012 ^a	4.09	± 0.006 ^a
2	4.25	± 0.012 ^a	3.98	± 0.006 ^a
3	4.21	± 0.006 ^a	3.92	± 0.006 ^a
4	4.15	± 0.006 ^a	3.91	± 0.006 ^a
5	4.00	± 0.015 ^a	3.90	± 0.010 ^a
6	4.04	± 0.006 ^a	3.88	± 0.006 ^a
7	3.97	± 0.006 ^a	3.85	± 0.026 ^a
8	3.98	± 0.006 ^a	3.90	± 0.006 ^a
9	3.89	± 0.010 ^a	3.95	± 0.006 ^a

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

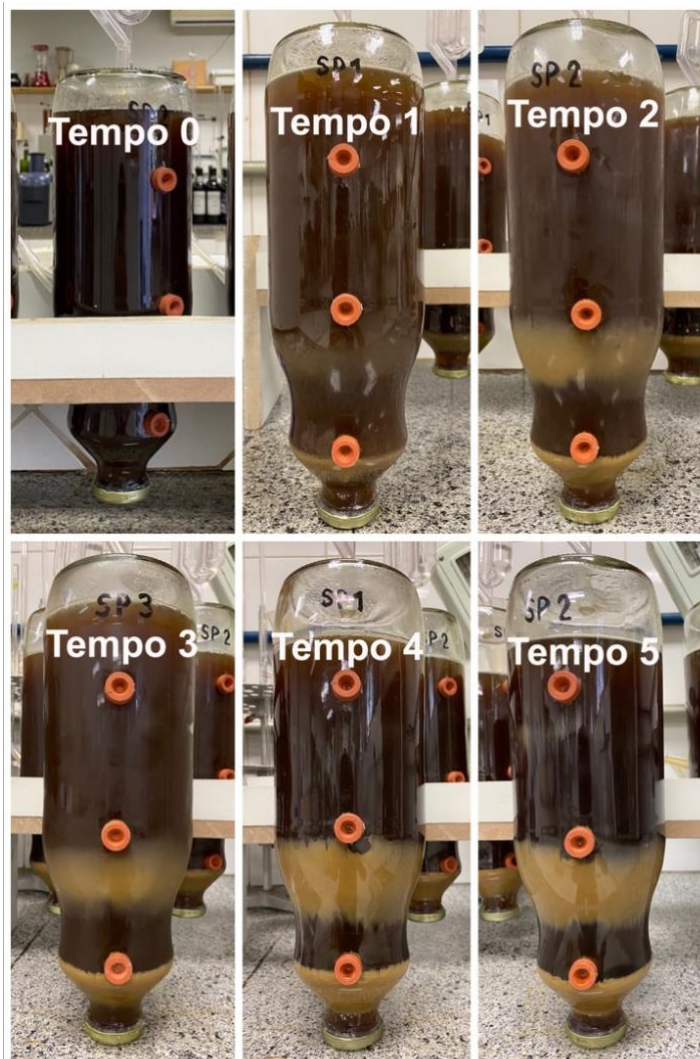
O teor alcoólico (Tabela 23), em 12 °C e 18 °C, finalizaram no tempo 9 com 2.31% e 2.82% respectivamente. De acordo com legislação brasileira, a cerveja produzida com teor alcoólico acima de 2,0% é classificada como cerveja. Seguindo a legislação brasileira, as cervejas produzidas nas duas temperaturas utilizadas foram cervejas lager com teor alcoólico acima de 2,0% (BRASIL, 2019). Através da tabela 23, uma diferença estatística entre as duas temperaturas, com as maiores médias em 18°C.

Tabela 23: Teor alcoólico durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em P.E.

Tempo (Dias)	Teor alcoólico			
	12 Graus		18 Graus	
0	0.00%	± 0.000 ^b	0.00%	± 0.000 ^a
1	0.57%	± 0.001 ^b	0.64%	± 0.001 ^a
2	0.75%	± 0.001 ^b	1.25%	± 0.001 ^a
3	0.75%	± 0.000 ^b	1.61%	± 0.000 ^a
4	1.30%	± 0.001 ^b	2.20%	± 0.001 ^a
5	1.55%	± 0.001 ^b	2.26%	± 0.000 ^a
6	1.70%	± 0.001 ^b	2.48%	± 0.001 ^a
7	1.81%	± 0.001 ^b	2.75%	± 0.001 ^a
8	2.30%	± 0.001 ^b	2.79%	± 0.000 ^a
9	2.31%	± 0.000 ^b	2.82%	± 0.000 ^a

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 45: Comportamento da levedura *Saccharomyces Pastorianus* em 18 °C durante a fermentação em pequena escala (P.E) do tempo 0 ao 5.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

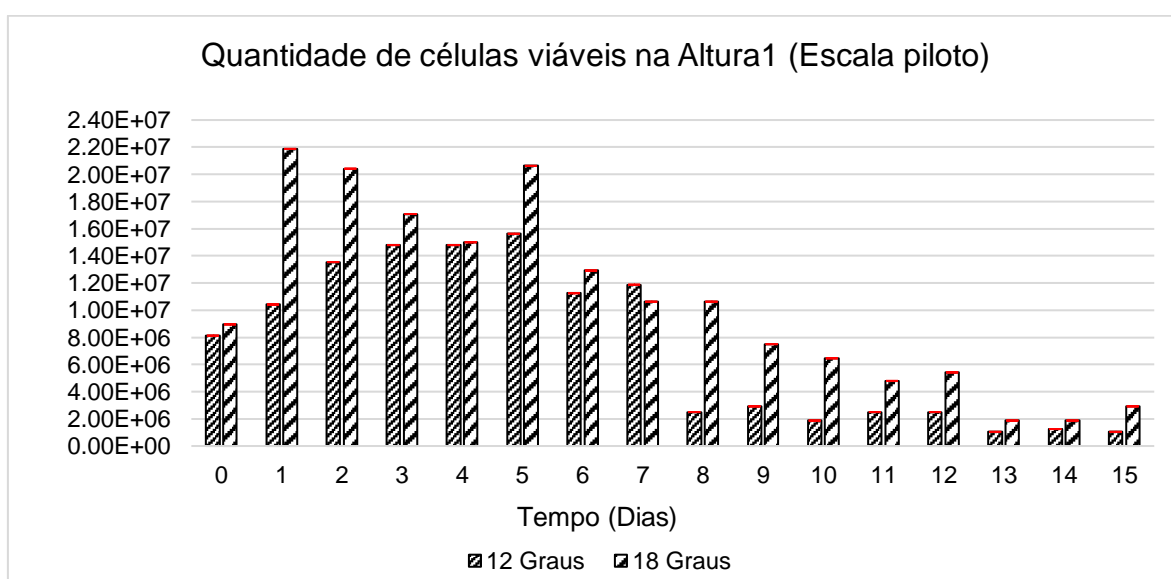
5.4 Análise de viabilidade celular da *Saccharomyces pastorianus* em Escala piloto (E.P)

5.4.1 Altura 1 (Superfície do mosto)

Nas figuras 46 e 47, temos os dados de quantidade de células viáveis por ml e quantidade total de células por ml na altura 1 (superfície do mosto) do reator E.P. Da mesma forma que em P.E, a fermentação em 18 °C obteve melhor desempenho, com fase exponencial entre os tempos 1 e 2, estando acima de 1.50×10^7 até o tempo 5, e se mantendo em 10^7 até o tempo 8, baixando para 10^6 até o tempo 15. O mesmo ocorreu com a quantidade total de células (viáveis e não viáveis), onde pode ser vista

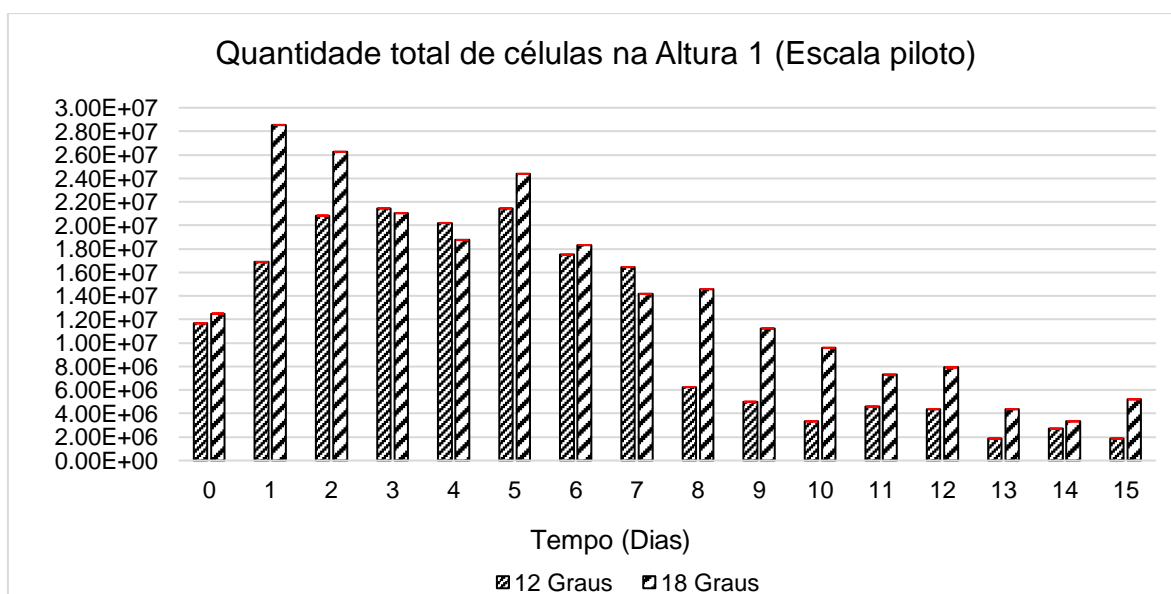
uma precipitação mais acelerada das leveduras a partir do 6 nas duas temperaturas. Em 12 °C, a quantidade de leveduras viáveis e quantidade total de leveduras do tempo 0 ao 5 permanece estável, quando começa a diminuir ou precipitar em direção ao fundo do reator até o final no tempo 15. A porcentagem de leveduras viáveis iniciou no tempo 0 em 70% e 72% para 12 °C e 18 °C respectivamente, obtendo melhor viabilidade nos tempos 4 e 5 em 73% em 12° C, entre 81% e 85% nos tempos 3, 4 e 5 em 18 °C, com as duas fermentações, 12 °C e 18 °C, terminando em 56% e 57%.

Figura 46: Quantidade de células viáveis por ml na altura 1 em 12°C e 18 °C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

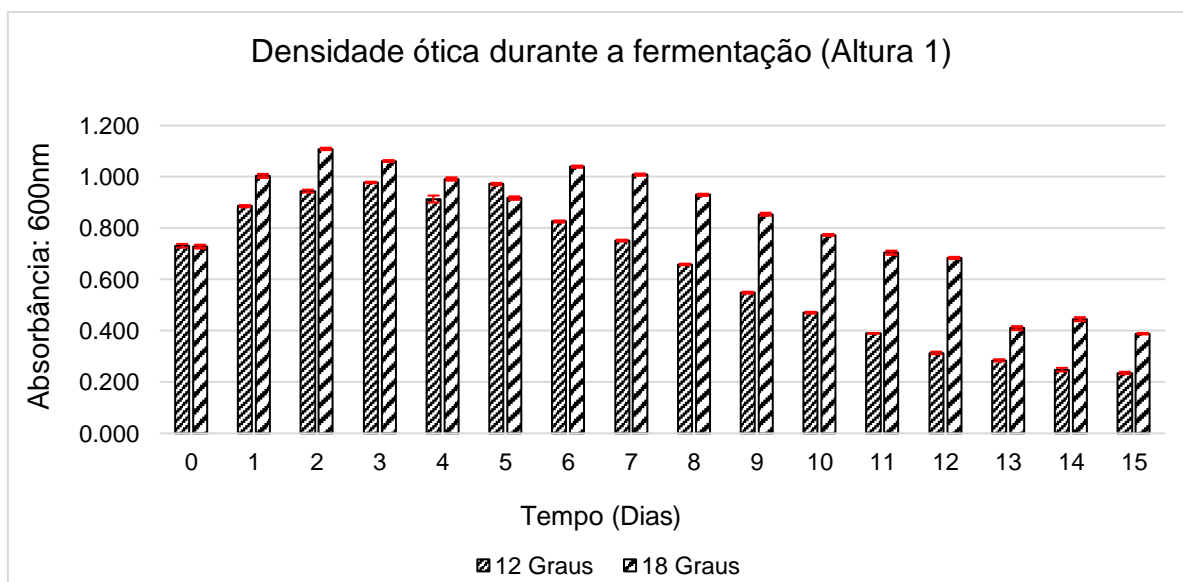
Figura 47: Quantidade total de células por ml na altura 1 em 12 °C e 18 °C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A densidade ótica mostra a quantidade total de leveduras na altura 1 (Figura 48), próximo da superfície, tendo a maior quantidade leveduras entre os tempos 1 e 7, quando inicia uma maior precipitação das leveduras em direção ao fundo do reator.

Figura 48: Densidade ótica na altura 1 em 12 °C e 18 °C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 24: Porcentagem de viabilidade celular na altura 1 em E.P.

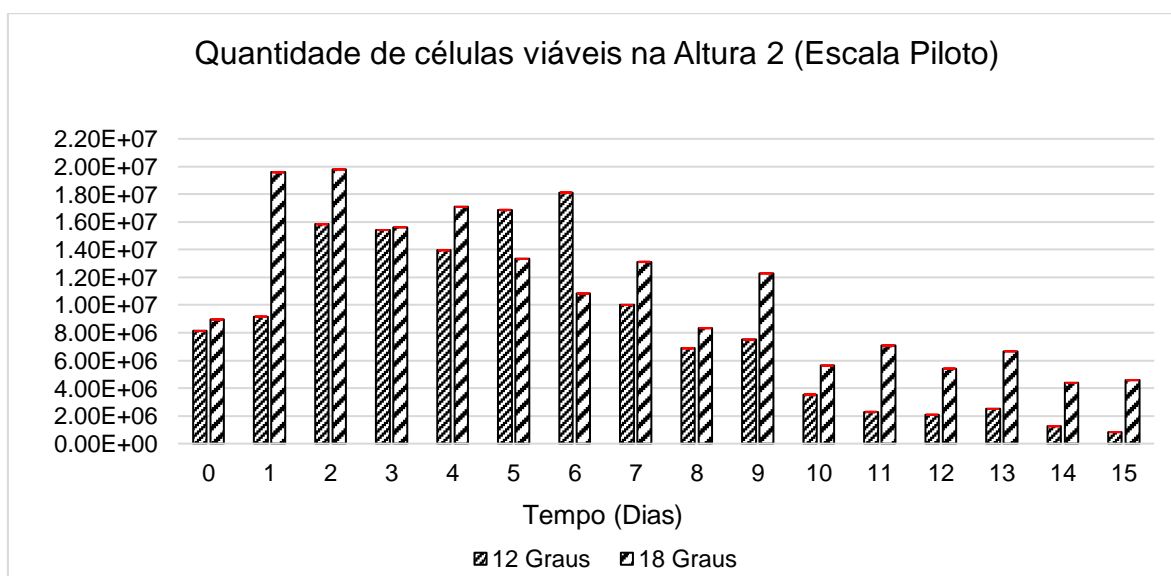
Altura 1		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	70%	72%
1	62%	77%
2	65%	78%
3	69%	81%
4	73%	80%
5	73%	85%
6	64%	70%
7	72%	75%
8	40%	73%
9	58%	67%
10	56%	67%
11	55%	66%
12	57%	66%
13	56%	43%
14	46%	56%
15	56%	57%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

5.4.2 Altura 2 do reator (Meio do Reator)

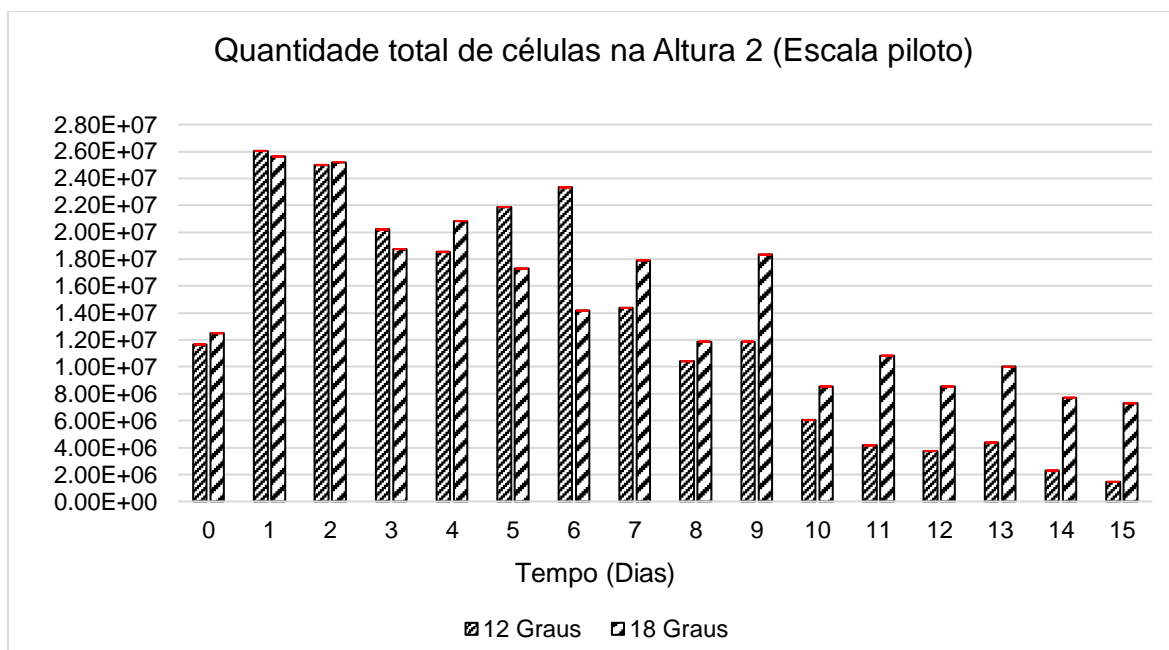
Na altura 2 (Figuras 49 e 50), a fermentação ocorreu de forma semelhante a altura 1, com melhor desempenho da levedura em 18 °C, mesmo sendo uma levedura de fermentação baixa (entre 6 °C e 15 °C). A maior quantidade de células viáveis esteve nos tempos 1 a 4, estando acima de $1,50 \times 10^7$. Nos mesmos tempos, a quantidade total de células esteve acima de $2,00 \times 10^7$, e a partir do tempo 5 ficou variando entre 10^7 e 10^6 até o final no tempo 15. Como pode ser visto nas figuras 49 e 50, a fermentação de 12 °C obteve um desempenho menor, com uma menor quantidade de leveduras viáveis, mas com quantidade total de leveduras próxima da fermentação de 18 °C. Nota-se também que a precipitação das leveduras foi maior em 12 °C. A porcentagem de leveduras viáveis ficou maior também em 18 °C, com 83% de viabilidade no tempo 3, e em 12 °C a maior porcentagem de viabilidade esteve no tempo 6 com 78%, Tabela 25.

Figura 49: Quantidade de células viáveis por ml na altura 2 em 12 °C e 18°C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 50: Quantidade total de células por ml na altura 2 em 12 °C e 18 °C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

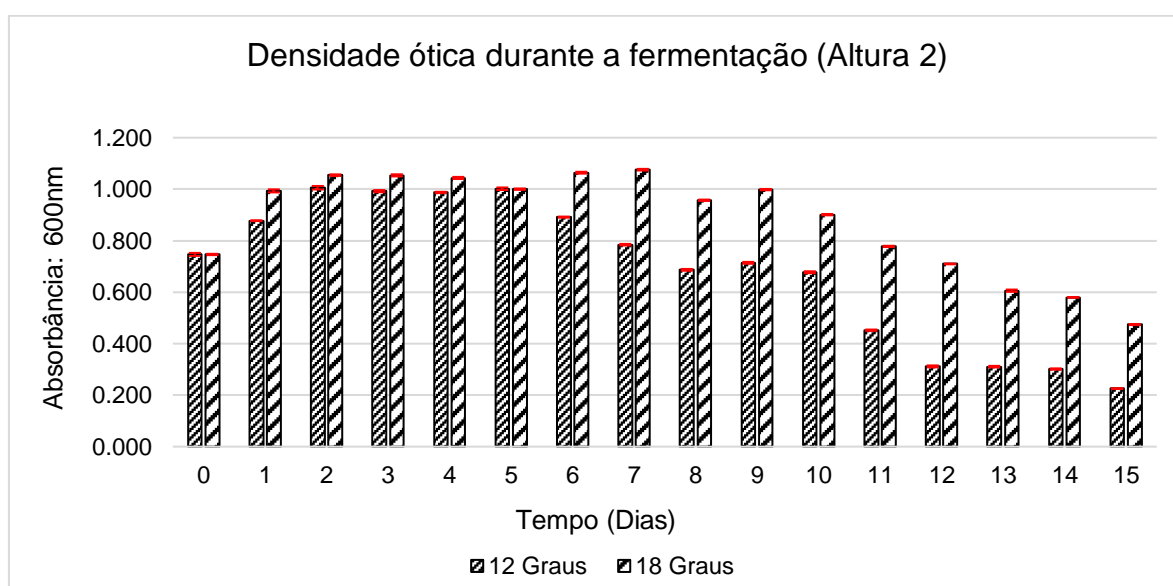
Tabela 25: Porcentagem de viabilidade celular na altura 2 em E.P.

Altura 2		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	70%	72%
1	65%	76%
2	63%	79%
3	76%	83%
4	75%	82%
5	77%	78%
6	78%	76%
7	70%	73%
8	66%	70%
9	63%	67%
10	59%	66%
11	55%	65%
12	56%	63%
13	57%	67%
14	55%	57%
15	57%	63%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A densidade ótica confirma um melhor desempenho da levedura de baixa fermentação na temperatura de 18 °C, com maior quantidade de leveduras do tempo 1 ao 15, com uma precipitação menor quando comparada com a fermentação de 12 °C. Nos tempos 1 a 5, as duas temperaturas ficaram com resultados próximos, e a partir do tempo 6 houve uma menor quantidade de leveduras em suspensão na fermentação de 12 °C. Isso resultou em uma cerveja mais clara, devido a maior precipitação.

Figura 51: Densidade ótica na altura 2 em 12 °C e 18 °C em E.P.

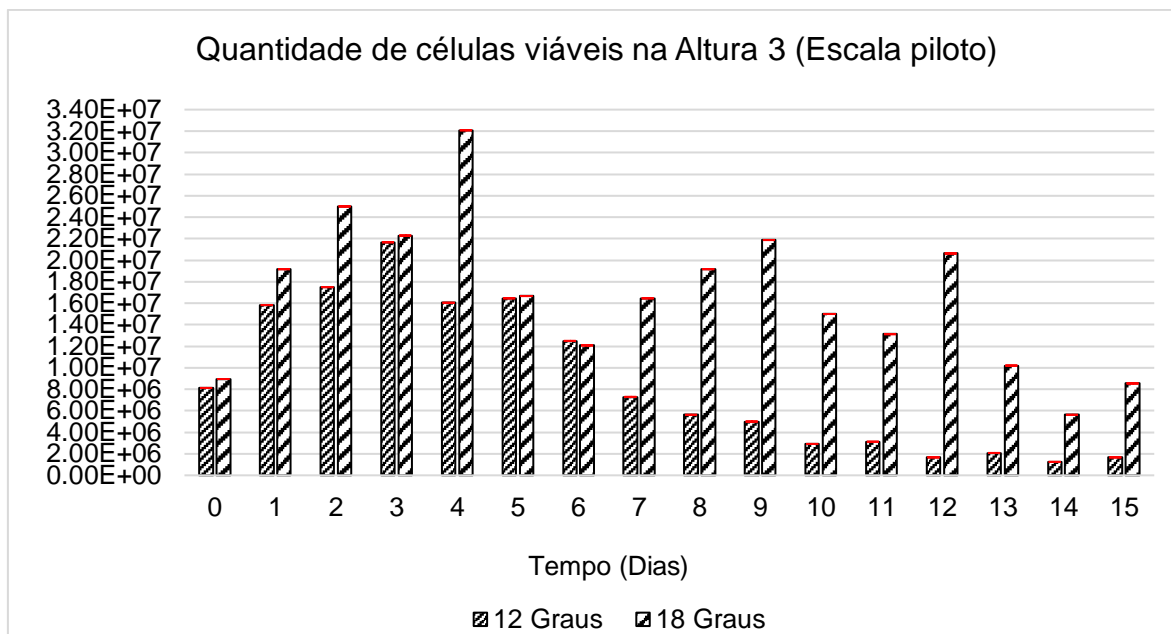


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

5.4.3 Altura 3 do reator (Próximo ao fundo do Reator)

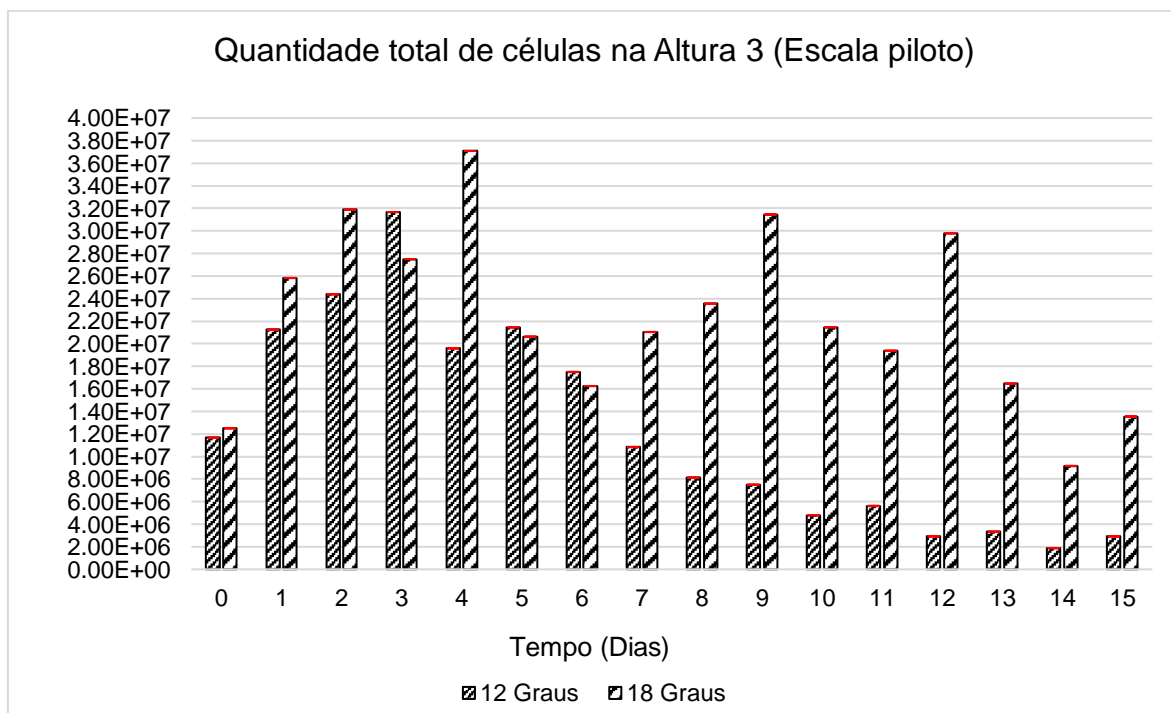
Chegando na altura 3 (Figuras 52 e 53), os resultados mostram que em 18 °C, tanto a quantidade de leveduras viáveis quanto a quantidade total de leveduras ficaram maiores em comparação com a fermentação de 12 °C. A fase exponencial nas duas temperaturas ocorreu nos tempos 1 a 4 para 18 °C, e nos tempos 1 a 3 para 12 °C, ambas ficando acima de 10^7 . Da mesma forma que nas alturas 1 e 2, a maior precipitação das leveduras ocorreu em 12 °C, e essa maior precipitação resulta em uma cerveja mais limpa. A porcentagem de leveduras viáveis iniciou em 70% para 12 °C e 72% para 18 °C, onde a maior porcentagem esteve no tempo 4 nas duas temperaturas, com 82% e 87% para 12 °C e 18 °C respectivamente.

Figura 52: Quantidade de células viáveis por ml na altura 3 em 12 °C e 18 °C em E.P.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 53: Quantidade total de células por ml na altura 3 em 12 °C e 18 °C em E.P



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

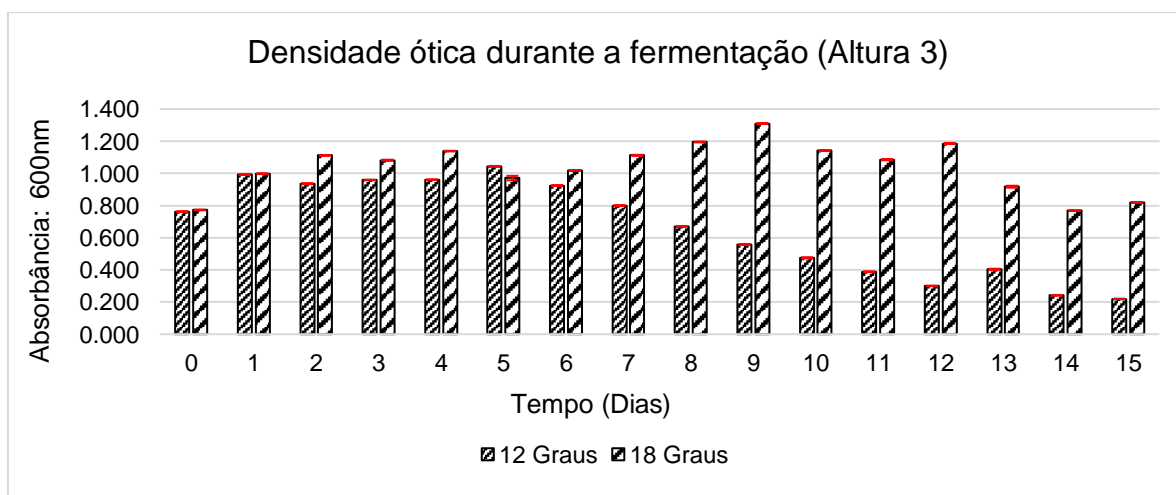
Tabela 26: Porcentagem de viabilidade celular na altura 3 em E.P

Altura 3		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	70%	72%
1	75%	74%
2	72%	78%
3	68%	81%
4	82%	87%
5	77%	81%
6	71%	74%
7	67%	78%
8	69%	81%
9	67%	70%
10	61%	70%
11	56%	68%
12	57%	69%
13	63%	62%
14	60%	61%
15	57%	63%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A análise de densidade ótica da altura 3 (Figura 54) confirma a maior quantidade de leveduras em suspensão na temperatura de 18 °C, subindo a partir do tempo 0 ao 4, com leve queda no tempo 5, e voltando a subir do tempo 6 ao 9, se mantendo estável até o tempo 12 e caindo a partir do tempo 13 ao final no tempo 15. Em 12 °C a quantidade de leveduras ocorreu de forma mais estável ao longo dos tempos de fermentação, com fase exponencial do tempo 0 a 5, e caindo de forma gradual até o final no tempo 15.

Figura 54: Densidade ótica na altura 3 em 12 °C e 18 °C em E.P



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

5.4.4 Análises Físico-químicas

As duas temperaturas tiveram o início da fermentação com °Brix de 15,3 (Tabela 27), já que as fermentações (12 °C e 18 °C) foram realizadas em uma mesma batelada. O consumo dos açúcares presentes no mosto foi mais acelerado em 18 °C, se estabilizando a partir do tempo 6 em 10 °Brix, e em 12 °C se estabilizou em 10 °Brix a partir do tempo 11. Através da análise estatística, vemos que houve diferença entre as temperaturas, com as maiores médias em 12 °C.

Tabela 27: °Brix durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P.

Tempo (Dias)	Brix			
	12 Graus		18 Graus	
0	15.3	±0.058 ^a	15.3	±0.058 ^b
1	14.4	±0.058 ^a	14.2	±0.058 ^b
2	14.4	±0.058 ^a	13.3	±0.058 ^b
3	13.4	±0.058 ^a	12.0	±0.058 ^b
4	13.2	±0.058 ^a	11.4	±0.058 ^b
5	12.2	±0.058 ^a	11.2	±0.058 ^b
6	12.1	±0.058 ^a	10.6	±0.346 ^b
7	11.6	±0.346 ^a	10.3	±0.058 ^b
8	11.2	±1.584 ^a	10.2	±0.058 ^b
9	11.2	±1.084 ^a	10.1	±0.058 ^b
10	11.0	±0.058 ^a	10.1	±0.058 ^b
11	10.6	±0.346 ^a	10.1	±0.058 ^b
12	10.4	±0.058 ^a	10.1	±0.058 ^b
13	10.3	±0.058 ^a	10.1	±0.058 ^b
14	10.1	±0.058 ^a	10.0	±0.058 ^b
15	10.1	±0.058 ^a	10.0	±0.000 ^b

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados da análise de pH mostram que, nas duas temperaturas utilizadas, as fermentações tiveram resultados próximos, com o início em 5,95 (a qualidade do extrato de malte pode ter influenciado esse resultado de pH), e finalizando em 4,47 e 4,30 para 12 °C e 18 °C respectivamente. Como pode-se ver, não houve diferença estatística entre as duas temperaturas, Tabela 28.

Tabela 28: pH durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P.

Tempo (Dias)	pH			
	12 Graus		18 Graus	
0	5.95	±0.006 ^a	5.95	±0.006 ^a
1	4.67	±0.006 ^a	4.49	±0.006 ^a
2	4.58	±0.006 ^a	4.33	±0.006 ^a
3	4.57	±0.006 ^a	4.20	±0.006 ^a
4	4.43	±0.006 ^a	4.20	±0.006 ^a
5	4.39	±0.012 ^a	4.19	±0.010 ^a
6	4.36	±0.010 ^a	4.14	±0.006 ^a
7	4.32	±0.006 ^a	4.13	±0.012 ^a
8	4.31	±0.006 ^a	4.14	±0.006 ^a
9	4.30	±0.006 ^a	4.20	±0.006 ^a
10	4.31	±0.006 ^a	4.18	±0.006 ^a
11	4.33	±0.006 ^a	4.21	±0.006 ^a
12	4.34	±0.006 ^a	4.21	±0.006 ^a
13	4.28	±0.015 ^a	4.23	±0.000 ^a
14	4.26	±0.006 ^a	4.22	±0.006 ^a
15	4.47	±0.012 ^a	4.30	±0.006 ^a

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

As duas temperaturas terminaram a fermentação, no tempo 15, com teor alcoólico próximos, 2,87% para 12 °C e 2,90% 18 °C. Em 18 °C, a fermentação ocorreu mais acelerada devido a temperatura mais alta, chegando acima de 2,00% de teor alcoólico no tempo 4, enquanto em 12°C, ficou acima de 2,00% no tempo 7. Mas, apesar da fermentação mais acelerada em 18 °C, as fermentações terminaram no tempo 15 com resultados próximos, 2,87% para 12 °C, e 2,90% para 18 °C. De acordo com a legislação, as cervejas produzidas são cervejas lager, pois estão acima de 2,00% de teor alcoólico (BRASIL, 2019). Na tabela 29, a análise estatística mostra a diferença entre as temperaturas ou fermentações, com as maiores médias em 18 °C.

Tabela 29: Teor alcoólico durante a fermentação em 12 °C e 18 °C em E.P

Tempo (Dias)	Teor alcoólico			
	12 Graus		18 Graus	
0	0.00%	±0.000 ^b	0.00%	±0.000 ^a
1	0.45%	±0.001 ^b	0.62%	±0.000 ^a
2	0.53%	±0.000 ^b	1.08%	±0.000 ^a
3	1.06%	±0.001 ^b	1.80%	±0.000 ^a
4	1.18%	±0.001 ^b	2.17%	±0.001 ^a
5	1.73%	±0.001 ^b	2.28%	±0.001 ^a
6	1.78%	±0.001 ^b	2.58%	±0.002 ^a
7	2.03%	±0.002 ^b	2.76%	±0.001 ^a
8	2.28%	±0.001 ^b	2.82%	±0.001 ^a
9	2.28%	±0.001 ^b	2.84%	±0.000 ^a
10	2.35%	±0.001 ^b	2.83%	±0.001 ^a
11	2.58%	±0.002 ^b	2.87%	±0.001 ^a
12	2.71%	±0.000 ^b	2.87%	±0.001 ^a
13	2.73%	±0.001 ^b	2.87%	±0.000 ^a
14	2.87%	±0.001 ^b	2.90%	±0.000 ^a
15	2.87%	±0.001 ^b	2.90%	±0.000 ^a

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$. Fonte: Elaborado pelo autor.

6. CONCLUSÕES

Diferente do que é amplamente divulgado em literatura, os resultados mostraram que a fermentação da cerveja ale ocorreu nas três alturas analisadas: a levedura atuou em todo o reator e, nas duas temperaturas utilizadas, a fermentação não ocorreu somente no topo, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* considerada uma levedura de fermentação alta. A viabilidade celular e quantidade total de leveduras ficaram semelhantes nas três alturas (topo, meio e próximo ao fundo do reator), e nas duas temperaturas. As análises físico-químicas de °Brix, pH, e teor alcoólico tiveram resultados próximos tanto em 12 °C como em 18 °C. O teor alcoólico das duas cervejas ale produzidas ficaram classificadas como cervejas de baixo teor alcoólico de acordo com a legislação brasileira. A conclusão é que a levedura de fermentação alta atuou por todo o reator durante os dez dias analisados nos reatores em pequena escala, e durante quinze dias nos reatores em escala piloto. Conclui-se que a levedura de fermentação alta não atuou somente no topo ou na superfície do mosto.

Para a cerveja lager, os resultados mostraram que a levedura *Saccharomyces pastorianus*, uma levedura de fermentação baixa, fermentou por todo o reator, não se limitando a atuar somente no fundo desde o início, nas duas temperaturas utilizadas, e nos reatores em pequena escala e escala piloto. A viabilidade celular obteve melhor desempenho em 18 °C, o mesmo acontecendo com a quantidade total de leveduras por ml. Não se esperava esse melhor desempenho em 18°C por ser uma levedura de fermentação baixa, e isso resultou em uma cerveja com maior quantidade de leveduras em suspensão. Em 12 °C, as fermentações ocorreram de forma mais lenta, com menor quantidade de leveduras viáveis por ml e quantidade total de leveduras por ml, resultando em uma cerveja lager mais limpa. Nas fermentações a 12 °C, a precipitação das leveduras em direção ao fundo aconteceu de forma mais rápida quando comparada com as fermentações a 18 °C. Os resultados das análises físico-químicas de °Brix, pH, e teor alcoólico obtiveram resultados próximos em 12 °C e 18 °C. Ao final das fermentações, o teor alcoólico terminou acima de 2%. Conclui-se que esta levedura não fermenta somente no fundo do reator: como os resultados mostraram, a atuação da levedura no início da fermentação foi nas três alturas analisadas, ou seja, por todo o reator, e em seguida precipitando em direção ao fundo, sendo assim a levedura de fermentação baixa não atuou somente no fundo do reator.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; et al.; **Fundamentos da Biologia Celular**, 4ª edição, Artmed, Rio de Janeiro, 2017.
- ALMAGUER, C.; SHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; et al.; Humulus lupulus – a story that begs to be told. A review, **Institute of Brewing & Distilling, J. Inst. Brew.**, 120: p. 289-314, 2014.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th. ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2005.
- ANDOGNINI, J.; **Como cultivar e garantir lucros com a cevada como cultura de inverno**, 2021, <<https://blog.aegro.com.br/cevada-como-cultura-de-inverno/>> Acesso em: 12/07/22.
- ATANASOVA, M.; YORDANOVA, G.; NENKOVA, R.; Ivanov, Y.; et al.; Brewing yeast viability measured using a novel fluorescent dye and image cytometer. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 33(1), 548–558, 2019.
- AURINA, K.; SARI, A.; Ohmic Heating: A Review and Application in Food Industry. In Proceedings of the **2nd International on Smart and Innovative Agriculture (ICoSIA 2021)**, Yogyakarta, Indonesia, 3–4 November 2021; Volume 19, p. 107–113. 2021.
- BAHRI, A.; ZOUAKI, H.; A surf-color moments for images retrieval based on Bag-of-Feature. **European Journal of Computer Science and Information Technology**, v. 1, p. 11-22, 2013.
- BARNES, Z. C.; Brewing process control, in **Handbook of brewing, Third Edition**, CRC Press, Boca Raton, 2018.
- BARTH, R.; **The Chemistry of Beer, The Science in the Suds**, Nova Jersey, Estados Unidos, Editora Willey, 2013.
- BEGA, E. A.; DELMÉE, G. J.; COHN, P. E.; et al.; **Instrumentação Industrial**, 3ª ed., Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2003.
- BELULI, V. M.; Smart beer production as a possibility for cyber-attack within the industrial process in automatic control. **Procedia Computer Science**, 158, 206–213. 2019.

BHONSALE, S.; MORES, W.; VAN INPE, J.; et al.; Dynamic Optimisation of Beer Fermentation under Parametric Uncertainty. **Fermentation**, 7, 285, 2021.

BHUVANESWARI E.; ANANDHARAMAKRISHNAN C.; Heat transfer analysis of pasteurization of bottled beer in a tunnel pasteurizer using computational fluid dynamics. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 23, 156–163, 2014.

BLŠÁKOVÁ, L.; GREGOR, T.; MEŠT'ÁNEK, M.; et al.; V. The Use of Unconventional Malts in Beer Production and Their Effect on the Wort Viscosity. **Foods** 2021, 11, 31. 2021.

BOND, U., NEAL, C., DONNELLY, D., JAMES, T. C.; Aneuploidy and copy number breakpoints in the genome of lager yeasts mapped by microarray hybridisation. **Current Genetics**, 45(6), 360–370 (2004).

BORTOLI, D. A. S.; SANTOS, F.; STOCCO, N. M.; Leveduras e produção de cervejas Revisão. **Bioenergia em revista: diálogos**, v. 3, n. 1, p. 45-58, jan./jun. 2013.

BOULTON, C; QUAIN, D; **Brewing Yeast Fermentation, 1st Ed.**, Blackwell Science, Londres, Inglaterra, 2001.

BRASIL 2019, Ministério da Agricultura e Abastecimento – MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 64, Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cerveja, De 10 Dezembro de 2019, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2019

CABALLERO, B; FINGLAS, P. M; TOLDRÁ, F; **Beer, History and Types, Encyclopedia of Food and Health**, Academic Press Elsevier, Londres, 2016.

CALADO, L. S; LACERDA, A. L. F.; et al., Low-cost fluorescence-based method for beer bitterness measurement, **Journal of Food Engineering**, 262 (2019) 9–12.

CAMPBELL, S. L.; The continuous brewing of beer. **VI-Food-A-Beer**:1-8, 2018.

CANONICO, L.; GALI, E.; CIANI, E.; et al; Exploitation of three non-conventional yeast species in the brewing process. **Microorganisms**, 7, 11. 2019.

CAPECE, A.; ROMANILLO, R.; SIESTO, G.; ROMANO, P.; Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. **Fermentation**, 4(2), 38. 2018.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A.; Elementos Biotecnológicos Fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte -As leveduras, **Revista Analytica**, Outubro/Novembro 2006, nº 25, 2006.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 7, p. 1151-1161. 2008.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; **Microbiologia da fermentação alcoólica: A importância do monitoramento microbiológico em destilarias**, Coleção UAB-UFSCAR: Tecnologias das fermentações, EduFscar, São Carlos, 2012.

CEOLA, D.; **Lúpulo no Brasil: Em que pé esta o cultivo da planta no país**, 2021 <<https://cervejaemalte.com.br/blog/lupulo-no-brasil/>> Acesso em: 23/07/22.

CEREDA, M. P.; Cervejas. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W.; **Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação**, São Paulo, Edgar Blucher, p.3-78, 1983.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.G.; et al.; Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review. **Ultrasonics Sonochemistry**, 34, 540–560, 2017.

CHOI, J.H.; KANH, J.W.; MIJANUR RAHMAN, A.T.M.; LEE, S.J.; Increasing Fermentable Sugar Yields by High-Pressure Treatment during Mashing. **Institute of Brewing and Distilling J. Inst. Brew.** 2016, 122, 143–146.

CIONT, C.; EPURAN, A.; KERESZI, A.D.; COLDEA, T.E.; Beer Safety: New Challenges and Future Trends within Craft and Large-Scale Production. **Foods**, 11, 2693. 2022.

COUTINHO, C. A. T; **A história da cerveja no Brasil**, 2020, disponível em: <https://www.cervesia.com.br/artigos-tecnicos/cerveja/historia-da-cerveja/2-a-historia-da-cerveja-no-brasil.html> , Acesso em: 23/06/23.

CRISTEA, S. P.; MAZAEDA, R.; DE PRADA, C.; Optimal Control of Beer Filtration Process. **IFAC Proceedings Volumes**, 46(32), 762–767, 2013.

DAMEROW, P; Sumerian Beer: The origins of brewing technology in ancient Mesopotamia, Cuneiform Digital Library Journal 2, **Cuneiform Digital Library Journal Initiative**, 2012.

DARAMOLA, M. O.; ZAMPRAKA, L. Experimental study of the production of biomass by *Saccharomyces cerevisiae* in a fed batch fermentor. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 1107-1114, 2008.

DENG Y.; BI, H.; YIN, H; YU, J. et al.; Influence of ultrasound assisted thermal processing on the physicochemical and sensorial properties of beer. **Ultrasonics Sonochemistry**, 40, 166–173,2018.

DE SCHEPPER, C. F.; MICHAELS P.; BUVÉ, et al.; Starch hydrolysis during mashing: A study of the activity and thermal inactivation kinetics of barley malt α -amylase and β -amylase. **Carbohydrate Polymers**, 117494, 2020.

DE ROBERTS, E. M.; HIB, J.; **Biologia celular e molecular**, 17^o edição, Gen/Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2014.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUS Jr. S.; Química do Lúpulo, **Química Nova**, Vol. 42, No. 8, 900-919, 2019.

DUNN, J.; GRIDER, M. H.; **Physiology, Adenosine Triphosphate, National Library of Medicine**, disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553175/>, Acesso em: 01/05/23.

EATON, B, An overview of brewing, in **Handbook of brewing 3^o ed.**, CRC Press, Boca Raton, 2018.

EATON, B., **Placas de filtro de profundidade**, disponível em:
http://www.eaton.com.br/ecm/groups/public/@pub/@filtration/documents/content/pct_1130553.pdf Acesso em: 20/04/23.

EUMANN, M; SCHILDBACK, S; 125 Aniversary Review: Water Sources and Treatment in Brewing, **Institute of Brewing and Distilling. J. Inst. Brew.** 2012; 118: 12–21, 2012.

FELDMANN, H.; Yeast: **Molecular and Cell Biology, 2nd, Completely Revised and Greatly Enlarged Edition**, Wiley-Blackwell, 2010.

FILHO, W. G. V.; **Bebidas Alcolicas: Ciência e Tecnologia**. Volume 1. 2^o ed. São Paulo: Blucher, 2016.

FONTOURA, C. R. O.; ASEVEDO, S. M. L.; NETO, M. R. F.; Uso do simulador de processos no estudo da engenharia química: uma aplicação no processo de produção de cerveja, **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 8, p. 11724-11745, 2019.

FOOD CRUMBLES; Food Chemistry – **What is The Maillard Reaction?**,
<https://foodcrumbles.com/maillard-reaction-mechanism-hard-core-chemistry/> Acesso em: 23/04/23.

GABRIEL, P.; DIENSTBIER, M.; MATOULKOVÁ, D.; KOSAŘ, K.; SIGLER, K.; Optimised Acidification Power Test of Yeast Vitality and its Use in Brewing Practice, **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, p. 270-276, 2008.

GIBSON, B. R.; LAURENCE, S. J.; LECLAIRE, J. P. R.; Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling, **FEMS Microbiology Reviews**, 31(5), 535–569, 2007.

GIBSON, B.; GEETERMAN, J.-M. A.; HITTINGER, C. T.; et al.; New yeasts—new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. **FEMS Yeast Research**, 17(4). 2017.

GITIS, V; HANKINS, N; Water treatment chemicals: Trends and challenges, **Journal of Water Process Engineering**, nº 25, 2018, p. 34-38.

GLINSTON, R. S.; YADAV, J.; RAJAPUT. J; et al.; Contribution of yeast models to virus research, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 105(12), 4855–4878, 2021.

GREEN D.; **The science of step mashing**, disponível em: <https://byo.com/article/the-science-of-step-mashing/> Acesso em: 12/12/22.

HARBISON, M.; **BeerSci: How Beer gets its Color: Meet the Two Chemical Reactions that most influence the Malt character and Color of your Brew**, Disponível em: <<https://www.popsci.com/science/article/2012-12/beersci-how-beer-gets-its-color/>>, Acesso em: 13/08/22.

HEALEY, J.; **The Hops List, 265 beer hop varieties around the world**, 1st Ed. Self Publication, 2016.

HELD, P.; **Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces cerevisiae***, disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/monitoring-growth-of-saccharomyces-cerevisiae-5994-3284EN-agilent.pdf>, Acesso em 09/07/23.

HELANDER, I. M.; HAIKARA, A.; SADOVSKAYA, et al.; Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus*– lipopolysaccharides of a Gram-positive genus. **FEMS Microbiology Reviews**, 28(5), 543–552, 2004.

HORNSEY, I. S; Beer, History and Types in: **Encyclopedia of Food and Health**, p.345-354, Academic Press Elsevier, Londres, 2016.

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ; **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 1º ed. Digital, São Paulo, 2008.

JENKINS, L. C.; KENNEDY, I. A.; THURSTON, P.; et al.; Serial Repitching Fermentation Performance and Functional Biomarkers, **Brewing Yeast Fermentation Performance**, 2ed., 257-271, 2003.

JUNIOR, A. A. D.; VIEIRA, A. G.; FERREIRA, T. P.; Processo de produção de cerveja, **Revista Processos Químicos**, p. 61 – 71, Jul/Dez 2009.

KAHLE, E.-M., ZARNKOW, M., JACOB, F.; Beer Turbidity Part 1: A Review of Factors and Solutions. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 1–16, (2020).

KALUGINA, O.; NAFIKOVA, A.; CHERNENKOV, E.; et al, Application of ultrasound for enhancing fermentation rates in brewing technology, **Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.** 20(3) 2021, 301–312.

KAISER, M.; Brew capacity more than doubled for a wider range of products, **Krones Magazine**, 2022, disponível em: <
<https://www.krones.com/en/company/press/magazine/reference/brew-capacity-more-than-doubled-for-a-wider-range-of-products.php>> acessado em: 19/04/23.

KARABIN, M.; JELÍNEK, L.; KOTRBA, P.; CEJNAR, R.; DOSTÁLEK, P.; Enhancing the performance of brewing yeasts. **Biotechnology Advances**, 36(3), 691–70, 2017.

KARIMY, M. F.; DAMAYANTI, E.; SURYANI, A. E. et al.; A simple method for analysis of *Saccharomyces cerevisiae* morphology by applying a high vacuum mode of the scanning electron microscopy and without chemical fixatives, **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, 462, 012048, 2020.

KEUKELEIRE, D.; Fundamentals of Beer and Hop Chemistry, **Química Nova**, 23(1), p.108 – 112, 2000.

KOCH, A.L.; Growth measurement. In Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition. **American Society of Microbiology**, p. 172–199, 2007.

KODAMA, Y., KIELLAND-BRANDT, M. C., HANSEN, J.; Lager brewing yeast in SUNNERHAGEN, P.; PIŠKUR, J.; **Topics in Current Genetics**, Comparative Genomics Using Fungi as Models, p145–164, vol 15. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015.

KREISZ, S.; Malting, in **Handbook of Brewing, Process, Technology, Markets**, p. 105 – 118, Wiley-VCH, 2009.

KROGERUS, K., MAGALHÃES, F., VIDGREN, V., GIBSON, B. Novel brewing yeast hybrids: creation and application. **Appl Microbiol Biotechnol**, 101:65–78. 2017.

KUNTZ, R. J.; BAMFORTH, C. W.; Time course for the development of enzymes in barley. **Journal Institute of Brewing**, v.113, p.196-205, 2007.

KUCHARCZYK, K.; TUSZYŃSKI, T.; ŻYŁA, K.; PUCHALSKI, C.; The effect of yeast generations on fermentation, maturation and volatile compounds of beer. **Czech Journal of Food Sciences**, 38(No. 3), 144–150, 2020.

LASANTA, C., DURÁN-GUERRERO, E., DÍAZ, A. B., CASTRO, R.; Influence of fermentation temperature and yeast type on the chemical and sensory profile of handcrafted beers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2020.

LEGRAS, J-L.; L.; MERDINOGLU, D.; CORNUET, E.; et al.; Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history, **Molecular Ecology**, 16(10), 2091–2102. 2007.

LEI, H.; XU, H.; FENG, L.; YU, Z.; et al.; Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 122(5), 583–588, 2016.

LENGELER, K. B.; STOVICEK, V.; FENNESSY, R. T.; et al.; Never Change a Brewing Yeast? Why Not, There Are Plenty to Choose From. **Frontiers in Genetics**, 11, 2020.

LI, H., LIU, F.; The chemistry of sour taste and the strategy to reduce the sour taste of beer. **Food Chemistry**, 185, 200–204. 2015.

LI, X.; XU, X.; WANG, L.; REGENSTEIN, J.M.; Effect of Ohmic Heating on Physicochemical Properties and the Key Enzymes of Water Chestnut Juice. **J. Food Process. Preserv**, 43, e13919, 2019.

LIU, M.; ZHANG, M.; LIN, S.; LIU, J.; Optimization of Extraction Parameters for Protein from Beer Waste Brewing Yeast Treated by Pulsed Electric Fields (PEF). **African Journal of Microbiology Research**, 6, 4739–4746, 2012.

LIU, S.; KERR, E.D.; PEGG, C.L.; SCHULZ, B.L.; Proteomics and Glycoproteomics of Beer and Wine. **Proteomics**, 22, 2100329, 2022.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; et al.; **Biologia Celular e Molecular**, 7^o edição, Artmed, Porto Alegre, 2014.

LUDWIG, E. E.; **Applied Process Design for Chemical and Petrochemical Plants, Volume 1**, 3. ed., Houston, Estados Unidos, Gulf Professional Publishing, 1999.

MARTÍN-GARCIA, B.; TYLEWICZ, U.; VERARDO, V.; et al.; Pulsed Electric Field (PEF) as Pre-Treatment to Improve the Phenolic Compounds Recovery from Brewers' Spent Grains. **Innovative Food Science Emerging Technologies**. 2020, 64, 102402.

MEUSSDOERFFER, F. G.; A Comprehensive History of Beer Brewing in: **Handbook of Brewing, Process, Technology, Markets**, p. 1 – 42, Wiley-VCH, 2009.

MILANI, E. A.; SILVA, F. V. M.; Ultrasound assisted thermal pasteurization of beers with different alcohol levels: Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores. **Journal of Food Engineering**, 198, 45–53. 2017.

MILANI, E. A.; SILVA, F. V. M.; Pasteurization of Beer by Non-Thermal Technologies. **Frontiers Food Science Technologies**, 1, 798676. 2022.

MORADO, R.; **Larousse da Cerveja, A História e as Curiosidades de uma das Bebidas mais Populares do Mundo**, 1º Ed, Editora Alaúde, São Paulo, 2017.

MOSHER, M.; TRANTHAM, K.; **Beer Science: A Multidisciplinary Approach Second Edition**, Springer, Switzzrland, 2021.

MOURA-NUNES, N., BRITO, T. C., FONSECA, N. D., et al.; Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. **Food Chemistry**, 199, 105–113, 2016.

MUXEL, A. A.; **A Química da Cor da Cerveja**, Universidade Federal de Santa Catarina, Blumenal – SC, 2016, Disponível em: <https://amuxel.paginas.ufsc.br/files/2016/10/A-Qu%C3%ADmica-da-cor-da-erveja_3.pdf>, Acesso em: 08/08/22.

MUNFORD, A. R. G., ALVARENGA, V. O., PRADO-SILVA, L.; Sporeforming bacteria in beer: Occurrence, diversity, presence of hop resistance genes and fate in alcohol-free and lager beers, **Food Control**, 81, 126–136, 2017.

NETO, D. M.C.; MOREIRA, L. L. P. F.; CASTRO, E. V. R.; et al.; Estudo do perfil químico de cervejas brasileiras: Uma avaliação entre as bebidas artesanais e industriais, **Química Nova**, Vol. 45, No. 5, 518-530, 2022.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R.; Viabilidade celular de *Saccharomyce cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contiminantes da fermentação alcoólica, **Ciência e Tecnologia Alimentar**, 27(1): p. 20-25, Jan. - Mar. 2007.

O.I.V.; **Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts Analysis**, Vol. 1, Edition 2021, International Organization of Vine and Wine, Paris, França, 2021.

OJO, F. T.; **Microbiological Quality Control of Beer in Brewing Industry**, disponível em: <https://researcharena.webs.com/Term%20paper%20on%20quality%20control%20of%20beer.pdf>
Acesso em: 13/01/23.

PADUA, E. A.; OLIVEIRA, A. C.; SGARBIERI, V. C.; Importância da parede celular de levedura (*Saccharomyces* sp.) como fonte de fibra na alimentação, **Food Science Technology**, 20 (2), 2000.

PALMER, J.; KAMINSKI, C.; **Water: A comprehensive guide for brewers**, Brewers publications, 2013.

PAULA, C. A. P.; FARIA, J. B.; Avaliação do uso da levedura de descarte da indústria cervejeira na obtenção da aguardente de liquor de laranja. **Brazilian Journal of Food Technology**, 20(0), 2017.

PIRES, E.; TEIXEIRA, J. A.; BRÁNYIK, T. et al.; Yeast: the soul of beer's aroma: a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, n. 5, p. 1937-1949, 2014.

QUAIN, D. E.; Yeast supply and propagation in brewing in **Brewing, New Technologies**, Cambridge, Woodhead Publishing Limited, 2006, 167–182. (2006).

RODHOUSE, L.; CARBONERO, F.; Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1–12, 2017.

RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O.; Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, 23(2), 257–261, 2000.

RODRIGUES, Y. B.; AGUILAR, G. I.; SILVA, J. B. A.; Utilização do malte de sorgo na produção de cerveja: Uma revisão bibliográfica, **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 21, e2017 198, 2018.

ROCKWELL.; Sleeman Breweries Increases Production Capacity by 50 Percent in Two Weeks with Virtualized Process Automation System, **Rockwell Automation**, 2023, disponível em: <https://www.rockwellautomation.com/en-us/company/news/case-studies/sleeman-breweries-increases-production-capacity-by-50-percent-in.html> Acesso em: 12/03/23.

ROGENER, F.; Filtration Technology for Beer and Beer Yeast Treatment. In **IOP Conference Series Earth and Environmental Science**; IOP Publishing, Bristol, UK, 2021.

RODRIGUES-SAAVEDRA, M.; GONZÁLES DE LLANO, D.; MORENO-ARRIBAS, V.; Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: microbiological quality and food safety. **Food Research International**, 109762, 2020.

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 *hcrA*, **Journal of Bacteriology**, v. 183, p.5371-5375, 2001.

SALARI, R.; Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. **Electronic Physician**, 9(1), 3592–3597. 2017.

SANTOS, S. P.; **Os primórdios da cerveja no Brasil**, 2º ed., Ateliê Editorial, São Paulo, 2004.

SANTOS, L.; OLIVEIRA, F.A.; FERREIRA, E. H.; ROSENTHAL, A.; Application and Possible Benefits of High Hydrostatic Pressure or High-Pressure Homogenization on Beer Processing: A Review. **Food Sci. Technol. Int.** 2017, 23, 561–581.

SCLIFOS, A.; SCUTARU, I.; The Influence of Microorganisms on Beer Quality, **Journal of Engineering Science**, 29, 161–171, 2022.

SCHNEIDERBANGER, J.; GRAMMER, M.; JACOB, F.; HULTZLER, M.; Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. **Journal of the Institute of Brewing**, 124(2), 173–181, 2018.

SHILLING, R. L.; BERNHAGEN, P. M.; GOLDSCHMIDT, V. M.; et al.; **Perry's Chemical Engineering Handbook**, Section 11, Heat-Transfer Equipment, 8ª ed. Nova Iorque, Estados Unidos, McGraw-Hill, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**, 5ª ed., São Paulo, Editora Blucher, 2017.

SILVA, P. H. A.; FARIA, F. C.; Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(4): 902-906, out.-dez. 2008.

SILVA, D. F.; SOUZA, P. G.; ALBUQUERQUE, P. M.; Avaliação da eficácia dos principais métodos de estabilização coloidal da cerveja tipo American Lager, **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.4, p.34657-34670, 2021.

SOUZA, J; WEBER, V; GONÇALVES, A.; et al.; Viable Yeast Identification using Bag of Visual Words in Colored images, in: **Workshop de Visão Computacional (WVC)**, 16, 2020, Evento Online, Anais, Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Computação, p. 129-133, 2020.

SPITAEELS, F., WIEME, A. D., JANSSENS, M., et al; The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer. **PLoS ONE**, 9(4), e95384. 2014.

STODART, M. J.; Cell Viability Assays: Introduction. **Mammalian Cell Viability**, 1–6, 2011.

TADINI, C. C.; TELIS, V. R. N.; MEIRELLES, A. J. A.; FILHO, P. A. P.; **Operações Unitárias na Indústria de Alimentos**, 1. ed., Rio de Janeiro, LTC, 2016.

TSOCHPE, E. C.; **Microcervejarias e Cervejarias: A História, a Arte e a Tecnologia**, São Paulo. Ed. Aden, 223p., 2001.

TURK, M.; PLEMENITÁS, A.; GUNDE-CIMENRMAN, N.; Extremophilic yeasts: plasma-membrane fluidity as determinant of stress tolerance. **Fungal Biology**, 115(10), 950–958, 2011.

TURVEY, M. E.; WEILAND, F.; KELLER, E. J.; et al.; The changing face of microbial quality control practices in the brewing industry: Introducing mass spectrometry proteomic fingerprinting for microbial identification. **Journal of the Institute of Brewing**, 123(3), 373–387, 2017.

VAUGHAN A.; O’SULLIVAN; T.; SINDEREN, D.; Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer - A Review, **Journal of the Institute of Brewing**, 111(4), 355–371, 2005.

VENTURINI, W, G.; **Tecnologia de Bebidas**, 1 ed., Editora Edgar Blucher, São Paulo, 2005.

VERISSIMO, L. S.; FERREIRA, A.; PINHEIRO, P. F.; RIBEIRO, J. S.; Chemometric studies of hops degradation at different storage forms using UV-Vis, NIRS and UPLC analyses, **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 25, e2021093, 2022.

VIANA, A. C.; PIMENTEL, T. C.; VALE, R. B.; et al.; American Pale Ale craft beer: Influences of brewer's yeast strains of the chemical composition and antioxidante capacity, **LWT Food Science and Tecnology**, 152 (2021) 112317, 2021.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W.; **Fundamentos de Bioquímica**, Artmed, Porto Alegre, 2002.

WALKER, G.; STEWART, G.; *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. **Beverages**, 2(4), 30, 2016.

WANG, W.; LIU, H.; YU, Y.; et al.; Rapid Yeast Cell Viability Analysis by Using a Portable Microscope Based on the Fiber Optic Array and Simple Image Processing, **Sensors**, 20(7), 2092, 2020.

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

WILLAERT, R.; Sugar consumption kinetics by brewer's yeast during the primary beer fermentation, **Cerevisia**, v.26, p.43-49, 2001.

WILLKINSON, R. H; **The Complete God and Godsses of Ancient Egypt**, Thames & Hudson, Londres, 2017.

WUNDERLICH, S.; BACK, W.; Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. **Beer in Health and Disease Prevention**, 3–16, 2009.