

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”
Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição

GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS
Trabalho de conclusão de curso

DESEMPENHO FERMENTATIVO DE LEVEDURAS *Saccharomyces sp.*
VISANDO A PRODUÇÃO DE CERVEJA LAGER

CAMILA AUGUSTO CARAZZATO

PIRACICABA
2018

CAMILA AUGUSTO CARAZZATO

**DESEMPENHO FERMENTATIVO DE LEVEDURAS *Saccharomyces sp.*
VISANDO A PRODUÇÃO DE CERVEJA LAGER**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Ciências dos Alimentos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Helena da
Cruz

Piracicaba
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Carazzato, Camila Augusto

Desempenho fermentativo de leveduras *Saccharomyces* sp. visando a produção de cerveja lager / Camila Augusto Carazzato. - - Piracicaba, 2018.
43 p.

Trabalho de Conclusão de Curso – USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Fermentação 2. Bebida 3. Linhagem FT034C I. Título

Aos meus ancestrais (inclusive microbianos), que fizeram parte da linha temporal evolutiva responsável pela minha existência. Especialmente aos meus pais, J. Roberto e M. Magali, que sempre me apoiaram através dos desafios e se dedicaram à minha criação, assim como as minhas avós Aparecida e Isabel, mulheres fortes, eu **DEDICO!**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor e dedicação que me possibilitaram os meios para realizar minhas conquistas;

A minha companheira Aline, pelo amor, amizade, compreensão e paciência durante minhas ausências e ansiedades;

A minha tia Josefina, bióloga, acadêmica e educadora que me inspirou ao longo da vida;

Ao meu irmão Caio e minha cunhada Thay;

Aos meus melhores amigos, pelos incentivos necessários;

A Profa. Dra. Sandra Helena da Cruz, pelo acolhimento, encaminhamento profissional, orientação e disponibilidade;

Ao meu mentor Mário Lúcio Lopes por ter confiado na minha capacidade em realizar este trabalho, bem como pelos ensinamentos e apoio inenarrável ao longo dele;

A toda a equipe da Fermentec, pela imprescindível ajuda sempre que necessitei, especialmente a Nayara, uma alma alegre e extremamente dedicada que contagiou os ares da minha rotina com altíssimo astral;

A Ana Lúcia Fadini e ao ITAL, pela oportunidade anterior de aprender o trabalho em laboratório e iniciar minha carreira científica na pesquisa;

Ao Programa de Graduação em Ciências dos Alimentos da ESALQ/USP, pela oportunidade de realização do curso;

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, o meu **MUITO OBRIGADA!**

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	11
2 OBJETIVO GERAL.....	13
2.1 Objetivos Específicos	13
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	14
3.1 Cerveja: definição e histórico	14
3.2 Processo de produção de cerveja.....	15
3.3 Fermentação alcoólica	17
3.4 Leveduras cervejeiras	20
3.5 Inovação e qualidade	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Leveduras	25
4.2 Reagentes e Equipamentos	25
4.3 Métodos	26
4.3.1 Reativação das leveduras.....	26
4.3.2 Multiplicação das leveduras	26
4.3.3 Fermentação.....	26
4.4 Análises químicas e microbiológicas.....	27
4.4.1 Velocidade fermentativa e atenuação aparente do mosto	27
4.4.2 População viável.....	28
4.4.3 pH	28
4.4.4 Teor Alcoólico	28
4.4.5 Análises Estatísticas	29

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 Caracterização das linhagens de leveduras – estudo realizado previamente a este trabalho	29
5.2 Estudos de velocidade fermentativa e atenuação aparente do mosto	32
5.3 População viável	35
5.4 Valores de pH	37
5.5 Teor Alcoólico	39
6 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS.....	41

RESUMO

Desempenho fermentativo de leveduras *Saccharomyces sp.* visando a produção de cerveja lager

Cerveja Lager é o tipo de cerveja mais comercializado no mundo. A levedura, responsável pela transformação dos açúcares em etanol, é um dos ingredientes indispensáveis para a obtenção da bebida. As linhagens de leveduras cervejeiras comercializadas no Brasil são majoritariamente importadas, o que impacta na autossuficiência da produção nacional de cerveja. Apesar de as leveduras disponíveis se assemelharem comercialmente, diversos são os parâmetros fisiológicos que as diferenciam; assim, a escolha da levedura pode interferir diretamente no produto final. Visando avaliar o desempenho fermentativo de leveduras *Saccharomyces sp.* para a produção de cerveja Lager, as linhagens FT009C, FT030C, FT034C e FT890L, provenientes do Banco de Microrganismos da empresa Fermentec, foram submetidas a ensaios de fermentação alcoólica de mosto cervejeiro 12°Brix, a 12°C, durante 10 dias. As análises de velocidade fermentativa e atenuação aparente do mosto, população viável, pH e teor alcoólico foram avaliados. Os resultados obtidos mostraram diferenças entre as leveduras quanto a velocidade fermentativa, capacidade de atenuação e população viável, com destaque para a linhagem codificada FT034C, que concluiu a fermentação com uma vantagem de 4 dias em relação as outras leveduras, além de atingir uma atenuação aparente mais completa e contagem maior de células viáveis durante a fermentação. No entanto, não houve diferenças significativas quanto ao pH e teor alcoólico dos mostos fermentados pelas quatro leveduras, sendo que todas obtiveram resultados requeridos para produção de cerveja Lager, de acordo com os padrões de classificação encontrados na literatura. Sendo assim, conclui-se que a linhagem de *Saccharomyces sp.* FT034C exibiu o melhor desempenho fermentativo nas condições estudadas, com potencial para ótima performance em cervejarias, oferecendo uma atraente opção de insumo para o setor cervejeiro nacional.

Palavras-chave: fermentação; bebida, linhagem FT034C.

ABSTRACT

Fermentative performance of *Saccharomyces sp.* yeast for lager beer production

Lager beer is the most commercialized kind of beer in the world. Yeast, responsible for the transformation of sugars into ethanol, is one of the indispensable ingredients for obtaining the beverage. Brewer's yeast strains available for commercialization in Brazil are mostly imported, which impacts on the self-sufficiency of national beer production. Although the available yeasts resemble each other commercially, several physiological parameters differentiate them; thus, the choice of yeast may directly interfere with the final product. Aiming to evaluate the fermentative performance of yeast *Saccharomyces sp.* for the production of Lager beer, the strains FT009C, FT030C, FT034C and FT890L, from the Microorganisms Bank of the company Fermentec, were tested for alcoholic fermentation of brewer's wort 12° Brix at 12°C for 10 days. The analyzes of fermentative speed and apparent attenuation of the must, viable population, pH and alcohol content were evaluated. The results obtained showed differences among yeasts in fermentation speed, attenuation capacity and viable population, especially. the FT034C coded strain, which concluded the fermentation with a 4 days advantage over other yeasts, in addition to achieving a more complete apparent attenuation and higher counts of viable cells during fermentation. However, there were no significant differences in the pH and alcohol content of the fermented wort by all four selected strains, all of which explains obtained results required for Lager beer production, according to the classification standards found in the literature. Therefore, it is concluded that the strain FT034C showed the best fermentation performance under the conditions studied, with potential for optimum performance in breweries, offering an attractive input option for the national brewing sector.

Keywords: fermentation; alcoholic beverage; FT034C strain

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Obtenção do malte _____	16
Figura 2. Etapas da produção da cerveja _____	16
Figura 3. Células de levedura <i>Saccharomyces sp.</i> observadas em microscópio eletrônico _____	20
Figura 4. Cariotipagem das linhagens (A) FT009C e (B) FT030C da levedura <i>Saccharomyces sp.</i> selecionadas e armazenadas no Banco de Microrganismos da Fermentec _____	30
Figura 5. Cariotipagem das linhagens (A) FT034C e (B) FT890L da levedura <i>Saccharomyces sp.</i> selecionadas e armazenadas no Banco de Microrganismos da Fermentec _____	31
Figura 6. Fermentação de mosto cervejeiro (12ºBrix) pelas linhagens de <i>Saccharomyces sp.</i> : FT009C, FT030C, FT034C e FT890L a 12°C. _____	32
Figura 7. Crescimento populacional de células viáveis das linhagens de <i>Saccharomyces sp.</i> : FT009C, FT030C, FT034C e FT890L durante fermentação alcoólica de mosto cervejeiro (12ºBrix) a 12°C _____	35
Figura 8. Redução do pH do meio após fermentação alcoólica do mosto cervejeiro (12ºBrix) pelas linhagens de <i>Saccharomyces sp.</i> : FT009C, FT030C, FT034C e FT890L a 12°C _____	38
Figura 9. Produção de etanol após 216 horas de fermentação de mosto cervejeiro (12ºBrix) a 12°C pelas linhagens de <i>Saccharomyces sp.</i> : FT009C, FT030C, FT034C e FT890L _____	39

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro proveniente do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. As cervejas podem ser classificadas em diferentes tipos, dependendo da cor e teor alcoólico da bebida, além da proporção de malte de cevada e do extrato primitivo do mosto cervejeiro. Uma classificação bastante interessante é aquela relacionada ao tipo de fermentação, ou levedura utilizada.

Deste modo, quanto à fermentação, o guia de estilos Beer Judge Certification Program (BJCP, 2015) resume os tipos e estilos de cerveja em: ale, lager e fermentação espontânea, devido ao método utilizado para as cervejas fermentadas em tanques abertos, sem a inoculação direta de um microrganismo selecionado artificialmente.

O termo “Lager” diz respeito a uma das três famílias de cerveja, reconhecidas globalmente por convenção, de acordo com o processo fermentativo aplicado para a obtenção da bebida (BJCP, 2015). Lager é o tipo de cerveja mais comercializado no mundo, chegando a 90% de toda a produção global (SILVA, 2005). No Brasil, o consumo da bebida representa 98% de todas as cervejas ofertadas no mercado (ABRABE, 2018).

Para a obtenção da cerveja Lager, a fermentação é, tradicionalmente, realizada por leveduras *Saccharomyces pastorianus*, em temperatura entre 7 e 15°C, com duração de 7 a 15 dias (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Esta família de cervejas contém diversos estilos, que apresentam características diversificadas de acordo com outras variantes do processo (BJCP, 2015).

Atualmente, o mercado de cervejas está em expansão no Brasil, segundo apresentado em Euromonitor (2016), o que modifica a experiência do consumidor, que tende a ficar mais exigente, requisitando aperfeiçoamentos e inovações constantes, sustentando a crescente valorização da cerveja nacional.

No entanto, o Brasil se encontra numa posição comercial desfavorável em relação aos principais países produtores de cerveja, como Estados Unidos e Alemanha. Isso porque o Brasil não é considerado autossuficiente na produção dos insumos para a bebida (SARNIGHAUSEN; SARNIGHAUSEN; PAI, 2018). Malte, lúpulo e leveduras são insumos básicos que, em grande parte, precisam ser importados. Consequentemente, as cervejarias brasileiras são dependentes dos preços determinados pelos fornecedores internacionais e de fatores como a

variação da taxa de câmbio, tarifas de importação, disponibilidade de produtos, transportes por longas distâncias, atrasos na entrega, mal acondicionamento, etc. (FURLAN, 2016).

Tal condição impacta o setor cervejeiro no país, tornando alto e pouco previsível os custos de produção e exigindo proteção contra riscos. Em última análise, tais pontos têm como consequência a elevação dos preços para o consumidor final e a instabilidade da qualidade do produto (SARNIGHAUSEN; SARNIGHAUSEN; PAI, 2018; SEBRAE, 2015).

Neste sentido, melhorias e manutenções no processo de produção são essenciais para que o fabricante possa oferecer um produto microbiológica-, química- e, consequentemente, sensorialmente qualificado, de forma contínua e padronizada, atendendo a demanda com eficiência e qualidade (SEBRAE, 2017).

As leveduras, essenciais para o processo cervejeiro, são microrganismos unicelulares que transformam o açúcar do mosto cervejeiro em etanol, gás carbônico e compostos secundários, sendo estes responsáveis por parte do sabor e aroma do produto final (HUGHES, 2013). Estes compostos têm grande influência sobre a cerveja, e sua síntese está ligada tanto aos substratos do mosto quanto às condições fisiológicas das leveduras utilizadas. Portanto, o estudo das características fermentativas das leveduras é fundamental para compreender o perfil da bebida que se deseja obter e aprimorar a escolha do microrganismo a ser utilizado (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Além disso, a disponibilidade de linhagens de leveduras é variada e os parâmetros fisiológicos que as diferenciam são muitos, entre eles (WHITE; ZAINASHEFF, 2010): taxa de crescimento, velocidade fermentativa, capacidade de atenuação e flocação. Estas diferenças irão resultar no produto final quanto ao seu teor alcoólico, corpo, textura, carbonatação, turvação, formação de espuma, aroma, sabor, *off-flavors*, etc. Com isto, conclui-se que o mosto fermentado com a linhagem adequada resultará em características típicas e altamente desejadas (HUGHES, 2013).

Diante deste cenário de dependência dos insumos importados, e a fim de atender demandas mercadológicas atuais, se faz necessário vencer o desafio científico e tecnológico de seleção e produção de leveduras cervejeiras com qualidade em território nacional.

2 OBJETIVO GERAL

Analizar o desempenho fermentativo de diferentes linhagens *Saccharomyces sp.* visando a produção de cerveja Lager.

2.1 Objetivos Específicos

Conduzir ensaios de fermentação com quatro diferentes linhagens de *Saccharomyces sp.* disponíveis no Banco de Microrganismos da Fermentec e, com os dados gerados, verificar se as variedades analisadas possuem atributos fisiológicos desejáveis para a produção de cerveja Lager e se diferem com relação a velocidade fermentativa, atenuação aparente do mosto, população viável, pH e teor alcoólico da cerveja produzida.

A empresa Fermentec¹ – Soluções em Açúcar e Álcool Ltda. possui atualmente mais de 440 bactérias e 2.800 leveduras isoladas de fermentações industriais em diversas regiões e processos diferentes, esta coleção foi catalogada ao longo de 30 anos de pesquisas e isolamento de leveduras para aplicação biotecnológica.

¹ <https://www.fermentec.com.br/capa.asp?p=257>

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Cerveja: definição e histórico

Segundo a legislação brasileira, cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. Pode ser classificada quanto ao seu extrato primitivo, cor, teor alcoólico e proporção de malte de cevada contido na composição (BRASIL, 2009).

O Brasil é o terceiro maior produtor da bebida (13 bilhões de litros por ano), com um consumo per capita de 62 litros ao ano, com potencial para crescimento, considerando que este número representa menos da metade do consumo per capita na República Checa (147 litros consumidos por pessoa ao ano) (CERVBRASIL, 2016).

Do ponto de vista econômico, como apresentado em Euromonitor (2016), a produção de cerveja assume importância cada vez maior no país, com vendas de R\$ 108,9 bilhões em 2014 e aproximadamente 2,2 milhões de pessoas empregadas no setor, gerando R\$ 70 bilhões em faturamento, R\$ 27 bilhões em salários e R\$ 21 bilhões em impostos (SEBRAE, 2015). Atualmente a cerveja é responsável por 1,6% do PIB e apresenta lucro maior que o dobro do investimento (ABRABE, 2018).

A cerveja é um produto que vem conquistando espaço na cultura e economia brasileira desde o surgimento das primeiras cervejarias no século XIX (SANTOS, 2004). Na época, cervejas da escola inglesa eram os estilos dominantes no país, até 1870, quando a importação começou a declinar significativamente devido à concorrência com a cerveja alemã e com as nacionais mais econômicas e acessíveis (FURTADO, 2005).

A cerveja Lager ganhou espaço nas importações brasileiras a partir da segunda metade do século XIX, quando as tecnologias de refrigeração se aprimoraram e a produção deste estilo se fortaleceu na Baviera (SANTOS, 2004). Mas a tendência foi interrompida, devido ao aumento de impostos sobre a importação no final do século XIX, incentivando o desenvolvimento das cervejarias nacionais, que mantiveram as tradições das receitas alemãs (COUTINHO, 2018).

A demanda construída pela preferência dos consumidores brasileiros por este estilo de cerveja pode ser atribuída as características sensoriais como leveza e refrescância, compatíveis com o clima tropical do país, além do preço mais acessível (SANTOS, 2004).

As Lager são as cervejas mais consumidas no Brasil, sendo responsáveis por R\$ 108,1 bilhões do total de cervejas comercializadas, 99,3% do total das vendas e 99% do volume comercializado em 2014 (EUROMONITOR, 2016).

Lager é o tipo de cerveja condicionada a baixas temperaturas durante as etapas de fermentação e maturação do processo produtivo. Apesar de ser popularmente conhecida como uma bebida clara, pode ser escura, dependendo do malte utilizado (MORADO, 2009).

Para evitar as deteriorações por microrganismos na cerveja durante as altas temperaturas do verão, os mestres-cervejeiros da Baviera armazenavam a bebida dentro de barris, em porões gelados com neve, pois ainda não havia sido inventado os sistemas de refrigeração, segundo Libkind et al. (2011). Ao processo de maturação em temperaturas baixas por longos períodos de tempo se dava o nome "*Lagering*".

Entre as Lager existe uma grande variedade de estilos: *American Lager*, *Pilsner*, *Helles*, *Dunkel*, *Bock*, *Schwarzbier*, etc., sendo todos caracterizados por sabores e aromas suaves, teor alcoólico baixo (geralmente 3 a 5%, v/v), leveza e limpidez (JACKSON, 1988).

Assim se desenvolveu o estilo *Pilsner*, pioneiro da família das Lager, e mais tarde, sob sua influência, o estilo *American Lager*, que dominou o mercado, se consolidando como o mais produzido e consumido no mundo inteiro (ALWORTH, 2015). No Brasil, mais de 90% do consumo é representado por cervejas da família Lager (EUROMONITOR, 2016).

3.2 Processo de produção de cerveja

O processo de produção da cerveja envolve diversas etapas: obtenção do malte (Figura 1), preparo do mosto (moagem do malte, mosturação ou brasagem, filtração do mosto, fervura e resfriamento do mosto), processo fermentativo (fermentação primária e maturação ou fermentação secundária) e etapa de acabamento (Figura 2). Além destas, as etapas de envase e pasteurização são opcionais (PALMER, 2006).

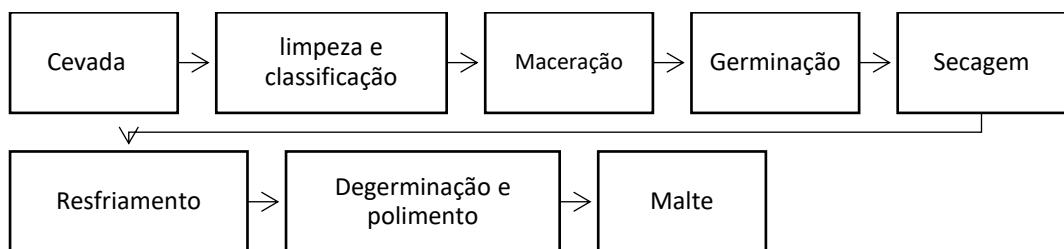


Figura 1. Obtenção do malte

Fonte: Wyler, 2013

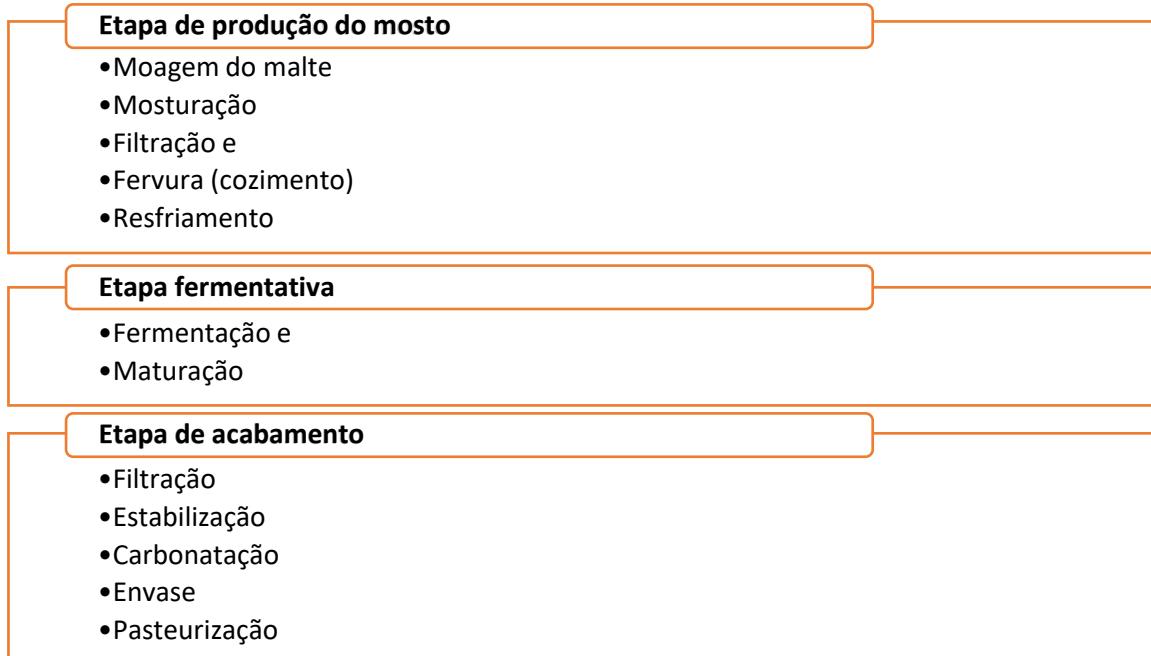


Figura 2. Etapas da produção da cerveja

Fonte: Wyler, 2013

Após a moagem do malte, é realizada sua mistura com água em temperatura controlada, com o intuito de solubilizar os constituintes solúveis do malte, ativar enzimas como as amilases, que convertem o amido em açúcares fermentescíveis e dextrina, e as proteases, que degradam as proteínas do meio formando aminoácidos e peptídeos (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2008).

Segundo Cereda (1983), as reações enzimáticas podem ser aceleradas também em função do pH. Por isso, dependendo do estilo de cerveja que se deseja produzir, será necessário controlar o pH do mosto e ajustar a programação de tempo

e temperaturas do processo de mosturação, além de definir os ingredientes de acordo com suas características e quantidade.

A filtração tem como objetivo separar a parte sólida da líquida; de acordo com Silva (2005), a casca do malte serve como camada filtrante. Após a separação das partes, a camada filtrante é lavada com água a, aproximadamente, 75°C, visando diluir e extrair os açúcares remanescentes na casca do malte e interromper as ações enzimáticas através da inativação.

A fervura do mosto coagula as proteínas que precipitam em flocos denominados *trub* (CEREDA, 1983; SILVA, 2005). O lúpulo é adicionado neste momento para dar sabor e amargor na cerveja, além de servir como agente antimicrobiano. Terminada a fervura, elimina-se o *trub* e resfria-se o mosto. A temperatura final vai depender do tipo de fermentação escolhida para o estilo de cerveja. Na saída do trocador de calor ocorre a incorporação de oxigênio para ação das leveduras durante a fermentação (SILVA, 2005).

Ao fim da fermentação primária o resultado é uma bebida que necessita de aprimoramento sensorial, o que ocorre por meio da maturação ou fermentação secundária. A maturação ocorre em temperatura entre 0 e 3°C, e pode levar semanas ou meses, dependendo do tipo de cerveja que está sendo produzida (CEREDA, 1983).

A maturação ou fermentação secundária visa, segundo Kunze (2004), reduzir, principalmente, compostos formados na fermentação primária, como diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico, melhorando o aroma e sabor da cerveja.

Por fim, a cerveja pode ser filtrada, envasada em latas, garrafas ou barris, e pasteurizada (PALMER, 2006).

3.3 Fermentação alcoólica

A fermentação é uma das práticas mais antigas da produção de alimentos. Durante o processo fermentativo há uma troca química que produz moléculas orgânicas pela ação de microrganismos, cujo controle do processo se dá por meio da seleção dos microrganismos, dos substratos disponíveis, temperatura e pH adequados (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

Na indústria de alimentos três tipos de fermentação são as mais usadas: a fermentação láctica, acética e alcoólica. Este último tipo é utilizado, principalmente, na produção de bebidas alcoólicas, fermentadas ou destiladas (SILVA, 2005).

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbio, realizado por leveduras e algumas bactérias, no qual açúcares contidos no meio/mosto são convertidos em energia celular, etanol, gás carbônico e compostos secundários. Essa etapa depende de mecanismos celulares que são influenciados por fatores como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, agitação, disponibilidade de açúcares e nutrientes, presença de contaminantes e taxa de inoculação da levedura (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

De acordo com Venturini Filho e Cereda (2001), a fermentação para produção de cerveja tem início com a adição da levedura no mosto cervejeiro resfriado e, opcionalmente, aerado. A quantidade de células adicionadas varia conforme o teor de açúcares no mosto e a temperatura de fermentação.

O mosto cervejeiro é composto pelos açúcares: maltose (50-60%), maltotriose (15-20%) e glicose (10-15%); o fenótipo das leveduras em fermentar estes açúcares dita sua capacidade de atenuação e eficiência de fermentação (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

As leveduras catabolizam os açúcares por duas vias metabólicas: a respiratória e a fermentativa. Sob condições de aerobiose o oxigênio injetado no mosto, antes da inoculação da levedura, será consumido em poucas horas, atuando na síntese da membrana celular (BERGMAN, 2001; SILVA, 2005). Depois que o oxigênio é consumido, as células de levedura passam a atuar por via fermentativa, catabolizando os açúcares do meio e sintetizando energia, etanol, gás carbônico e compostos secundários (STEWART, 2000).

Os principais produtos formados durante a fermentação alcoólica são etanol e dióxido de carbono; em menores quantidades são formados, também, ácidos orgânicos, compostos sulfurados, álcoois superiores e ésteres. O tipo e a concentração destes compostos secundários determinam o sabor e aroma da cerveja (STEWART, 2000). A formação de compostos secundários durante a fermentação depende do metabolismo da levedura, ou seja, das características genéticas da linhagem de levedura utilizada (KUNZE, 2004).

De acordo com BJCP (2015), a categorização básica de estilos de cerveja mais comumente utilizada atualmente se dá pelo tipo de fermentação alcoólica, sendo: fermentação de alta temperatura para estilos *ale*, fermentação de baixa temperatura para estilos *Lager*, e fermentação espontânea para estilos *wild*.

As cervejas do tipo ale são fermentadas por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, em temperatura entre 18 e 22°C, com duração geralmente de 3 a 7 dias. As cervejas Lager são fermentadas por leveduras *S. pastorianus*, em temperatura entre 7 e 15°C, com duração geralmente de 7 a 15 dias (ARAÚJO et al., 2003). Por outro lado, as cervejas de fermentação espontânea são fermentadas por leveduras e bactérias encontradas no ambiente, em temperatura ambiente, podendo durar de meses até anos (VAN OEVELEN et al., 1977).

Um modo de atingir o perfil sensorial requerido para o estilo da cerveja, além da qualidade microbiológica e físico-química e da eficiência fermentativa, segundo White e Zainasheff (2010), é através do uso de linhagens de leveduras adequadas, puras e não contaminadas por outros microrganismos. Assim, a caracterização de diferentes linhagens se mostra essencial para otimizar o processo de produção da bebida.

De acordo com Steiner e colaboradores (2012), o percentual de atenuação depende da disponibilidade de açúcares fermentescíveis no mosto cervejeiro, o que está diretamente relacionado às condições utilizadas no processo de maltagem. Porém, outro fator que pode afetar a atenuação do mosto cervejeiro está vinculado às características específicas de cada linhagem, como a capacidade de assimilação de fontes de açúcar e viabilidade das células, considerando que células não viáveis não contribuem para a fermentação.

Cherubin (2003) sugere que existe correlação positiva entre a viabilidade da levedura e o rendimento fermentativo, o que mostra a importância deste atributo do insumo para a eficácia da fabricação e qualidade do produto final. Neste sentido, a manutenção da viabilidade é uma das características mais desejadas na busca por linhagens de leveduras (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Quanto à eficiência da atenuação dos açúcares do mosto cervejeiro, acredita-se haver relação com a vitalidade das células e, consequentemente, com a qualidade do produto final. BJCP (2015) sugere que para evitar a formação do composto acetaldeído, em níveis indesejáveis, é preciso garantir a inoculação de leveduras saudáveis, que promovam atenuação completa do mosto.

Embora todas as linhagens de *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* realizem o mesmo trabalho de fermentação alcoólica, o sabor do produto obtido difere de uma linhagem para outra, em função de pequenas diferenças bioquímicas de metabolismo. Assim, pode-se concluir que o amplo espectro de conhecimentos

derivados do uso de leveduras é imprescindível para a melhoria do processo fermentativo cervejeiro (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006).

Idealmente, leveduras, para serem consideradas aptas a produção de cerveja, devem apresentar alta viabilidade e ocasionar completa atenuação do mosto cervejeiro, para fins qualitativos (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Para fins econômicos, a velocidade com a qual ocorre a atenuação completa do mosto cervejeiro oferece vantagem competitiva para a cervejaria, que ganha tempo e eficiência durante a produção, promovendo redução de custos (FONSECA, 2016).

3.4 Leveduras cervejeiras

As leveduras são microrganismos eucarióticos predominantemente unicelulares, pertencentes ao Reino Fungi, e se reproduzem de forma assexuada por brotamento ou gemulação (Figura 3). Desde os primórdios, os humanos exploram a capacidade destes microrganismos para ampla gama de aplicações, incluindo a obtenção de diversos alimentos e bebidas (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

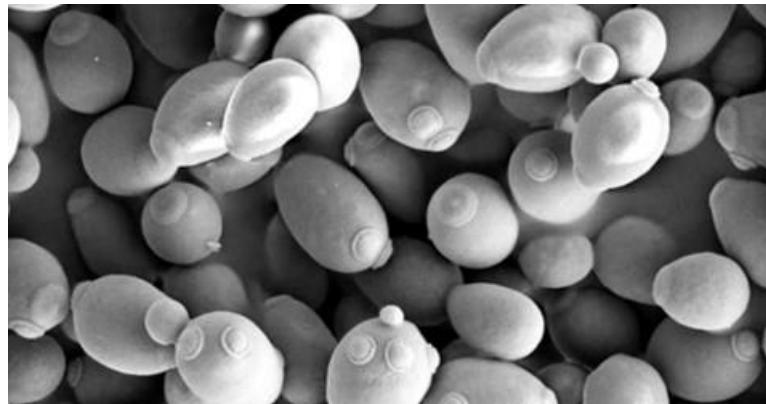


Figura 3. Células de levedura *Saccharomyces sp.* observadas em microscópio eletrônico

Fonte: Murtey; Ramasamy, 2016

Existem mais de 1.500 espécies diferentes de leveduras, sendo *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* as mais empregadas na produção de cervejas (HUGHES, 2013). As leveduras, classificadas como do tipo *ale*, ou de alta fermentação, são aquelas que tipicamente trabalham em temperaturas mais altas e, por consequência, produzem ésteres complexos, resultando em ampla formação de sabores e aromas. Enquanto, as leveduras do tipo *Lager* trabalham melhor em temperaturas mais

baixas e tendem a produzir cervejas com sabores mais leves e neutros, pois produzem menos ésteres e mais diacetil, um composto que pode ser desejável ou não, dependendo da quantidade e do estilo de cerveja que se pretende obter (SILVA et al., 2010 apud WYLER, 2013).

Além da produção de compostos secundários, outros parâmetros diferenciam as linhagens de leveduras, como por exemplo, sua capacidade de atenuação e floculação, termos que implicam na eficiência de assimilação do açúcar disponível no mosto e na clarificação da cerveja, respectivamente (HUGHES, 2013).

A disponibilidade de linhagens de leveduras é ampla e varia dependendo das características desejadas. De acordo com as diferenças fisiológicas e metabólicas das leveduras, o produto final será característico quanto ao teor alcoólico, corpo, textura, carbonatação, turvação, formação de espuma, aroma, sabor, *off-flavors*, etc. (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

As leveduras industriais, de acordo com Gallone et al. (2016), foram claramente submetidas à domesticação, o que se reflete em seus genomas. Curiosamente, a domesticação parece mais forte nas leveduras cervejeiras, que demonstram características de domesticação como decaimento da reprodução sexual e resistência geral ao estresse, bem como, evolução de características desejáveis como o uso da maltotriose durante a fermentação. Muitas dessas características podem ter sido simplesmente o resultado da adaptação das leveduras às suas atividades em ambientes industriais. No entanto, para outras, é provável que os seres humanos tenham intervindoativamente (GALLONE et al., 2018).

Na fabricação de cervejas, a introdução do uso de linhagens de cultura pura promoveu uma importante mudança, resultando em fermentações mais rápidas e previsíveis, tornando mais eficiente e controlado os processos de produção (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

A primeira linhagem de levedura *Lager* selecionada, descendente de híbrido formado entre *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*, é conhecida como *Saccharomyces pastorianus* e acredita-se que tenha sido originada da Patagônia (DUNN; SHERLOCK, 2008).

Desenvolvimentos como o progresso atingido na microbiologia por Pasteur, e outros trabalhos com leveduras, como a seleção da *S. pastorianus* por Emil Christian Hansen, na Dinamarca em 1883, promoveram a introdução desta levedura

nas cervejarias, sendo utilizada em escala industrial na produção de cervejas desde então (WALTHER; HESSELBART; WENDLAND, 2014).

O gênero *Saccharomyces* inclui muitas espécies de leveduras e a *S. cerevisiae* apresenta várias linhagens (HUGHES, 2013); diferentes espécies e linhagens podem ser consideradas para produzir cerveja. Porém, segundo White e Zainasheff (2010), é necessário observar as diferenças bioquímicas existentes entre elas, pois são estas diferenças que justificam o motivo pelo qual as características das cervejas são determinadas pela levedura utilizada.

O desempenho fermentativo das leveduras cervejeiras é influenciado e controlado por vários fatores como a viabilidade e a vitalidade das células, assim como sua tolerância ao estresse, a concentração celular do inóculo, a disponibilidade nutricional (íons e minerais) e as condições físicas do meio (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e a densidade do mosto) (BERGMAN, 2001).

As principais propriedades das leveduras, para que sejam consideradas adequadas à produção de cerveja, segundo White e Zainasheff (2010) são: velocidade fermentativa rápida, tolerância ao estresse imposto pela pressão osmótica e concentração de etanol no meio, crescimento celular equilibrado, conversão eficiente da maltose e maltotriose em etanol, reprodutibilidade na produção de compostos voláteis, manutenção da viabilidade e estabilidade genética. Segundo Furlan (2016), muitas linhagens de leveduras disponíveis no mercado brasileiro são limitadas em várias dessas características.

Não é incomum relatos de mestres cervejeiros decepcionados com as fermentações resultantes da inoculação de leveduras *Saccharomyces sp.* para a produção de cerveja Lager em suas cervejarias. Na maioria das vezes as reclamações envolvem a lentidão da atenuação do mosto, além de não ocorrer completamente, causando formação de off-flavors e delongas no cronograma da produção, resultando em prejuízos financeiros. (*Informação pessoal obtida junto a diversos mestres cervejeiros, 2018*).

Por outro lado, Lodolo e Cantrell (2007) consideraram a vitalidade da levedura uma abordagem para prever o desempenho de fermentação. As definições de vitalidade que foram propostas por eles envolvem a capacidade das leveduras para iniciar o metabolismo rapidamente após a sua inoculação no mosto cervejeiro, a capacidade de atenuar os açúcares contidos no mosto e o estado fisiológico da população de células viáveis.

Estudos com leveduras cervejeiras são úteis para cervejarias que desejam substituir sua linhagem de levedura ou introduzir uma inédita visando desenvolver cervejas novas, com propriedades específicas, ou até para modificar aspectos no processo de produção que necessitem melhorias (MEIER-DÖRNBERG et al., 2017).

3.5 Inovação e qualidade

O surgimento de cervejarias menores, influenciadas pelo movimento *Craft Beer* dos EUA, começou a ocorrer no Brasil em meados de 1990, e exerce hoje grande influência na cultura cervejeira nacional, pois possuem maior preocupação com a qualidade dos ingredientes, e buscam oferecer opções diferenciadas das cervejas produzidas em larga escala (SEBRAE, 2017).

No entanto, as cervejarias artesanais, como são chamadas, encontram dificuldades para competir com as cervejas “de massa” produzidas por cervejarias pertencentes a grandes grupos empresariais. Devido a produção em menor escala, as cervejarias menores costumam trabalhar com matérias-primas mais caras, muitas vezes importadas, o que faz com que o custo final seja até cinco vezes mais oneroso (SEBRAE, 2015).

Exemplos de inovações relacionadas tanto ao processo produtivo quanto ao cultivo nacional dos principais ingredientes da bebida vêm ocorrendo recentemente no setor cervejeiro brasileiro. Mais de 90% da cevada plantada no país, atualmente, é fruto de pesquisa nacional liderada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2018). O mesmo acontece com o lúpulo (*Humulus lupulus*), que graças ao avanço de pesquisas em parceria com pequenos produtores está começando a ser cultivado com bons resultados em solo brasileiro (SARNIGHAUSEN; SARNIGHAUSEN; PAI, 2018).

A busca por novas leveduras também é considerada um desafio científico e tecnológico. A produção de cerveja utilizando leveduras produzidas no Brasil representa uma das inovações tecnológicas mais promissoras para a indústria cervejeira nacional, pois reduz os custos com produção, importação e comercialização, além de ampliar a gama de leveduras disponíveis para a fermentação cervejeira (OLIVEIRA, 2011).

As leveduras comerciais, amplamente utilizadas no Brasil, são importadas; as linhagens sendo adquiridas de produtores brasileiros favoreceria a diminuição da

dependência externa, além da nacionalização do produto, característica que se alia ao conceito de regionalização e personalização das cervejas especiais, podendo ser revertido financeiramente através do marketing e valoração do produto, como a certificação de origem (COSTA, 2017).

Segundo Siguaw et al. (2018), a oportunidade de uma inovação gera uma ação que resulta na mudança do produto, serviço ou aplicações comerciais que, atualmente, o mundo industrial e financeiro exige para superar a competição cada vez maior.

Quando se tem capacidade de crescimento, como é o caso da indústria cervejeira no Brasil, há necessidade de desenvolvimento e destaque no mercado. Neste caso, a busca pela vantagem competitiva é fundamental (GREGORINI, 2006).

A exploração de novas matérias-primas e técnicas de produção, como a inoculação de leveduras distintas no processo fermentativo, leva à criação de cervejas diferenciadas, um atrativo para a demanda criada pelo padrão de consumo atual (MADEIRA, 2015; WHITE ZAINASHEFF, 2010).

Nos últimos anos a otimização de processos e aumento da eficiência tem sido a prioridade para muitas cervejarias. A redução de despesas foca em, dentre outras coisas, aumento das taxas de fermentação e atenuação do mosto cervejeiro, encurtamento do período de maturação, estabilização e filtragem mais eficientes e melhor qualidade microbiológica da cerveja, todos estes pontos dependentes da inoculação de uma levedura de alta qualidade (viabilidade e vitalidade apropriadas) (STEWART, 2010).

A escolha por produzir com insumos adquiridos localmente pode reduzir os custos logísticos, compensando eventuais economias de escala. Além disso, tornaria o setor um elemento que contribui com o crescimento econômico regional, por conta da cadeia produtiva envolvida (SARNIGHAUSEN; SARNIGHAUSEN; PAI, 2018; WALKER et al., 2012).

A diversidade de leveduras que podem ser aplicadas na elaboração de cerveja, juntamente com a compreensão da biologia destes microrganismos, pode ter um impacto significativo e direto sobre o setor, com potencial para melhorar a eficiência da fabricação, a diversidade de produtos e, acima de tudo, a satisfação do cliente (MEIER-DÖRNBERG et al., 2017). O interesse contínuo por parte dos cervejeiros e consumidores na diversidade sensorial significa que o mercado pode

se beneficiar dos experimentos e inovações decorrentes no campo microbiológico (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Leveduras

As leveduras utilizadas neste trabalho foram linhagens de *Saccharomyces* sp. codificadas como FT009C, FT030C, FT034C e FT890L, provenientes do Banco de Microrganismos da empresa Fermentec – Tecnologia em Açúcar e Álcool Ltda. (Tabela 1).

Tabela 1. Registro das linhagens de levedura no Banco de Microrganismos da Fermentec

Código	Gênero	Espécie	Data de isolamento	Isolado de
FT009C	<i>Saccharomyces</i>	sp	23/11/16	Levedura seca
FT030C	<i>Saccharomyces</i>	sp	08/03/18	Creme de levedo
FT890L	<i>Saccharomyces</i>	sp	07/03/08	Creme de levedo
FT034C	<i>Saccharomyces</i>	sp	03/04/18	Creme de levedo

A levedura FT009C foi utilizada como amostra controle, já que a mesma foi isolada a partir do sachê de levedura seca *Diamond – Lager Yeast*, da empresa Lallemand Inc., sendo esta uma referência de levedura disponível atualmente no mercado para a produção de cerveja Lager.

4.2 Reagentes e Equipamentos

Para a reativação das células: Extrato de malte seco não lupulado (Liotechnica); Extrato de levedura (Biospringer). Meio de cultivo Difco YPD Broth (Becton, Dickinson and Company).

Corante Eritrosina (Merck) e solução tampão fosfato de sódio (Synth) utilizados para análises no microscópio ótico. Solução tampão - pH 4,00; Solução tampão - pH 7,00.

Equipamentos: Agitador de tubos tipo Vortex; Agitador de tubos Phoenix A856; Autoclave Phoenix; Balança digital BEL; BOD Tecnal TE-371; Câmara fria Frilux; Câmara de Neubauer; Câmara de fluxo Bioflux II 90^a; Destiladora de água

Millipore 60 litros; Deionizadora de água Millipore; Densímetro digital; Incubadora Marconi; Micro-destilador Kjeldahl; Microscópio Nikon Eclipse E200; Refratômetro Atago RX-500; pHmetro Micronal B474; Ultrafreezer Indrel.

4.3 Métodos

4.3.1 Reativação das leveduras

Cem microlitros da cultura de cada levedura foram coletados de criotubos armazenados em ultra freezer a -84°C, e inoculados, de forma asséptica em câmara de fluxo, em tubos de ensaio contendo 5mL meio de cultura YPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 10 g/L; dextrose, 20 g/L), previamente esterilizados por autoclavagem a 120°C e 1 atm por 20 minutos. Os meios inoculados foram incubados a 25°C por 24 horas.

4.3.2 Multiplicação das leveduras

Para que ocorra a multiplicação das células das leveduras, priorizando sua fisiologia e mantendo seu metabolismo ótimo, foram realizadas etapas de propagação escalonada, como descrito por White e Zainasheff (2010).

Inicialmente, preparou-se um Erlenmeyer para cada levedura, contendo 50 mL de meio de cultura, YPD. Após esterilização em autoclave a 120°C e 1 atm por 20 minutos, cada Erlenmeyer foi inoculado, de forma asséptica em câmara de fluxo, com a levedura reativada, e foram incubados em mesa agitadora a 20°C e 125 rpm por 24 horas.

Após esta etapa, todo o conteúdo do Erlenmeyer foi vertido, de forma asséptica em câmara de fluxo, para outro Erlenmeyer, previamente esterilizado por autoclavagem a 120°C e 1 atm por 20 minutos, contendo 600 mL de mosto 6° Brix. O mosto foi preparado com água destilada, extrato de levedura (1%) e extrato de malte suficiente para atingir a quantidade de açucares totais desejada, segundo recomendações do fabricante, valor que conferido por análise em refratômetro. Os Erlenmeyers foram mantidos em incubadora com mesa agitadora a 15°C e 100 rpm.

4.3.3 Fermentação

As linhagens foram avaliadas quanto as suas características fenotípicas sob condições fermentativas controladas em escala laboratorial, simulando a fermentação para produção de cerveja *Lager* em cervejarias.

Após a multiplicação das células, o conteúdo de cada Erlenmeyer foi transferido, de forma asséptica em câmara de fluxo, para um recipiente correspondente, contendo o mosto cervejeiro.

O mosto cervejeiro utilizado como substrato para a fermentação foi preparado com água destilada, extrato de levedura (1%) e quantidade de extrato de malte líquido suficiente para atingir a gravidade original desejada (1048; 12ºBrix), segundo recomendações do fabricante. O recipiente foi autoclavado a 1 atm e 120ºC por 20 minutos, e então distribuído igualmente em 4 baldes de grau alimentício, totalizando 2,5 litros de mosto em cada um. Assim, foram realizados quatro tratamentos sem repetição, sendo que a duplicata ocorreu durante as análises.

As taxas de inoculação foram equivalentes para todas as linhagens: 2 x 10⁶/mL (5 bilhões de células totais), população recomendada pela empresa Lallemand Inc., fornecedora da linhagem que foi utilizada como amostra controle neste estudo. Os frascos de fermentação foram incubados em BOD, a 12ºC, durante o período de 10 dias.

4.4 Análises químicas e microbiológicas

Imediatamente após a inoculação do mosto cervejeiro foi retirada 30 mL de amostra de cada frasco, para a análise de pH. A contar do inóculo, a cada 24 horas, foram retiradas amostras periódicas de 30 mL de cada frasco de fermentação, por 10 dias, para analisar a velocidade fermentativa, a atenuação aparente do mosto e a população viável de células. No décimo dia de fermentação, foi realizada novamente a análise do pH, além do teor alcoólico, e encerrados os ensaios. Todas as análises foram realizadas após degaseificação das amostras pela agitação dos tubos falcon. As análises foram realizadas de acordo com Amorim; Zago; Oliveira (1982) e Association Of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006).

4.4.1 Velocidade fermentativa e atenuação aparente do mosto

O grau de atenuação aparente foi determinado a partir da redução do teor de sólidos solúveis no meio, medido por refratômetro e expresso em graus Brix. A velocidade fermentativa foi determinada pela correlação dos valores com o tempo de fermentação.

4.4.2 População viável

A determinação da população de células de levedura foi realizada por contagem em microscópio óptico. Amostras de 0,5 mL foram coletadas a cada 24 horas e analisadas conforme descrito por Cherubin (2003). O procedimento analítico é baseado na coloração de células de leveduras não viáveis pelo corante eritrosina, diferenciando das células viáveis que permanecem não coradas.

A diluição adequada é aquela realizada para que o número de células esteja na faixa de maior precisão da metodologia, de 300 a 500 células totais (viáveis + não viáveis). Com a contagem e sabendo as diluições utilizadas, calcula-se o número de células viáveis de leveduras por mL de amostra.

Cálculos:

$$\text{Viabilidade (\%)} = [\text{Total de células viáveis} / (\text{Total de células viáveis} + \text{não viáveis})] \times 100$$

$$\text{Células/mL} = [(\text{Total de células viáveis}/100) \times 400] \times \text{diluição final} \times 10000$$

Sendo:

100 = total de retículos contados: 25 quadrículos x 4 retículos

400 = total de retículos da câmara de Neubauer

10000 = conversão do volume da câmara de Neubauer para mL.

Diluição final = diluição inicial com água x 2 (diluição com corante).

4.4.3 pH

Os valores de pH do mosto foram determinados por leitura direta em pHmetro com eletrodo combinado e sensor de compensação de temperatura, conforme metodologia descrita por Fermentec (2003).

4.4.4 Teor Alcoólico

A determinação do teor alcoólico ao final da fermentação foi realizada conforme metodologia descrita por Fermentec (2003). A extração do etanol presente na amostra foi realizada por arraste de vapor na destilação e, em seguida, com a utilização de um densímetro digital, determinada a densidade da solução hidroalcoólica condensada. A partir desta constante física foi determinado o teor alcoólico da amostra. No densímetro a densidade é determinada pela medida da

frequência da oscilação do tubo em U preenchido com a amostra, comparada com as frequências de oscilação quando preenchido com água pura. O teor alcoólico é expresso em % de álcool em volume (v/v), a 20°C.

4.4.5 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) com fator duplo (leveduras x tempo de fermentação), sem repetição, utilizando o software Microsoft Excel versão 2010. Foi adotado como nível de significância $p \geq 0,05$ (nível de confiança 95%)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das linhagens de leveduras – estudo realizado previamente a este trabalho

As linhagens de leveduras, FT009C, FT030C, FT890L, FT034C, foram selecionadas em trabalhos anteriores realizados pela equipe de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa Fermentec, devido ao crescimento de biomassa em meio YPD a 8°C, indicando que poderiam ser opções viáveis para fermentações alcoólicas conduzidas para a produção de cerveja do tipo Lager, que ocorrem de 8 a 15°C.

Todas as linhagens passaram por análise de cariotipagem anteriormente ao seu armazenamento e registro no banco de microrganismos da Fermentec, garantindo registro sobre a distinção genética entre elas. O perfil da cariotipagem das linhagens está apresentado nas Figuras 4 e 5, a fim de mostrar a variabilidade das linhagens.

As análises de cariotipagem revelaram que as leveduras depositadas no Banco de Microrganismos da Fermentec apresentaram perfis cromossômicos uniformes, típicos de leveduras do gênero *Saccharomyces*, com poucos rearranjos cromossômicos. Nos plaqueamentos, cariotipagem e análises ao microscópio óptico não foram observados indícios de contaminação por outras leveduras *Saccharomyces* ou *não-Saccharomyces*.

As quatro leveduras apresentaram perfis cromossômicos semelhantes, não sendo possível distingui-las por esta análise.

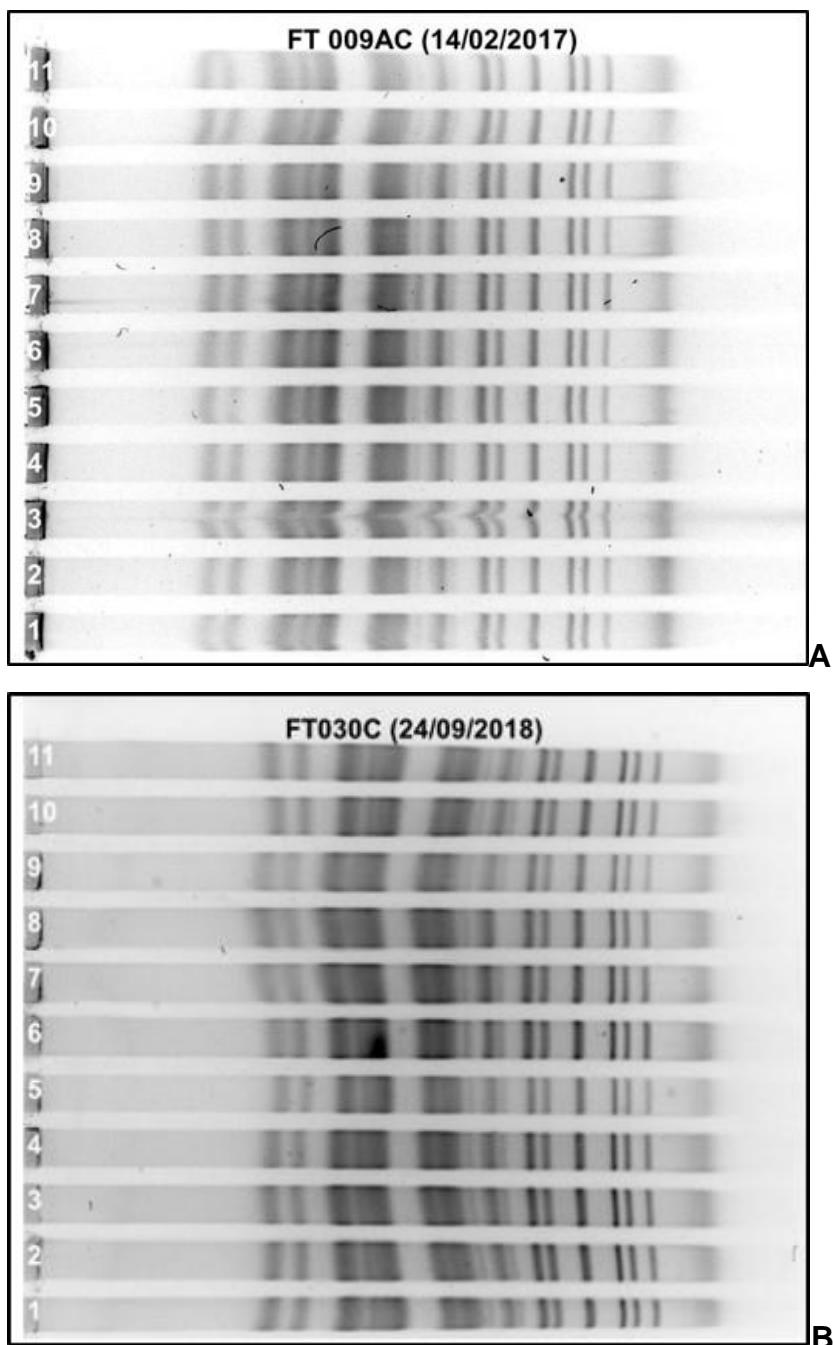


Figura 4. Cariotipagem das linhagens (A) FT009C e (B) FT030C da levedura *Saccharomyces sp.* selecionadas e armazenadas no Banco de Microrganismos da Fermentec

Fonte: Fermentec Tecnologia em Açúcar e Álcool Ltda.

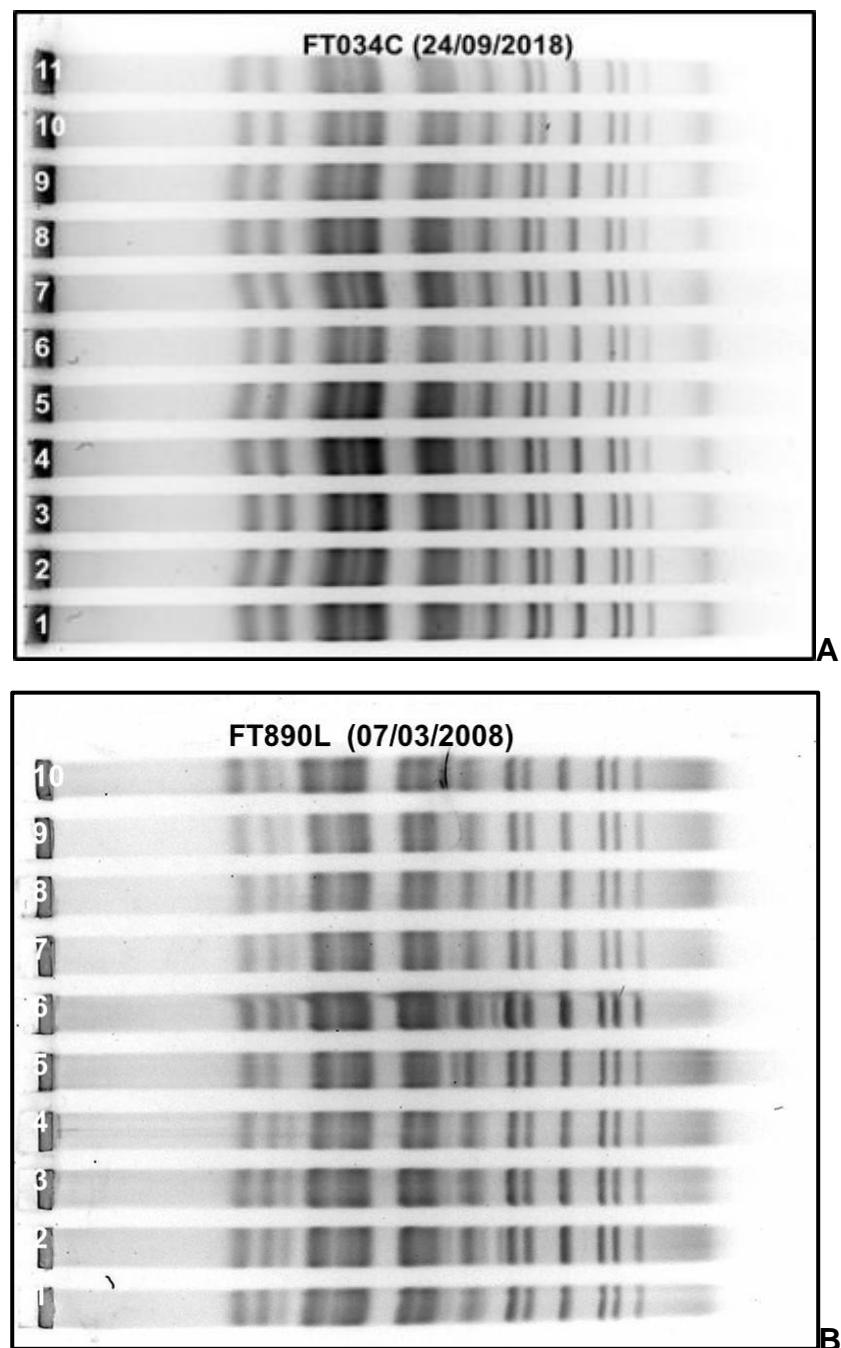


Figura 5. Cariotipagem das linhagens (A) FT034C e (B) FT890L da levedura *Saccharomyces sp.* selecionadas e armazenadas no Banco de Microrganismos da Fermentec

Fonte: Fermentec Tecnologia em Açúcar e Álcool Ltda.

5.2 Estudos de velocidade fermentativa e atenuação aparente do mosto

A fermentação pode ser acompanhada pelas curvas de atenuação aparente do mosto, que ocorreu como esperado, apresentando decréscimo do teor de sólidos solúveis para todos os tratamentos. Porém, é possível notar que as linhagens de leveduras FT009C, FT030C, FT034C e FT890L, quando cultivadas em mosto cervejeiro (12°Brix) a 12°C, apresentaram diferenças significativas no desempenho do consumo dos açúcares em função do tempo, conforme apresentado na Figura 6 e na Tabela 2, com a análise de variância dos dados tratados estatisticamente.

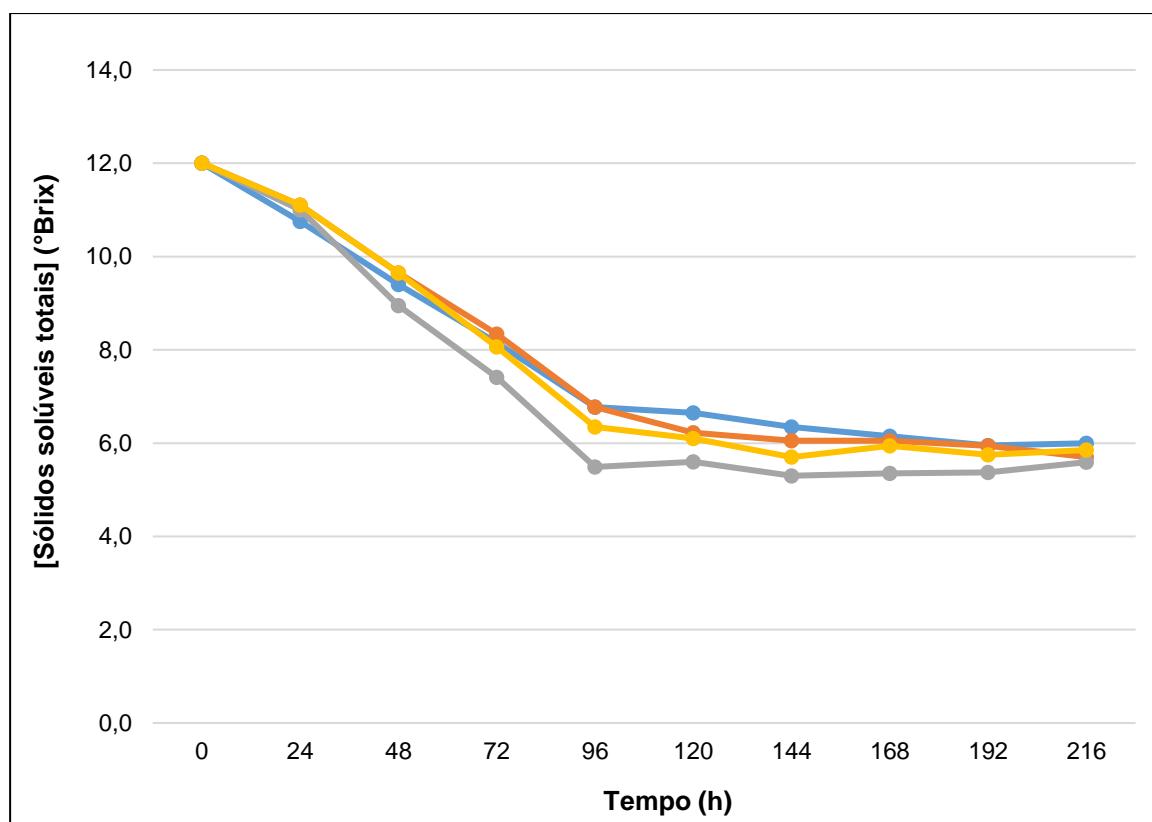


Figura 6. Fermentação de mosto cervejeiro (12°Brix) pelas linhagens de *Saccharomyces sp.*: FT009C (azul), FT030C (laranja), FT034C (cinza) e FT890L (amarelo) a 12°C.

Tabela 2. Análise estatística de variância (Anova) dos dados de atenuação aparente do mosto cervejeiro (12° Brix) em fermentação alcoólica pelas linhagens de *Saccharomyces sp.* FT009C, FT030C, FT034C e FT890L: fator duplo sem repetição

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
FT009C	10	78,17	7,817	4,76589
FT030C	10	77,82	7,782	5,532529
FT034C	10	72,06	7,206	6,560427
FT890L	10	76,5	7,65	5,851356
	12	48	12	0
	4	43,95	10,9875	0,027292
	4	37,65	9,4125	0,108958
	4	31,96	7,99	0,163133
	4	25,38	6,345	0,3641
	4	24,57	6,1425	0,186558
	4	23,4	5,85	0,205
	4	23,49	5,8725	0,128692
	4	23,01	5,7525	0,073492
	4	23,14	5,785	0,0319
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Leveduras	2,371928	3	0,790643	14,27489
Tempo (h)	202,8964	9	22,54404	407,0281
Erro	1,495447	27	0,055387	
Total	206,7637	39		
			<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>

A distinção na atenuação aparente dos açúcares do mosto cervejeiro reflete diferenças no rendimento fermentativo, pois são carboidratos que ao invés de serem fermentados, permaneceram no meio ou foram desviados para a formação de outros compostos (podendo ser desejáveis ou indesejáveis para o produto final), causando redução da velocidade da fermentação (CEREDA, 1983).

Quanto a atenuação aparente máxima atingida, ou seja, o valor de densidade final mais baixo que o tratamento apresentou, o destaque se dá para a levedura FT034C, que obteve a atenuação aparente mais completa ($5,5^{\circ}$ Brix) quando em comparação com a FT009C (6° Brix), a FT030C ($5,7^{\circ}$ Brix) e a FT890L ($5,7^{\circ}$ Brix).

Pode-se notar também que a velocidade fermentativa da FT034C foi superior as outras leveduras, pois finalizou a fermentação em 96 horas, enquanto a FT890L seguiu até 144 horas, a FT009C até 192 horas e a FT030C até 216 horas de fermentação. Tal afirmação se baseia na definição de que a fermentação está

concluída no momento em que ocorre estabilização ou ascensão na leitura do valor de sólidos solúveis (HUGHES, 2013).

O grau de atenuação aparente final desejado depende das características desejadas para a cerveja a ser produzida, além do gosto pessoal do mestre cervejeiro. Apesar da variação entre diversos estilos, segundo o guia BJCP (2015), os resultados para a densidade final atingidos pelas leveduras analisadas se encontram dentro da faixa para cervejas Lager.

O desempenho fermentativo apresentado pela FT034C pode estar relacionado a uma condição fisiológica superior com relação a vitalidade e viabilidade das células (WALKER, 2012), além da sua capacidade em fermentar a maltotriose, que é o fator primário na atenuação como discutido por White e Zainasheff (2010) e o segundo açúcar mais comum no mosto cervejeiro (MEIER-DÖRNBERG et al., 2017).

Além da comparação com as outras 3 leveduras estudadas nesta pesquisa, o resultado alcançado pela FT034C também pode ser ressaltado quando em comparação com os dados encontrados na literatura para produção de cerveja Lager, que relatam no mínimo 7 dias para atenuação aparente completa do mosto, como em Palmer (2006).

Estes resultados indicam uma possível vantagem do uso da levedura FT034C para a produção de cerveja Lager pois, economicamente, é do interesse das cervejarias que a fermentação termine no menor tempo possível, desde que alcançado os padrões de qualidade estabelecidos (FONSECA, 2016).

Como estudado por Kunze (2004), a produção de cervejas Lager necessita de mais tempo ocupando os tanques fermentadores, devido a temperatura baixa, que condiciona um metabolismo mais lento por parte das leveduras, se comparado com as ales. Isso prolonga o período de fermentação, e a etapa de maturação, responsável pela remoção dos subprodutos fermentativos como o diacetil.

Assim, a produção de cervejas Lager pode ser um problema quanto a rotatividade dos produtos, impactando no giro de capital e fluxo de caixa da cervejaria (FONSECA, 2016).

Por outro lado, como salienta White e Zainasheff (2010), a velocidade não se correlaciona necessariamente com a qualidade, sendo indicado fazer o acompanhamento das condições de fermentação antes da liberação do lote, garantindo padrões sensoriais satisfatórios.

A super atenuação do mosto, por exemplo, pode ser um indicativo de contaminação por outros microrganismos, causando na cerveja alterações sensoriais de sabor, aroma e corpo, além de teor alcoólico alto (MICHEL et al., 2016), situação não ocorrida neste trabalho.

5.3 População viável

A quantificação da população viável das linhagens de levedura FT009C, FT030C, FT034C e FT890L ao longo da fermentação está apresentada na Figura 7, com diferenças estatisticamente significativas entre as leveduras, como apresentado na Tabela 3.

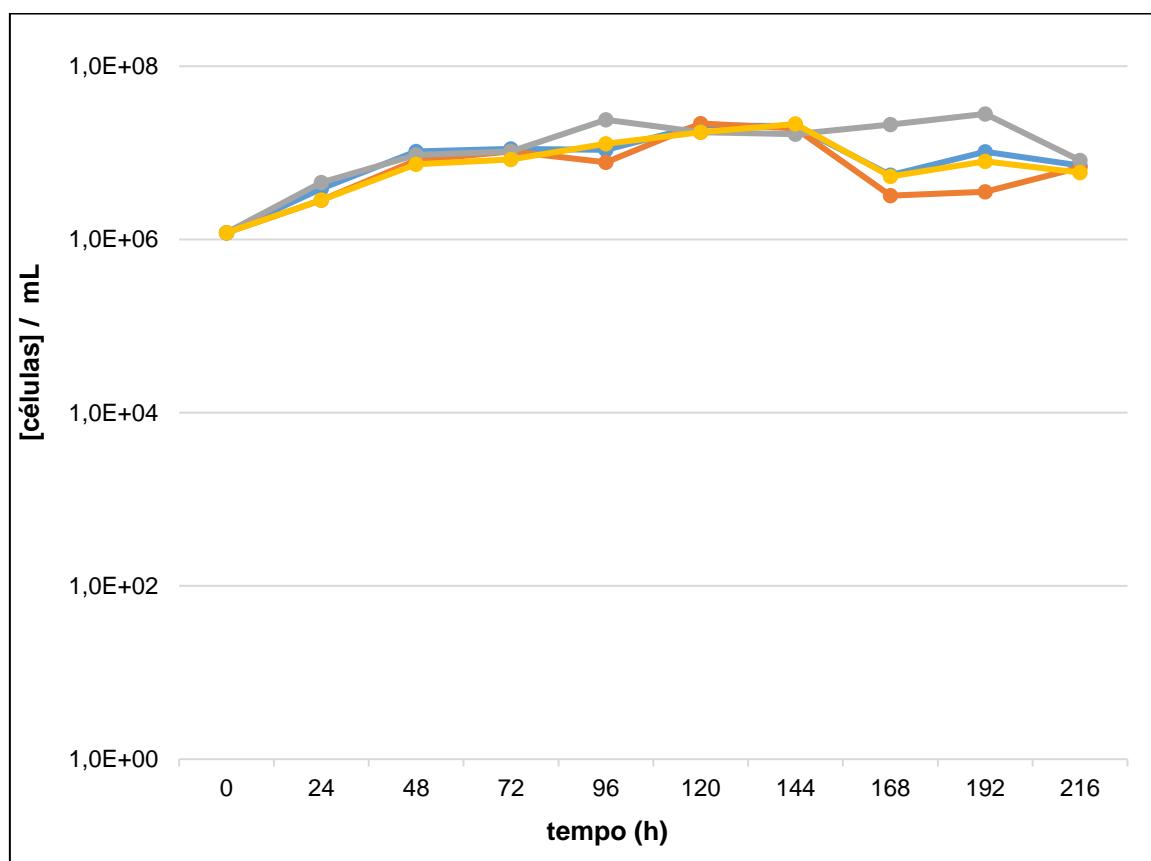


Figura 7. Crescimento populacional de células viáveis das linhagens de *Saccharomyces sp.*: FT009C (azul), FT030C (laranja), FT034C (cinza) e FT890L (amarelo) durante fermentação alcoólica de mosto cervejeiro (12ºBrix) a 12°C

Tabela 3. Análise estatística de variância (Anova) dos dados de contagem da população viável das linhagens de *Saccharomyces sp.* FT009C, FT030C, FT034C e FT890L: fator duplo sem repetição

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
FT009C	10	68,830	6,883	0,1320
FT030C	10	67,733	6,773	0,1535
FT034C	10	70,176	7,018	0,1707
FT890L	10	68,170	6,817	0,1350
0	4	24,316	6,079	0
24	4	26,104	6,526	0,01194
48	4	27,707	6,927	0,00598
72	4	27,930	6,982	0,00281
96	4	28,3295	7,082	0,04686
120	4	29,141	7,285	0,001787
144	4	29,043	7,261	0,00349
168	4	27,178	6,795	0,1347
192	4	27,878	6,970	0,1437
216	4	27,279	6,820	0,00563

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Leveduras	0,340969	3	0,113656	4,205574	0,014526	2,960351
Tempo (h)	4,591942	9	0,510216	18,87929	1,84E-09	2,250131
Erro	0,729679	27	0,027025			
Total	5,66259	39				

Apesar de todas as leveduras apresentarem valores próximos de crescimento, nas primeiras 72 horas, a levedura FT034C se destacou das demais quando a fermentação atingiu 96 horas, apontando sua maior contagem de células viáveis. Este período coincide com a máxima atenuação aparente do mosto tratado a levedura FT034C, o que indica uma correlação entre os dois fatores, se mostrando coerente com variados relatos na literatura (AMORIM, 2005; CEREDA; 1983; VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001).

O etanol produzido durante a fermentação pode reduzir a multiplicação e viabilidade da levedura (FURLAN, 2016), o que explica o declínio da contagem a partir de certo estágio do experimento. Neste caso, as leveduras FT009C, FT030C e FT890L mantiveram crescimento até 144 horas de fermentação, enquanto a FT034C estendeu até 192h. A maior variância entre as leveduras foi observada com 168 e 192 horas de fermentação, sendo que a FT034C foi a que manteve maior população viável.

Apesar das diferenças, a taxa de crescimento das células de todas as leveduras se mostraram adequadamente semelhantes aos resultados encontrados na literatura sobre o perfil cinético de crescimento de *Saccharomyces sp.* em mosto cervejeiro com inoculação bem-sucedida, ou seja, quantidade de células suficientes de acordo com as propriedades do mosto (WHITE; ZAINASHEFF, 2010), revelando a capacidade de todas as leveduras analisadas se multiplicarem durante fermentações alcoólicas conduzidas a 12ºC.

Como estudado por Salari e Salari (2017), o pH do mosto é um dos fatores responsáveis por garantir condições ótimas para o crescimento das leveduras, podendo, então, ser correlacionado com a contagem de população viável. Segundo os autores, quanto mais alto o pH, mais inibida será a multiplicação das células.

Células de *Saccharomyces sp.* apresentam crescimento satisfatório em pH entre 4 e 5 (WHITE; ZAINASHEFF, 2010; STEWART, 2000), estando em conformidade com os resultados obtidos nesta pesquisa, como descrito a seguir.

5.4 Valores de pH

Com relação ao pH, não se observou diferenças significativas entre as linhagens de *Saccharomyces sp.* ao final do experimento, como apresentado na Tabela 4; o pH variou de 4,5 a 4,6, como apresentado na Figura 8.

Influenciado pelo pH do mosto, pela produção de ácidos orgânicos liberados pela levedura e pelo consumo dos peptídeos presentes no mosto durante a fermentação alcoólica (poder tampão), o pH da cerveja situa-se, normalmente, numa faixa de 3,8 a 4,6 (BAMFORTH, 2009).

Desta forma, foi demonstrado que todas as leveduras analisadas promoveram a redução do pH inicial (5,6) apropriadamente ao longo da fermentação, garantindo habilidades para produzir uma bebida que se encaixa nas diretrizes de classificação de uma cerveja.

Embora tenham ocorrido diferenças quanto a atenuação aparente do mosto, os resultados de pH indicam que as leveduras FT009C, FT030C, FT034C e FT890L apresentam perfis semelhantes na produção de ácidos.

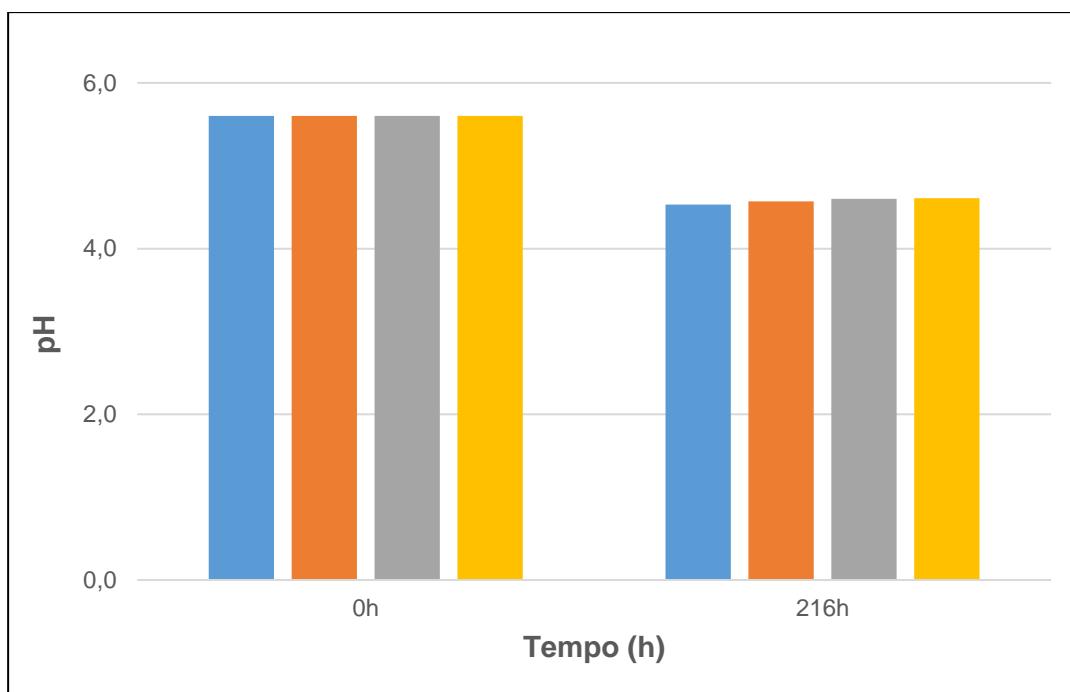


Figura 8. Valores de pH no início e final da fermentação alcoólica de mosto cervejeiro (12ºBrix) pelas linhagens de *Saccharomyces* sp.: FT009C (azul), FT030C (laranja), FT034C (cinza) e FT890L (amarelo), a 12°C

Tabela 4. Análise estatística de variância (Anova) dos valores de pH no início e final da fermentação alcoólica de mosto cervejeiro (12ºBrix) pelas linhagens de *Saccharomyces* sp. FT009C, FT030C, FT034C e FT890L: fator duplo sem repetição.

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
FT030C	3	14,79	4,93	0,3373
FT034C	3	14,81	4,936667	0,330033
FT890L	3	14,88	4,96	0,3081
5,6	3	16,8	5,6	1,18E-30
4,56	3	13,9	4,633333	0,001033
4,53	3	13,78	4,593333	0,000433

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Leveduras	0,001489	2	0,000744	2,061538	0,242482	6,944272
Tempo (h)	1,949422	2	0,974711	2699,2	5,48E-07	6,944272
Erro	0,001444	4	0,000361			
Total	1,952356	8				

5.5 Teor Alcoólico

O teor alcoólico obtido pelas linhagens FT009C, FT030C, FT034C e FT890L em fermentação com mosto cervejeiro a 12°Brix está apresentado na Figura 9. Nota-se que os valores observados, variando entre 3,1 e 3,6% por volume, estão de acordo com o esperado para uma cerveja *American Light Lager*, que varia de 2,8% a 4,2% por volume (BJCP, 2015), não apresentando valores significantemente distintos entre os tratamentos, como apresentado na Tabela 5.

A FT034C apresentou o maior valor para teor alcoólico, condizendo com os resultados de atenuação aparente máxima alcançada, sendo estes dois atributos inversamente proporcionais.

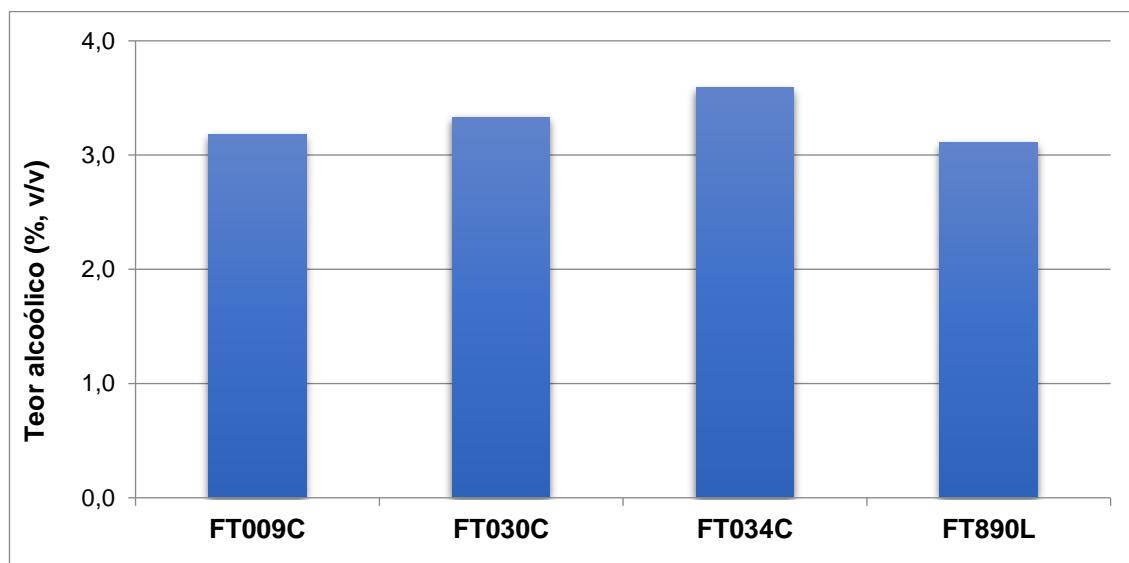


Figura 9. Produção de etanol após 216 horas de fermentação de mosto cervejeiro (12°Brix) pelas linhagens de *Saccharomyces* sp.: FT009C, FT030C, FT034C e FT890L a 12°C

Tabela 5. Análise estatística de variância (Anova) dos valores de teor alcoólico (%), v/v após 216 horas de fermentação de mosto cervejeiro (12ºBrix) pelas linhagens de *Saccharomyces sp.* FT009C, FT030C, FT034C e FT890L: fator duplo sem repetição.

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
FT030C	2	3,33	1,665	5,54445
FT034C	2	3,59	1,795	6,44405
FT890L	2	3,11	1,555	4,83605
	0	0	0	0
	3,18	10,03	3,343333	0,057733

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Leveduras	0,057733	2	0,028867	1	0,5	19
Tempo (h)	16,76682	1	16,76682	580,8366	0,001717	18,51282
Erro	0,057733	2	0,028867			
Total	16,88228	5				

6 CONCLUSÕES

As linhagens de *Saccharomyces sp.* FT009C, FT030C, FT034C e FT890L apresentam desempenho fermentativo satisfatório visando a produção de cerveja Lager, para as características de atenuação aparente do mosto, população viável, pH e teor alcoólico.

Apesar das características de todas as linhagens configurarem potencial para utilização como leveduras cervejeiras, estas diferem entre si quanto a velocidade de atenuação aparente do mosto e a população de células viáveis, mas são semelhantes quanto ao teor alcoólico e pH da cerveja.

A FT034C proporciona atenuação aparente mais rápida e completa do mosto, além de uma maior população viável ao longo da fermentação, fatores que afetam a otimização do processo de produção e a qualidade da bebida.

Logo, conclui-se que o uso da FT034C na produção de cerveja Lager reduz o tempo de fermentação da cerveja sem afetar outras características da bebida, como o pH e o teor alcoólico, atuando como fator vantajoso para a liberação antecipada dos tanques de fermentação e consequente giro de capital na cervejaria.

REFERÊNCIAS

- ABRABE. **Associação Brasileira de Bebidas**. Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br/>>. Acesso em: 20 abr. 2018.
- ALWORTH, J. **The Beer Bible: The Essential Beer Lover's Guide**. Workman Publishing. p. 234. 2015.
- AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica: Ciência & tecnologia**, 1st edn. Fermentec, Piracicaba. 2005
- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. (1982). **Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia: Séries Manuais Técnicos e Científicos. São Paulo. 58 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists Gaithersburg: A.O.A.C.**, 2005, Revision 1, 2006, chapter 26. P. 4-5.
- BAMFORTH, C.W. **Beer: tap into the art and science of brewing**. Oxford: Oxford University Press, 2009.
- BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM – BJCP (Estados Unidos). **2015 BEER STYLE GUIDELINES**: Beer Style Guidelines. 2015. Disponível em: <https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2018.
- BERGMAN, L.W. Growth and maintenance of yeast. In: MACDONALD, P.N. (eds) **Two Hybrid Systems. Methods in Molecular Biology**, v. 177, p. 9-14. Humana Press. DOI: 10.1385/1-59259-210-4:009. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, 2009.
- CARVALHO, G.B.M.; BENTO, C.V.; ALMEIDA SILVA, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1^a parte – As Leveduras. **Revista Analytica**, Lorena, v. 25, n. 25, p. 36-42, nov. 2006.
- CEREDA, M.P. Cervejas. In: AQUARONE et al. **Biotecnologia alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgar Blucher, 1983. Cap. 3, p. 46.
- CERVBRASIL – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA (2016). **Anuário 2015**. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf Acesso em: 17.04.2018
- CHERUBIN, R.A. **Efeito da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 137 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- COSTA, L.M.R. **Produção de cerveja artesanal pela fermentação de uma levedura da jabuticaba: análise da cinética local de metabólitos voláteis e dos efeitos das**

variáveis no processo. 2017. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

COUTINHO, C.A.T. **Cervisiafilia:** a história das antigas cervejarias. Disponível em: <<http://cervisiafilia.blogspot.com/p/pagina-inicial.html>>. Acesso em: 4 ago. 2018.

DUNN, B.; SHERLOCK, G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid Lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. **Genome Research**, [s.l.], v. 18, n. 10, p. 1610-1623, 7 ago. 2008. Cold Spring Harbor Laboratory.
<http://dx.doi.org/10.1101/gr.076075.108>.

EMBRAPA. **A cevada no Brasil.** Disponível em:

<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do139_4.htm>. Acesso em: 3 nov. 2018.

EUROMONITOR INTERNATIONAL (2016). **Beer in Brazil.** Disponível em:
<http://www.portal.euromonitor.com/portal/analysis/tab>. Acesso em: 17.04.2018.

FONSECA, P.G. **Produção de Lager em microcervejarias: Metodologias e otimização da fermentação e maturação.** 2016. 62 f. Monografia (Especialização em Tecnologia Cervejeira), Centro Universitário de Belo Horizonte, Belo Horizonte, 2016.

FURLAN, R.M.C. **Leveduras de processos de bioetanol: potencial para a produção de cerveja especial com mosto de alta densidade.** 2016. 128 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

FURTADO, C. **Formação econômica do Brasil.** 32. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2005. 238 p. Disponível em:
<http://www.foiceomartelo.com.br/posfsa/autores/Furtado,Celso/Formacao_Economica_do_Brasil.pdf>. Acesso em: 4 jul. 2018.

GALLONE, B. et al. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. **Cell**, [s.l.], v. 166, n. 6, p.1397-1410, set. 2016. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>.

GALLONE, B. et al. Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 49, p. 148-155, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005>.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.B.G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações.** 2^a ed. São Paulo: Nobel, 2008.

GREGORINI, G.S. (2006), **Estratégia competitiva no mercado de bebidas: Estudo de caso na Companhia de Bebidas das Américas**, Monografia de Graduação no Curso de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

HUGHES, G. **Home brew beer.** 2 ed. United Kingdom: DK ADULT, 2013. 224 p.

JACKSON, M. **The new world guide to beer.** 3 ed. United States: Running Press Book Publishers, 1988. 256 p.

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting.** 4. ed. Berlin: Vlb Berlin, 2004.

- LALLEMAND. **Pitching rate.** 2018. Disponível em:
<http://www.lallemandbrewing.com/brewers-corner/brewing-tools/pitching-rate-calculator/>
- LIBKIND, D. et al. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of Lager-brewing yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 108, n. 35, p.14539-14544, 22 ago. 2011. Proceedings of the National Academy of Sciences.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1105430108>.
- LODOLO, E.J.; CANTRELL, I.C. Yeast vitality—a holistic approach toward an integrated solution to predict yeast performance. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, [s.l.], v. 65, n. 4, p.202-207, set. 2007. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1094/asbcj-2007-0809-01>.
- MADEIRA, J.S. **Perfil do consumidor de cervejas especiais: uma contribuição para o estudo do consumo nas ciências sociais.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual de Campinas, 2015.
- MEIER-DÖRNBERG, T. et al. The Importance of a comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* strains for brewing. **Fermentation**, v. 3, n. 3, p. 2-25, ago. 2017. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/fermentation3030041>.
- MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O CONTROLE DA PRODUÇÃO DE AÇÚCAR E ÁLCOOL, 3^a edição, FERMENTEC, Piracicaba, 2003.
- MICHEL, M. et al. A new approach for detecting spoilage yeast in pure bottom-fermenting and pure *Torulaspora delbrueckii* pitching yeast, propagation yeast, and finished beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 74, n. 3, p. 200-205, ago 2016. <http://dx.doi.org/10.1094/ASBCJ-2016-3148-01>
- MORADO, R. **Larousse da Cerveja.** Larousse do Brasil.1ed São Paulo, 2009
- MURTEY, M.D.; RAMASAMY, P. Sample preparations for scanning electron microscopy – life sciences. In: Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences, edited by M. Janecek. InTech, 2016. DOI: [10.5772/61720](https://doi.org/10.5772/61720)
- OLIVEIRA, N.A.M. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja.** 2011. 45 f. Monografia (Especialização) - Curso de Microbiologia Ambiental e Industrial, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- PALMER, J.J. (2006). **How to brew.** EUA: Brewers Publications.
- SALARI, R.; SALARI, R. Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. **Electronic Physician**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.3592-3597, jan. 2017. Mehr Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.19082/3592>.
- SANTOS, S.P. **Os primórdios da cerveja no Brasil** – 2. Ed. – Cotia: Ateliê Editorial, 2004, c2003
- SARNIGHAUSEN, P.; SARNIGHAUSEN, V.C.R.; PAI, A. **O lúpulo e a oportunidade do agronegócio no Brasil.** Disponível

em:<<http://www.fatecbt.edu.br/ocs/index.php/VIJTC/VIJTC/paper/viewFile/1118/1547>>. Acesso em: 3 nov. 2018.

SEBRAE INTELIGÊNCIA SETORIAL. Cervejas artesanais (2015). Disponível em:<<https://www.sebraeinteligenciasetorial.com.br/produtos/relatorios-de-inteligencia/cervejas-artesanais/55c4ad3614d0c01d007ffeae>. Acesso em: 07 jun. 2017.

SEBRAE. Micro cervejarias. Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/\\$File/7503.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/$File/7503.pdf) Acesso em 12 jun. 17.

SIGUAW, J.A.; SIMPSON, P.M.; ENZ, C.A. **Conceptualizing innovation orientation: a framework for study and integration of innovation research.** Disponível em: <<https://scholarship.sha.cornell.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1855&context=articles>>. Acesso em: 26 out. 2018.

SILVA, J.B.A. Cerveja. In: VENTURINI, W. G. Filho. **Tecnologia de bebidas.** São Paulo: Edgar Blucher, 2005. Cap. 15 p. 353.

STEWART, G.G. A brewer's delight. **Chemistry and Industry**, v. 6, n. 11, p. 706-709, nov. 2000.

STEWART, G.G. (2010) High gravity brewing and distilling – Past experiences and future prospects. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 68, p. 1–9.

VAN OEVELEN, D. et al. Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. **Journal of the Institute of Brewing**. p. 356-360. dez. 1977. Disponível em: <file:///D:/Users/camila/Downloads/Oevelen_et_al-1977-Journal_of_the_Institute_of_Brewing.pdf>. Acesso em: 16 maio 2018.

VENTURINI FILHO, W.G.; CEREDA, M.P. Cerveja. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. **Biotecnologia Industrial- Biotecnologia na produção de alimentos**, v. 4, São Paulo: Edgard Blucher, 2001. Cap. 4, p. 91-144.

WALKER, G.; BROSNAN, J.; BRINGHURST, T.; JACK, F. (2012) Selecting new distilling yeasts for improved fermentation and for sustainability. In: WALKER, G.I.; GOODALL, I.; MURRAY, D.; FOTHERINGHAM, R. (Eds.) *Distilled spirits: science and sustainability*, p. 1–11, Nottingham University Press, Nottingham.

WALTHER, A.; HESSELBART, A.; WENDLAND, J. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture Lager yeast. **G3: Genes|genomes|genetics**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.783-793, 27 fev. 2014. Genetics Society of America. <http://dx.doi.org/10.1534/g3.113.010090>.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation.** 5 ed. United States: Brewers Publications, 2010. 304 p.

WYLER, P. **Influência da madeira de carvalho na qualidade da cerveja.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo.