

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

JORGE NICOLAS INOUE

**ESTUDO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE* ISOLADA DE POLPA DE FRUTA PARA PRODUÇÃO  
DE CERVEJA LAGER**

LONDRINA  
2021

JORGE NICOLAS INOUE

**ESTUDO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ISOLADA DE POLPA DE FRUTA  
PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA LAGER**

**Study of fermentative potential of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fruit  
Pulp for production of lager beer**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho

LONDRINA  
2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es).

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

ESTUDO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*  
ISOLADA DE POLPA DE FRUTA PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA LAGER

JORGE NICOLAS INOUE

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 13 de maio de 2021 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos e foi avaliado pelos seguintes professores:

**Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho**  
Prof.(a) Orientador(a)

**Profa. Dra. Lyssa Setsuko Sakanaka**  
Avaliador 1

**Prof. Dr. Claudio Takeo Ueno**  
Avaliador 2

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória.

Ao Paulo Vinicius Barbeta, pelos ensinamentos, coorientação na elaboração da bebida.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lyssa Setsuko Sakanaka e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mayka Reghiany Pedrão, pelo auxílio prestado no desenvolvimento do trabalho.

À UTFPR, pelo auxílio financeiro concedido para a realização da parte experimental deste trabalho.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento à minha família, pois acredito que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

Na fabricação de cerveja, o tempo de fermentação é um fator considerado importante para as cervejarias, principalmente na capacidade de produção em volume da bebida e os custos envolvidos. Na produção de cervejas de fermentação lager, a fermentação dura cerca de 10 dias, o que causa um ponto de estrangulamento no volume da produção e limita a capacidade de fermentadores disponíveis. Com o intuito de otimizar o tempo de produção deste tipo de cerveja e reduzir os custos deste produto, estudou-se o comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PF2<sub>3</sub> isolada de polpa de goiaba no processo fermentativo. A cultura em estudo foi padronizada ( $6,0 \times 10^9$  UFC/mL) de acordo com as especificações recomendadas para uma cultura comercial (*S. cerevisiae* US-05), utilizada como controle. O mosto, previamente preparado com água, malte pilsen e lúpulo, foi separado em quatro fermentadores, sendo dois inoculados com *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> e dois com a cultura comercial. Os fermentadores foram mantidos a 12°C / 10 dias em condição estática. Os teores de álcool, açúcares totais, pH e acidez titulável foram determinados nos tempos inicial, 2, 4, 6, 8 e 10 dias. No final do processo fermentativo o consumo de açúcares totais pela *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> e pela cultura comercial foi de 15,41 mg/mL e 17,67 mg/mL, respectivamente, enquanto que o teor de álcool produzido foi de 3,6% para ambas culturas. Entretanto, a porcentagem de álcool produzida pela *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> no oitavo dia (3,4%) foi maior que a produzida pela cultura comercial (2,9%) ( $p < 0,05$ ), sendo portanto, mais vantajoso para a indústria cervejeira em termos de economia no tempo de produção. O pH e acidez titulável não diferiu estatisticamente entre as bebidas fermentadas pelas duas culturas. *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> tem potencial tecnológico de aplicação em processo fermentativo de mosto para elaboração de cerveja.

**Palavras-chave:** Bebida alcoólica. Levedura. Fermentação. Cervejaria.

## ABSTRACT

In the brewing of beer, the fermentation time is an important factor for the producer, involved principally with the production volume capacity and the costs. During the production of lager fermentation beer, the fermentation is 10 days long, resulting in a bottleneck on the produced volume, as well as limiting the capacity of available fermenters. Aiming at optimizing the production time of such type of beer and reducing the production costs, the behavior of the *Saccharomyces cerevisiae* PF23 yeast isolated from guava pulp subjected to fermentation was studied. The studied culture was standardized ( $6.0 \times 10^9$  cells/mL) following the recommendations for a commercial culture (*S. cerevisiae* US-05), which was used as the control. The wort, prepared with water, pilsen malt and hop, was splitted into four fermenters, being two of them inoculated with *S. cerevisiae* PF23, and the remaining ones with the commercial culture. The fermenters were subjected to the temperature of 12°C in static conditions during 10 days. The alcohol by volume, total sugars, pH and titratable acidity were measured at the initial time and after 2, 4, 6, 8 and 10 days. At the end of the fermentation, the sugar consumption by the *S. cerevisiae* PF23 and the commercial culture were equal to 15.41 mg/mL and 17.67 mg/mL, respectively, while the alcohol by volume produced by both the cultures was equal to 3.6%. Despite that, the alcohol by volume produced by the *S. cerevisiae* PF23 at the day 8 (3.4%) was higher than the one for the commercial culture (2.9%) ( $p < 0.05$ ), being more advantageous for commercial beer brewing in terms of savings on the production time. The pH and titratable acidity do not present statistical differences between the beverages fermented with both the cultures. The *S. cerevisiae* PF23 has potential of technological application on the wort fermentation for beer brewing.

**Keywords:** Alcoholic beverage. Yeast. Fermentation. Brewery.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atuação enzimática e suas respectivas condições de temperatura.....	15
Tabela 2 - Análises físico-químicas das cervejas tipo “lager” produzidas com <i>S. cerevisiae</i> PF23 e <i>S. cerevisiae</i> comercial US-05. ....	24

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de processamento da cerveja. ....	19
Figura 2 - Rampa de mosturação para o processo de produção de cerveja.....	20
Figura 3 - Unidades Formadoras de Colônias.....	23
Figura 4 - Aspecto morfológico das colônias em meio BDA.....	24
Figura 5 - Relação entre o consumo de açúcares totais e a produção de álcool pelas culturas.....	26

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
3.1 MATÉRIA-PRIMA.....	13
3.2 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA .....	14
3.2.1 MOAGEM DO MALTE.....	14
3.2.2 MOSTURAÇÃO.....	15
3.2.3 FILTRAÇÃO .....	156
3.2.4 FERVURA .....	16
3.2.5 TRATAMENTO DO MOSTO .....	16
3.2.6 FERMENTAÇÃO.....	16
<b>4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	<b>18</b>
4.1 MATERIAL EM ESTUDO .....	18
4.2 MÉTODOS .....	18
4.2.1 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO.....	18
4.2.2 ELABORAÇÃO DAS CERVEJAS .....	19
4.2.4 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA .....	19
4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	21
4.3.1 pH.....	21
4.3.2 ÁCIDEZ TOTAL TITULÁVEL.....	21
4.3.3 TEOR DE ÁLCOOL.....	22
4.4 ANÁLISE DE AÇÚCARES TOTAIS .....	22
4.5 TRATAMENTO DE DADOS.....	22
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das primeiras bebidas alcoólicas desenvolvidas pelos egípcios e mesopotâmios no ano 6000 a.C. Devido a matéria prima ser constituída de grãos de cereais e leveduras, a produção de cerveja era feita por padeiros. Os egípcios produziam uma cerveja rústica com o nome de Bouza, em que a cevada era germinada e assada para ser adicionada em jarra com água para fermentar. A bebida chegou no Brasil no início do século XIX, por D. João VI, e era importada de países europeus. Em 1888, no Rio de Janeiro, foi inaugurada a primeira cervejaria no país com o nome de “Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia.” (DRAGONE; SILVA, 2010), e desde então, o consumo da bebida e de cervejarias só vem aumentando. Em 2019 o país totalizou 1209 cervejarias distribuídas nos 26 estados, o que representou um aumento de 36,4% quando comparado aos 5 anos anteriores (MAPA, 2020).

Segundo o decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, a cerveja é definida como “a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, oriundo do malte de cevada e água potável, por ação de levedura, com adição de lúpulo” (BRASIL, 2009).

Os cereais maltados são ricos em carboidratos, proteínas, polipeptídeos e minerais, que são fontes necessárias para a levedura realizar o processo fermentativo. O lúpulo possui variedades de  $\beta$ -ácido que proporcionam o amargor e óleos essenciais que dão aroma e enfatizam o sabor. Em relação ao fermento (levedura), a variedade da cultura e a temperatura de fermentação são responsáveis pela produção de diferentes tipos de cerveja, tais como tipo ale e tipo lager, quando produzidas em alta e baixa temperatura, respectivamente (VARNAM; SUTHERLAND, 1997).

As leveduras têm o trabalho essencial para caracterizar a cerveja com sabor, aroma e teor de álcool, sendo *Saccharomyces cerevisiae* a principal cultura utilizada para produção de cervejas tipo “lager” (DRAGONE; SILVA, 2010). Em estudo realizado por Calegari et al. (2018), *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> apresentou resultados satisfatórios em relação a produção de etanol a partir do cultivo em caldo de cana sob condições de agitação a 30°C, com um percentual alcoólico de 9,93.

Entretanto, o tempo de fermentação é um fator considerado importante para as cervejarias, principalmente na capacidade de produção em volume da bebida e os custos envolvidos. Na produção de cervejas de fermentação lager, por exemplo, a fermentação dura cerca de 10 dias, o que causa um ponto de estrangulamento no volume da produção e limita a capacidade de fermentadores disponíveis.

Com o intuito de otimizar o tempo de produção deste tipo de cerveja e reduzir os custos deste produto, estudou-se o comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PF2<sub>3</sub> isolada de polpa de fruta no processo fermentativo.

## 2 OBJETIVOS

Estudar o potencial fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* PF2<sub>3</sub> para produção de cerveja lager.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* PF2<sub>3</sub> conforme a utilização da linhagem comercial e aplicar no mosto para fermentação;
- Analisar o tempo de fermentação no mosto necessário para atingir a estabilização alcoólica;
- Monitorar o processo fermentativo por meio de análises físico-químicas.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 MATÉRIA-PRIMA

A cerveja é constituída aproximadamente de 91 a 98% de água no produto final, sendo considerada portanto, o principal ingrediente. Tal fato leva as indústrias cervejeiras a se instalarem em regiões onde a composição da água seja de ótima qualidade para a fabricação do produto (RUSSEL; STEWART, 1995). Entretanto, quando o abastecimento de água da região que a indústria cervejeira está localizada não é adequada, a água pode ser tratada para atingir o padrão de qualidade para a fabricação da bebida (VARNAM; SUTHERLAND, 1997).

A água disponível na natureza é encontrada com diversas concentrações de sais minerais, matérias orgânicas e gases, e dependendo da concentração destes compostos pode haver interferência no gosto e odor da bebida. Estes compostos influenciam na qualidade da cerveja alterando seus processos químicos e enzimáticos que ocorrem na mosturação e na fermentação. Para considerar a água de boa qualidade e potável, deve estar transparente, não possuir odor, apresentar alcalinidade abaixo de 50mg/L e possuir em média 50mg/L de concentração de cálcio (ALMEIDA; SILVA, 2005).

O malte é obtido a partir da germinação das sementes de diferentes cereais, em condições monitoradas. Para que ocorra a malteação o cereal é umedecido e germinado para produzir enzimas, que auxiliam nas conversões de amido para açúcares no mosto cervejeiro (VENTURINI FILHO, 2000). O malte também é submetido a um processo de secagem e tostagem, que influencia na diferenciação de cada malte, resultando na produção de diferentes cervejas (SENAI, 1997). O malte Pilsen utilizado para fabricação de cervejas deve apresentar 35,1g em 100 grãos, entre 4 e 5% de umidade, pH entre 5,5 e 6,0, cor após fervura em torno de 6,0 a 7,5 EBC (European Brewery Convention) e deve possuir casca, que auxiliará na filtração do mosto (HARDWICK, 1995; VENTURINI FILHO, 1993).

O lúpulo apresenta compostos que dão aroma e sabor para a cerveja (VERHAGEN, 1999). É uma planta dióica que apresenta sexo masculino e feminino, tal que para a fabricação da cerveja são utilizadas a planta de sexo feminino, que apresenta a lupulina, responsável pelos compostos que conferem o aroma e o sabor

(AQUARONE et al., 2001). Neste contexto, os óleos essenciais conferem o aroma, enquanto que  $\beta$ -ácidos (*lupulonas*) e  $\alpha$ -ácidos (*humulonas*) são responsáveis pelo sabor (NOONAN, 1996).

As leveduras têm o trabalho essencial para caracterizar a cerveja com sabor, aroma e teor de álcool. O álcool produzido é o principal produto da fermentação, mas são produzidas outras substâncias que conferem o sabor e o aroma característico da bebida. O balanço metabólico do cultivo da levedura, o pH de fermentação, a temperatura e a concentração de mosto influenciam no produto final dos metabólitos formados. O gênero comumente utilizado e mais seguro para produção de etanol e dióxido de carbono na cerveja é a *Saccharomyces*. Para a produção das cervejas tipo “ale” são empregadas culturas de *Saccharomyces uvarum* no processo fermentativo, enquanto que para as cervejas tipo “lager”, *Saccharomyces cerevisiae* é a principal cultura utilizada (DRAGONE; SILVA. 2010).

*Saccharomyces* sp. são capazes de consumir açúcares como a sacarose, glucose, frutose, galactose, manose, maltose e maltotriose por meio do processo fermentativo, cujo produto final é o etanol. O etanol é produzido a partir da descarboxilação do piruvato em acetaldeído, seguido de redução a etanol por meio de reoxidação simultânea de nicotinamida adenina dinucleotídeo (VARNAM; SUTHERLAND, 1997).

### 3.2 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA

A produção de cerveja é dividida em sete etapas, com o objetivo de processar as matérias-primas, obter o mosto cervejeiro e ser fermentado.

#### 3.2.1 MOAGEM DO MALTE

A moagem do malte transforma o grão em uma farinha com granulometria muito fina. Neste processo ocorre o corte da casca do grão deixando exposto o endosperma amiláceo, que facilita a ação enzimática durante a mosturação. As cascas que ficam separadas do endosperma auxiliam como camada filtrante no

processo de filtração do mosto (ALMEIDA; SILVA, 2005). Este processo pode ser realizado em moinhos de rolos, discos ou martelos (VENTURINI FILHO, 2000).

### 3.2.2 MOSTURAÇÃO

Na mosturação ocorre a mistura do malte moído com água em temperaturas controladas e agitação. As enzimas presentes no malte auxiliam na solubilização do malte e suas substâncias solúveis e insolúveis, ocasionando a hidrólise dos açúcares e amido. O processo enzimático depende da temperatura, do tempo, pH e qualidade do malte (DRAGONE; SILVA, 2010). As amilases convertem o amido em açúcares, as proteases produzem peptídeos e aminoácidos pela digestão das proteínas e as fosfatases liberam íon fosfato orgânico para o mosto, ocasionando um caldo rico em açúcares para a produção de álcool na fermentação (AQUARONE et al., 2001). Na Tabela 1 estão apresentadas as atuações das enzimas em suas respectivas temperaturas.

**Tabela 1 - Atuação enzimática e suas respectivas condições de temperatura**

<b>Enzimas</b>	<b>Atuação</b>	<b>Temperatura °C</b>
Hemicelulase	Decomposição da hemicelulose para glucanos	40 a 45
Exo-Peptidade	Decomposição das proteínas de alta e média massa molar	40 a 50
Endo-Peptidade	Decomposição das proteínas para produtos intermediários de alta e média massa molar	50 a 60
Dextrinase	Desagregação do amido para maltose e maltotriose	55 a 60
$\beta$ - Amilase	Decomposição do amido para maltose	60 a 65
$\alpha$ - Amilase	Decomposição do amido para dextrinas	70 a 75

**Fonte: Tschope (2001)**

### 3.2.3 FILTRAÇÃO

A filtração ocorre com a passagem do mosto da tina de mosturação para a tina de filtração contendo bomba centrífuga e um disco filtrante. Neste processo o mosto é transferido e filtrado, onde a casca do malte atua como camada filtrante (DRAGONE; SILVA, 2010).

### 3.2.4 FERVURA

A fervura tem o objetivo de inativar as enzimas, coagular as proteínas, evaporar a água e adicionar o lúpulo para extrair compostos de sabor amargo e aromático. O mosto é mantido por 60 min em fervura para ocorrer a redução de 10% do volume inicial e, conseqüentemente, concentrar o açúcar no mosto (DRAGONE; SILVA, 2010).

### 3.2.5 TRATAMENTO DO MOSTO

No final da fervura o mosto deve ser submetido a um tratamento para separação de proteínas, resinas e taninos denominados de *trub*. É realizado por forças centrípetas através de rotação foçada no meio (*whirlpool*), separando o mosto límpido de uma massa sedimentada no fundo do tanque. Para cerveja lager o mosto é resfriado em trocador de calor em temperatura entre 7 e 15°C, para então ser adicionado ao fermentador (DRAGONE; SILVA, 2010).

### 3.2.6 FERMENTAÇÃO

A fermentação tem como o principal objetivo a conversão de açúcares em etanol e gás carbônico, realizado pela levedura em condições anaeróbicas. Também são produzidos compostos que dão aroma e sabor para cerveja, que variam com os padrões de culturas empregadas e seu metabolismo celular (ESSLINGER, 2009).

O processo fermentativo é realizado com a inoculação de concentrações iniciais de leveduras entre  $10^6$  a  $10^8$  UFC/mL (DRAGONE; SILVA, 2010). Na produção de cervejas tipo “lager” o processo ocorre em temperaturas variando de 8 a 12°C durante cinco a sete dias (REINOLD, 1997).

### 3.2.7 MATURAÇÃO

A maturação é considerada como a fermentação secundária, no qual o extrato fermentável residual da cerveja continua a ser metabolizado em temperatura de 0°C. Nesta etapa, as características de sabor são refinadas pela redução do teor de

diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico. Além disso, também ocorre a clarificação do líquido por meio da deposição do fermento, proteínas e sólidos insolúveis (DRAGONE; SILVA, 2010).

## 4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Quanto ao estudo a ser realizado, trata-se de uma pesquisa de caráter experimental, no qual serão obtidos dados quantitativos para serem analisados.

### 4.1 MATERIAL EM ESTUDO

*Saccharomyces cerevisiae* PF2<sub>3</sub>, isolada de polpa de goiaba congelada, foi fornecida pelo Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, a partir da coleção de culturas do laboratório de Microbiologia da UTFPR, Câmpus Londrina. Para a produção de cerveja, foram adquiridos o malte pilsen nascional, lúpulo cascade e o fermento comercial usado como controle.

O fermento comercial utilizado neste trabalho foi a cultura *Saccharomyces cerevisiae* US-05 (Fermentis, Lesaffre, França), cuja faixa de temperatura recomendada pelo fabricante para a produção de cerveja está situada entre 12 e 25°C.

### 4.2 MÉTODOS

A pesquisa foi realizada na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, nos Laboratórios de Bebidas e de Microbiologia.

#### 4.2.1 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Segundo a fabricante FERMENTIS, 1 g do fermento comercial (*S. cerevisiae* US-05) possui  $> 6 \times 10^9$  UFC/mL. A partir da solubilização de 1 g do fermento em 9 mL de água destilada estéril (diluição  $10^{-1}$ ), foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-8}$ , e um volume de 100  $\mu$ L de cada diluição foi plaqueado por superfície, em triplicada, em Agar Batata Dextrose (BDA), acidificado com ácido tartárico 10%. A contagem de UFC/g foi realizada após incubação a 25°C/48 horas. Neste sentido, o valor utilizado como referência para o inóculo inicial das culturas foi de aproximadamente  $6 \times 10^9$  UFC/mL.

Para a padronização do inóculo das levedura *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> e a *S. cerevisiae* US-05, uma alçada da cultura previamente cultivada em tubo de ensaio contendo BDA inclinado foi transferido para tubo contendo água destilada estéril, seguido de padronização da escala de MacFarland, até atingir turbidez equivalente a  $6 \times 10^9$  UFC/mL e adicionadas nos fermentadores contendo o mosto cervejeiro.

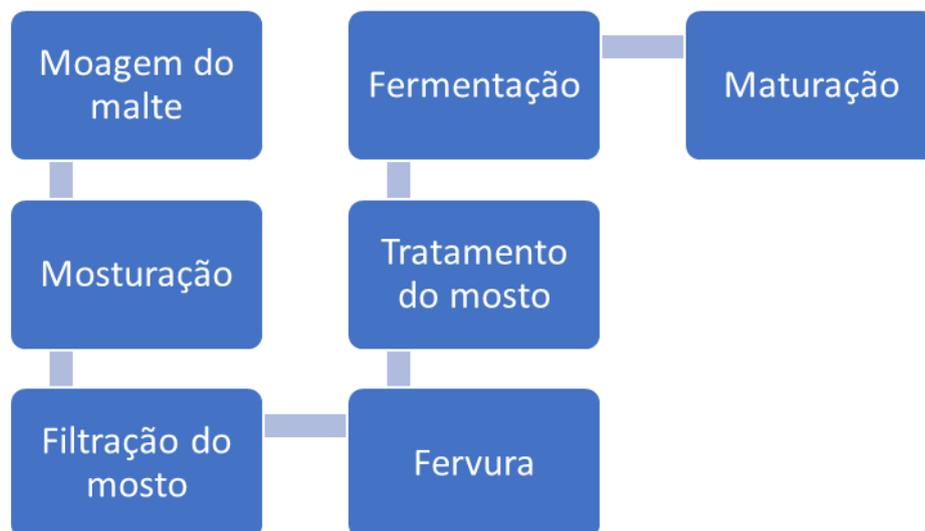
#### 4.2.2 ELABORAÇÃO DAS CERVEJAS

Para o preparo do mosto foram utilizados 45 litros de água, 8kg de malte pilsen e 50g de lúpulo cascade. O mosto obtido foi dividido em 4 fermentadores (contendo 10 litros cada), sendo dois fermentadores utilizados para a fermentação com a cultura *Saccharomyces cerevisiae* PF2<sub>3</sub> e dois utilizados para a fermentação com *S. cerevisiae* US-05.

#### 4.2.4 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA

O processo consistiu de sete etapas, conforme ilustrado na Figura (1).

**Figura 1 - Fluxograma de processamento da cerveja**

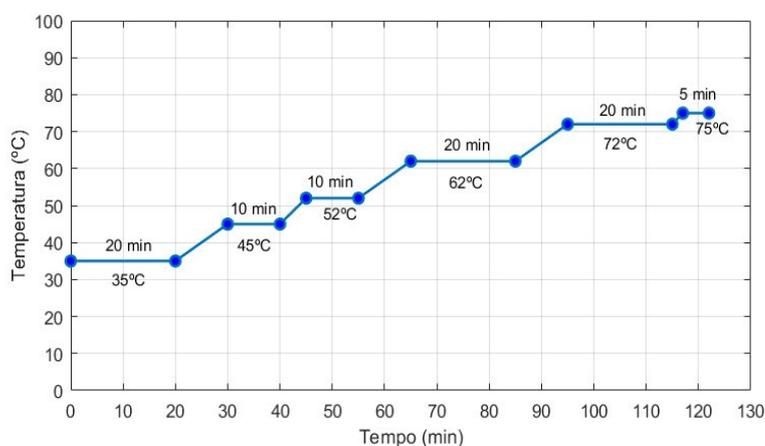


Fonte: Autoria própria.

Para o preparo da mosturação, os 8kg de malte pilsen foram moídos no moinho cervejeiro Hobby Dragon Bier e adicionados na tina de mosturação do sistema de

microcervejaria Dragon Bier contendo 45 litros de água aquecida a 35°C, com correção de pH para 5,8 por meio da adição de ácido láctico 85% e mantidos com agitação por 20 minutos. No início da mosturação já são iniciadas as atividades enzimáticas devido a temperatura e a agitação empregados. Em seguida foi utilizada uma rampa de temperatura (°C) versus tempo (min) com agitação para o monitoramento do processo, conforme apresentado na Figura (2).

**Figura 2 - Rampa de mosturação para o processo de produção de cerveja**



**Fonte: Venturini Filho (2010).**

Após a mosturação, o mosto foi trasfegado para tina de filtração e recirculado para ser filtrado e clarificado até se apresentar cristalino e sem resíduos. Na tina de fervura, foi adicionado o lúpulo (50 g) e mantido por 1 hora sob fervura. O mosto obtido foi repassado para um *chiller* seguido de resfriamento até aproximadamente 15°C, de onde foi retirado um volume de 10 litros e transferido para quatro fermentadores de fundo reto, com capacidade para 10 L, previamente inoculados com as leveduras padronizadas conforme descrito no item 4.2.1. Dois fermentadores foram utilizados para a produção da cerveja com *Saccharomyces cerevisiae* PF2<sub>3</sub> e outros dois fermentadores com a cultura comercial US-05 (controle). Os fermentadores foram mantidos a 12°C em condição estática por 10 dias (VENTURINI, 2010).

### 4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Para a realização das análises físico-químicas, foi retirado um volume de 250 mL de cada fermentador, nos tempos inicial, 2, 4, 6, 8 e 10 dias de produção. Sendo assim, foram obtidas seis amostragens de cada fermentador, ao longo do processo de fermentação para a produção da cerveja.

#### 4.3.1 pH

O pH foi realizado por meio de imersão utilizando-se de um medidor de potencial hidrogeniônico calibrado a 20 °C em soluções tampão de 4,0 e 7,0 (Adolfo Lutz, 2008).

#### 4.3.2 ÁCIDEZ TOTAL TITULÁVEL

Para a determinação de ácidos nas amostras de cerveja foram coletados 10 mL de cada fermentador e transferidos para erlenmeyers de 125 mL contendo 50 ml de água destilada e 3 gotas de indicador fenolftaleína. Foram titulados com solução de hidróxido de sódio a 0,1 M até atingir coloração rósea. O cálculo da acidez titulável foi realizado conforme a equação a seguir, e os resultados foram expressos em porcentagem (%) (Adolfo Lutz, 2008):

$$Acidez = \frac{V \cdot FC \cdot 10}{P}$$

Onde: V= mL utilizado na titulação

FC= fator de correção de NaOH 0,1M

P= peso da amostra

#### *4.3.3 TEOR DE ÁLCOOL*

O teor alcoólico foi determinado pelo método ebulliômetro Soller-Dujardin, onde utilizou 50mL da amostra comparando a temperatura de ebulição da água com a amostra e resultando no percentual alcoólico da bebida (Adolfo Lutz, 2008).

#### *4.4 ANÁLISE DE AÇÚCARES TOTAIS*

Para a determinação de açúcares totais, foi utilizada a metodologia de fenol sulfúrico descrita por Dubois et al. (1956), empregando-se 0,1 mL de amostra com 0,4 mL de água e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. As leituras foram realizadas em transmitância a 430 nm e interpretadas por uma curva padrão de glicose em mg/mL.

#### *4.5 TRATAMENTO DE DADOS*

Os resultados das análises dos teores de álcool, açúcares totais, sólidos solúveis, pH e acidez titulável foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias para os tratamentos e para os tempos analisados foram comparadas pelo teste-t e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Os dados obtidos para teor de açúcares totais e álcool foram também submetidos a análise de correlação de Pearson.

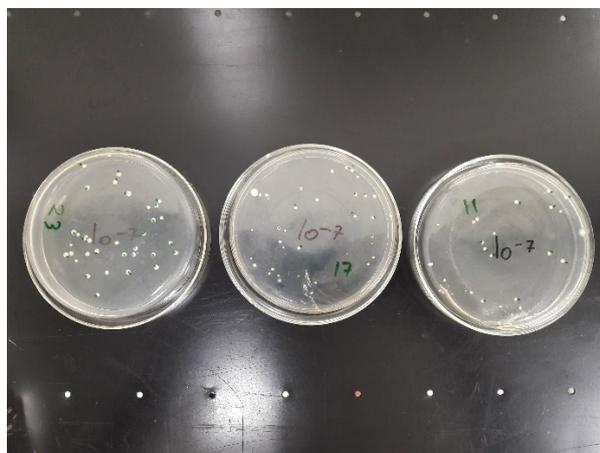
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de confirmar o número de células viáveis da cultura comercial *S. cerevisiae* US-05, o resultado do plaqueamento em meio sólido a partir das diluições decimais seriadas foi de  $1,7 \times 10^9$  UFC/mL, o que representou aproximadamente a informação fornecida pelo fabricante, ou seja,  $6 \times 10^9$  UFC/mL.

Tendo em vista que a concentração mínima recomendada pela literatura para iniciar o processo fermentativo de produção de cerveja está situada entre  $10^6$  a  $10^8$  UFC/mL (DRAGONE; SILVA, 2010), o inóculo padronizado neste estudo foi considerado adequado para utilização com a mesma finalidade.

As Unidades Formadoras de Colônias provenientes do plaqueamento em ágar Batata Dextrose podem ser macroscopicamente visualizadas na Figura 3. Nota-se o crescimento de colônias isoladas na diluição  $10^{-7}$ , o que permitiu expressar o resultado em UFC/mL com exatidão.

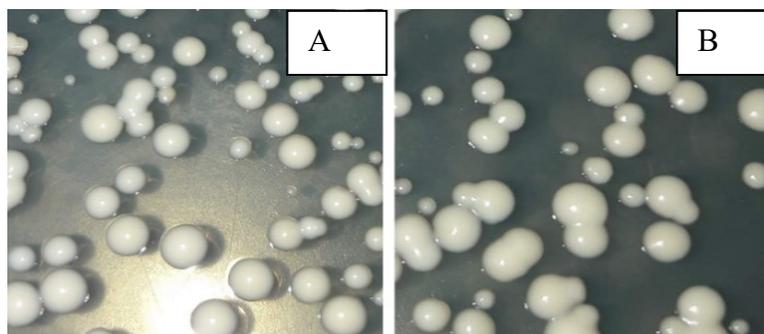
**Figura 3 - Unidades Formadoras de Colônias de *Saccharomyces cerevisiae* US-05**



**Fonte: Autoria própria.**

Na Figura 4, é possível visualizar que as características morfológicas das colônias de *S. cerevisiae* comercial US-05 e *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> são semelhantes, ou seja, colônias de cor branca, lisa, de aspecto brilhante e com elevação convexa, conforme descrito na literatura (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1997).

**Figura 4 - Aspecto morfológico das colônias de *S. cerevisiae* comercial US-05 e *S. cerevisiae* PF23 em meio BDA**



**(A): Colônias de *S. cerevisiae* comercial US-05; (B): colônias de *S. cerevisiae* PF23.**

**Fonte: Autoria própria.**

Para a elaboração da cerveja, foram utilizados os inóculos das culturas de *S. cerevisiae* comercial US-05 e *S. cerevisiae* PF23 em concentrações de  $1,1 \times 10^9$  UFC/mL e  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL, respectivamente.

Os resultados dos teores de álcool, açúcares totais, pH e acidez titulável durante o processo fermentativo para a produção de cerveja estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2 - Análises físico-químicas das cervejas tipo “lager” produzidas com *S. cerevisiae* PF23 e *S. cerevisiae* comercial US-05.**

Dias	Álcool (%)		Açúcares Totais (mg/mL)		pH		Acidez Titulável (%)	
	PF23	US-05	PF23	US-05	PF23	US-05	PF23	US-05
0	0,0±0,00 <sup>Ad</sup>	0,0±0,00 <sup>Ad</sup>	43,05±0,30 <sup>Aa</sup>	43,05±0,30 <sup>Aa</sup>	5,8±0,02 <sup>Aa</sup>	5,8±0,02 <sup>Aa</sup>	2,37±0,05 <sup>Ad</sup>	2,37±0,05 <sup>Ac</sup>
2	0,0±0,00 <sup>Ad</sup>	0,0±0,00 <sup>Ad</sup>	39,34±2,11 <sup>Ba</sup>	42,90±0,53 <sup>Aa</sup>	5,2±0,08 <sup>Bb</sup>	5,6±0,06 <sup>Ab</sup>	4,05±0,69 <sup>Ac</sup>	3,00±0,14 <sup>Bc</sup>
4	0,5±0,16 <sup>Ac</sup>	0,2±0,08 <sup>Bd</sup>	30,75±2,12 <sup>Bb</sup>	37,27±1,55 <sup>Ab</sup>	4,9±0,09 <sup>Bc</sup>	5,1±0,04 <sup>Ac</sup>	6,45±0,26 <sup>Ab</sup>	6,10±0,41 <sup>Ab</sup>
6	2,4±0,18 <sup>Ab</sup>	1,6±0,08 <sup>Bc</sup>	27,15±1,51 <sup>Ab</sup>	29,06±2,57 <sup>Ac</sup>	4,6±0,07 <sup>Bd</sup>	4,7±0,03 <sup>Ad</sup>	6,47±0,12 <sup>Ab</sup>	6,70±0,30 <sup>Aab</sup>
8	3,4±0,16 <sup>Aa</sup>	2,9±0,21 <sup>Bb</sup>	27,56±1,27 <sup>Ab</sup>	27,71±2,57 <sup>Ac</sup>	4,5±0,02 <sup>Ade</sup>	4,5±0,03 <sup>Ae</sup>	6,87±0,20 <sup>Aab</sup>	6,48±0,42 <sup>Aab</sup>
10	3,6±0,11 <sup>Aa</sup>	3,6±0,12 <sup>Aa</sup>	27,64±1,20 <sup>Ab</sup>	25,39±1,89 <sup>Ac</sup>	4,4±0,03 <sup>Ae</sup>	4,4±0,02 <sup>Ae</sup>	7,27±0,45 <sup>Aa</sup>	6,87±0,60 <sup>Aa</sup>

\*\*Cada valor corresponde à média ± desvio padrão dos valores de 6 dados (sendo três respostas para cada repetição). Letra maiúsculas iguais na mesma linha, e letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância (t-student, teste Tukey).

**Fonte: Autoria própria.**

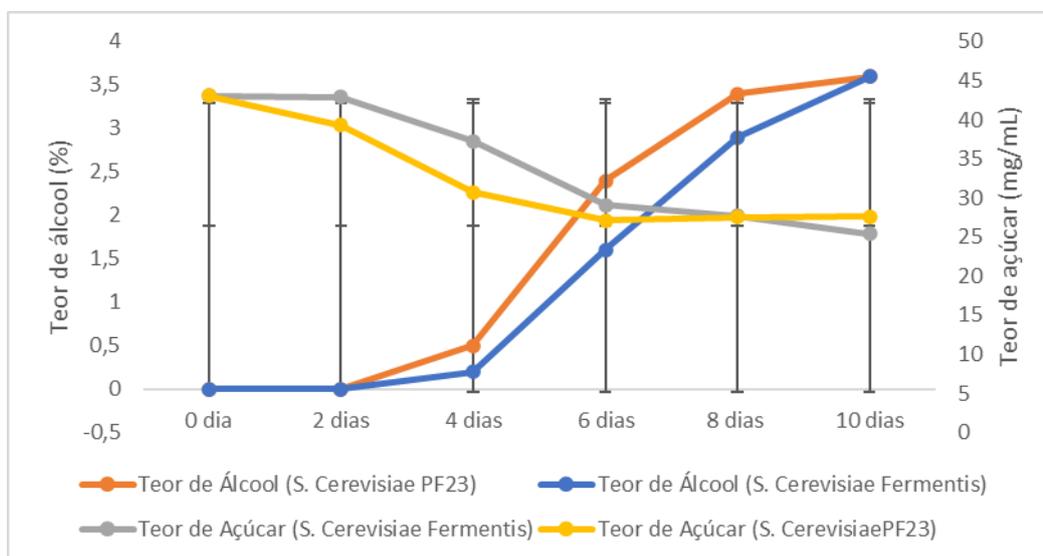
O consumo de açúcares totais pela *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> foi de 15,41 mg/mL, o que corresponde a 36% do teor de açúcares totais observado no início do processo fermentativo. Para a cultura comercial, o consumo foi de 17,67 mg/mL, o que corresponde a 41% do teor de açúcares totais observado no início do processo fermentativo. O teor de álcool obtido a partir do processo fermentativo por ambas as culturas de leveduras foi de 3,6% no final do processo fermentativo. Os dados indicam que a levedura comercial necessita de mais tempo e maior consumo de açúcares totais para obter o mesmo rendimento de álcool produzido pela levedura em estudo.

Na Figura 5 está apresentada a relação entre o consumo de açúcares totais e a produção de álcool pelas culturas *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> e *S. cerevisiae* comercial US-05.

Analisando-se o teor de álcool produzido pelas duas culturas ao longo do período de fermentação, a porcentagem de álcool produzida pela *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> entre o quarto e oitavo dia foi maior que a produzida pela cultura comercial (US-05) ( $p < 0,05$ ), e somente no décimo dia de fermentação o teor de álcool produzido pelas duas culturas não diferiu estatisticamente (Tabela 1, Figura 5). Tal fato sugere que a levedura em estudo se adapte com maior facilidade ao substrato (mosto) possibilitando um consumo mais rápido dos açúcares e conseqüentemente um teor alcoólico maior em menos tempo, quando comparado com a cultura comercial.

O teor alcoólico obtido pela *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> no oitavo dia de fermentação é suficiente para caracterizar a bebida como alcoólica, uma vez que pela legislação, a bebida é considerada alcoólica quando a graduação alcoólica estiver acima de 0,5% (BRASIL, 2009).

**Figura 5 - Relação entre o consumo de açúcares totais e a produção de álcool pelas culturas *S. cerevisiae* PF23 e *S. cerevisiae* comercial US-05 durante o processo fermentativo para a produção de cerveja**



**Fonte: Autoria Própria.**

Especificamente em relação ao comportamento de *S. cerevisiae* PF23, o teor de álcool produzido no décimo dia de fermentação (Tabela 1, Figura 5), não diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ), sugerindo uma vantagem para a indústria cervejeira, em termos de economicidade de tempo e custo final.

A diminuição do teor de açúcares totais ao longo do período de fermentação corrobora com o aumento na produção de álcool, uma vez que no processo fermentativo, as leveduras degradam os açúcares presentes no substrato, convertendo-os em etanol como produto final (VARNAM; SUTHERLAND, 1997).

Com o intuito de correlacionar o consumo de açúcar com a produção de álcool apresentado na Tabela 1 e Figura 5, os dados obtidos para estes teores foram submetidos a análise de Pearson, que mostrou uma correlação forte e negativa para o comportamento de *S. cerevisiae* PF23 ( $r=-0,84$ ) e *S. cerevisiae* US-05 ( $r=-0,94$ ).

A correlação forte negativa está associada ao fato de que a diminuição dos teores de açúcares totais e aumento do teor de álcool, completamente justificado pelo metabolismo dos açúcares para conversão em etanol. Embora o consumo dos açúcares totais x teor de álcool obtido pelo metabolismo de *S. cerevisiae* US-05 esteja mais próximo de um grau linear entre as duas variáveis ( $r=-0,94$ ), o comportamento de *S. cerevisiae* PF23 ainda se mostra mais vantajoso, mesmo com

um fator de correlação mais baixo ( $r=-0,84$ ), em virtude da possível economicidade em caso de aplicação.

A variação do pH entre os tempos inicial e final observados para ambas culturas foi de 1,4 ( $p > 0,05$ ), com valor final de 4,4. Da mesma forma, a acidez titulável obtida no final do processo das bebidas fermentadas pelas duas culturas também não diferiu estatisticamente. Independentemente da cultura empregada, as cervejas apresentaram-se como ácidas, o que é esperado para este tipo de produto.

Conforme citado por Carvalho et al. (2011) em estudos sobre elaboração de cerveja pilsen em concentrações diferenciadas de *Saccharomyces cerevisiae*, o pH do mosto antes da fermentação está em 5,56 e finaliza após sua maturação com 4,28 no décimo sétimo dia de fabricação. Os resultados de acidez titulável encontrados no mesmo trabalho foram de 1,5% até 1,83%. O teor elevado de acidez titulável encontrado nos tratamentos da PF2<sub>3</sub> (7,27%) e US-05 (6,87%) podem ser consequência da análise realizada no último dia de fermentação, antes da maturação. Após a maturação a cerveja tende a diminuir o teor de diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico que influenciam nos resultados de sua acidez (DRAGONE; SILVA, 2010).

Contudo, os teores de álcool, açúcares totais, pH e acidez titulável determinados na cerveja elaborada com *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> são considerados adequados para este tipo de bebida alcoólica. Entretanto, estudos de aceitação sensorial são necessários para avaliar os atributos cor, turbidez, sabor e aroma, a fim de garantir a aceitabilidade e intenção de compra pelo consumidor.

## 6. CONCLUSÃO

*Saccharomyces cerevisiae* PF2<sub>3</sub> isolada de polpa de goiaba tem potencial tecnológico de aplicação em processo fermentativo de mosto para elaboração de cerveja, a partir do mesmo inóculo utilizado por cultura comercial.

Os teores de álcool, açúcares totais, pH e acidez titulável da cerveja elaborada com *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> são adequados para a definição de cerveja tipo “lager”.

O processo fermentativo realizado pela *S. cerevisiae* PF2<sub>3</sub> para produção de álcool é mais rápido que o realizado pela cultura comercial, e portanto, pode ser mais vantajoso para a indústria cervejeira em termos de economia no tempo de produção.

Estudos sensoriais sobre a cor, turbidez, sabor e aroma são necessários para definir a aceitabilidade do produto.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA E SILVA, J.B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Coord.) **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005, cap. 15, p. 347-382.
- AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia na produção de alimentos**. Vol. 4. Editora Blücher, São Paulo, 523 p., 2001.
- BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 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 República Federativa do Brasil)**, Brasília, DF, 4 de junho de 2009.
- CARVALHO, D. S.; ZAMBIAZI, R. C. Avaliação do processo fermentativo de cerveja pilsen pelo uso de diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae*. **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 22, n. 3, p. 351-357, jul./set. 2011.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- DRAGONE, Giuliano; SILVA, João B. A. In: FILHO, Waldemar G. V. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e tecnologia**. São Paulo: Editora Blücher, vol. 1. 2010.
- ESSLINGER, Hans Michael. **Handbook of brewing: Processes, Technology e Markets**. Weinheim: WILEY-VCH, 2009.
- HARDWICK, W.A. **Handbook of brewing**. New York: Marcel Dekker, 1995. 714p.
- IINSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p.1020.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **A CERVEJA NO BRASIL**. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf> > Acesso em: 5 nov. 2018.
- NOONAN, G. J. New brewing lager beer. Boulder: Brewers Publications, 1996. 363p.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo, SP: Makron, 1997. v. 1.
- REINOLD, M.R. **Manual prático de cervejaria**. São Paulo: Aden, 1997. 214p.

STEWART, G.G.; RUSSEL, I. **Food Biotechnology**. Nova York: VCH Publishers, 1995.

SENAI. **Conheça a cerveja**. Rio de Janeiro: Setor de Documentação Bibliográfica do CENATEC de Produtos Alimentares do SENAI – DR/RJ, Vassouras, 1997.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas**. Espanha: Acribia, 1997. 487p.

VENTURINI FILHO, W. G. **Fécula de mandioca como adjunto de malte na fabricação de cerveja**. Botucatu, 1993. 233p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, 1993.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de cerveja**. Jaboticabal: Funep, 2000. 83 p.