



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)

**BIOTECNOLOGIA**

**QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO DE *Saccharomyces cerevisiae* NA  
FERMENTAÇÃO DE MOSTO CERVEJEIRO PRÉ ACIDIFICADO  
BIOLOGICAMENTE**

**AUGUSTO DOS SANTOS HERRERO**

Foz do Iguaçu  
2023

**QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO DE *Saccharomyces cerevisiae* NA  
FERMENTAÇÃO DE MOSTO CERVEJEIRO PRÉ ACIDIFICADO  
BIOLOGICAMENTE**

**AUGUSTO DOS SANTOS HERRERO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto Latino-Americano  
De Ciências Da Vida e Da Natureza da  
Universidade Federal da Integração  
Latino-Americana, como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

Orientador: Dr. Kelvinson Fernandes Viana

Foz do Iguaçu  
2023



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA



### ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao dia 31 do mês de Maio do ano de 2023, realizou-se a apresentação pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado *QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO DE Saccharomyces cerevisiae NA FERMENTAÇÃO DE MOSTO CERVEJEIRO PRÉ ACIDIFICADO BIOLÓGICAMENTE*, apresentado pelo discente Augusto dos Santos Herrero, do curso de Biotecnologia. Os trabalhos foram iniciados às 09:00 pelo docente orientador Kelvinson Fernandes Viana, presidente da banca examinadora, juntamente com os docentes Michel Passarini e Pablo Nunes

#### Observações da Banca Examinadora:

Foram feitas sugestões não vinculadas à aprovação.

A Banca Examinadora, ao término da apresentação oral e da arguição do acadêmico, encerrou os trabalhos às 9:30 Os examinadores atribuíram as seguintes notas:

orientador(a)	nota final: 7,5	Média final: 7,5
docente	nota final: 7,5	
docente	nota final: 7,5	

Proclamado o resultado pelo presidente da banca examinadora, encerraram-se os trabalhos e, para constar, eu Kelvinson Fernandes Viana lavrei a presente Ata que assino juntamente com os demais membros da banca.

Foz do Iguaçu, 31 de Maio de 2023.

#### Assinaturas:

Michel Passarini	UNILA	
Pablo Nunes	UNILA	
Kelvinson Viana	UNILA	

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Augusto dos Santos  
Herrero\_\_\_\_\_

Curso: \_\_\_\_\_ Biotecnologia

	Tipo de Documento
<input checked="" type="checkbox"/> graduação	<input type="checkbox"/> artigo
<input type="checkbox"/> especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso
<input type="checkbox"/> mestrado	<input type="checkbox"/> monografia
<input type="checkbox"/> doutorado	<input type="checkbox"/> dissertação
	<input type="checkbox"/> tese
	<input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais
	<input type="checkbox"/>

Título do trabalho acadêmico: QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO DE *Saccharomyces cerevisiae* NA FERMENTAÇÃO DE MOSTO CERVEJEIRO PRÉ ACIDIFICADO BIOLÓGICAMENTE\_\_\_\_\_

Nome do orientador(a): Dr. Kelvinson Fernandes Viana

Data da Defesa: 31/05/2023.

## Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

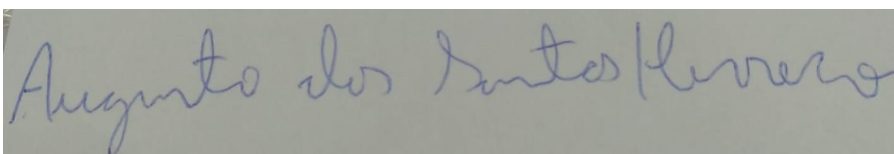
a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública Creative Commons Licença 3.0 Unported.

Foz do Iguaçu, 01 de Junho de 2023.



Assinatura do Responsável

## RESUMO

Cervejas acidificadas existem a muito tempo, porém nos últimos anos estão ganhando mais notoriedade no mercado devido suas características organolépticas se destacarem pela refrescância e leveza, combinando bem com a introdução de frutas. Neste trabalho foi analisada a influência de diferentes dosagens, na inoculação de levedura liofilizada Fermentis US-05, para fermentação alcoólica de um mosto cervejeiro industrial produzido comercialmente de receita *Berliner Weisse*, acidificado biologicamente produzido pela moderna técnica *kettle sour*. Foram testadas quatro “taxas” de inóculos da levedura na fermentação, sendo as três menores realizadas em quadruplicata e a maior dosagem em triplicata, totalizando 15 amostras em quatro grupos experimentais contendo 2500 ml de mosto, que foram fermentadas a 20°C durante 120 horas em incubadora B.O.D, sendo verificados diariamente quanto ao pH e a conversão de açúcares a etanol pela diminuição da densidade do mosto. Além disso, foi realizada a quantificação celular para determinar o comportamento das células de levedura nos intervalos de 48, 72 e 96 horas do processo. Concluindo que a maior dosagem de células, com a taxa de 1,5 milhões de células/ ml/ °plato atingiu o final da fermentação em menor tempo, apresentando ser a melhor opção para mosto acidificado a nível industrial. Ademais, a metodologia de quantificação das leveduras por contagem de células foi mais prática em relação a pesagem de biomassa centrifugada seca.

**Palavras-chave:** cerveja ácida, dosagem, kettle sour, pitch rate, sour beer.

## RESUMEN

Las cervezas acidificadas existen desde hace mucho tiempo, pero en los últimos años han ganado más notoriedad en el mercado debido a sus características organolépticas, que destacan por su frescura y ligereza, combinando bien con la introducción de la fruta. En este trabajo se analizó la influencia de diferentes dosificaciones en la inoculación de la levadura liofilizada Fermentis US-05 para la fermentación alcohólica de un mosto de cerveza industrial producido comercialmente según la receta Berliner Weisse, acidificado biológicamente mediante la técnica moderna de kettle sour. Se ensayaron cuatro “tasas” de inóculo de levadura en fermentación, las tres más bajas se realizaron por cuadruplicado y la mayor dosificación por triplicado, totalizando 15 muestras en cuatro grupos experimentales que contenían 2500 ml de mosto, los cuales fueron fermentados a 20°C durante 120 horas en un incubadora B.O.D, controlándose diariamente el pH y la conversión de azúcares a etanol debido a la disminución de la densidad del mosto. Además, se realizó la cuantificación celular para determinar el comportamiento de las células de levadura a intervalos de 48, 72 y 96 horas del proceso. Concluyendo que la mayor dosificación de células, con una tasa de 1,5 millones de células/ml/°plato, alcanzó el final de la fermentación en menor tiempo, demostrando ser la mejor opción para el mosto acidificado a nivel industrial. Además, la metodología para cuantificar levaduras por conteo de células fue más práctica en comparación con el pesaje de biomasa centrifugada seca.

**Palabras clave:** cerveza agria, dosificación, kettle sour, pitch rate, sour beer.

## SUMMARY

Acidified beers have existed for a long time, but in recent years they have gained more notoriety in the market due to their organoleptic characteristics, which stand out for their freshness and lightness, combining well with the introduction of fruit. In this work, the influence of different dosages on the inoculation of lyophilized yeast *Fermentis US-05* was analyzed for alcoholic fermentation of an industrial brewer's wort commercially produced using the Berliner Weisse recipe, biologically acidified using the modern kettle sour technique. Four "rates" of yeast inoculum in fermentation were tested, the three lowest performed in quadruplicate and the highest dosage in triplicate, totaling 15 samples in four experimental groups containing 2500 ml of must, which were fermented at 20°C for 120 hours in a B.O.D incubator, being checked daily for the pH and the conversion of sugars to ethanol due to the decrease in the wort density. In addition, cell quantification was performed to determine the behavior of yeast cells at intervals of 48, 72 and 96 hours of the process. Concluding that the highest dosage of cells, with a rate of 1.5 million cells/ml/°plato, reached the end of fermentation in a shorter time, proving to be the best option for acidified wort at an industrial level. Furthermore, the methodology for quantifying yeasts by cell counting was more practical compared to weighing dry centrifuged biomass.

**Keywords:** sour beer, dosage, fermentation, kettle sour, pH, sour beer.

## LISTA DE IMAGENS

Imagem 1 - Formas de acidificação da cerveja.....	15
Imagem 2 - Curva de crescimento microbiano.....	23
Imagem 3 - Retorno do mosto acidificado para a tina de fervura.....	27
Imagem 4 - Armazenamento do mosto ácido fervido.....	28
Imagem 5 - Baldes alimentícios utilizados na fermentação.....	29
Imagem 6 - Preparo de tubos falcon para centrifugação.....	32
Imagem 7 - Áreas de contagem utilizadas na câmara de Neubauer.....	34
Imagem 8 - Visualização obtida no microscópio de amostra para contagem.....	35

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Acidificação biológica do mosto.....	36
Gráfico 2 - Média do extrato aparente nas diferentes dosagens.....	38
Gráfico 3 - Média do peso seco de biomassa em gramas no período entre 48 e 96 horas.....	43
Gráfico 4 - Média da contagem de leveduras em milhões por mililitro do período entre 48 e 96 horas.....	44

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
2.1 CERVEJAS ÁCIDAS (SOUR BEER).....	13
2.2 KETTLE SOUR.....	14
2.3 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL).....	16
2.4 ESTILOS MAIS POPULARES DE CERVEJA ÁCIDA.....	17
2.4.1 Berliner Weisse.....	18
2.4.2 Catharina Sour.....	18
2.4.3 American Wild Ale.....	19
2.5 VARIÁVEIS NA FERMENTAÇÃO POR LEVEDURAS.....	19
2.5.1 Substrato.....	20
2.5.2 Oxigenação Do Mosto.....	20
2.5.3 Temperatura.....	21
2.5.4 pH.....	21
2.5.5 Pressão Osmótica.....	21
2.6 CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO.....	21
2.7 ANÁLISE DE AMOSTRAS.....	23
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
4.1 PREPARO DO MOSTO.....	26
4.2 ACIDIFICAÇÃO BIOLÓGICA (PRÉ FERMENTAÇÃO).....	26
4.3 INTERRUPÇÃO DA ACIDIFICAÇÃO BIOLÓGICA.....	26
4.4 ARMAZENAMENTO DO MOSTO.....	27
4.4 PREPARO DOS MINI FERMENTADORES.....	28
4.5 INOCULAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	30
4.6 EXTRATO APARENTE.....	31
4.7 PH.....	31
4.8 PESO DE BIOMASSA SECA.....	32
4.9 CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS TOTAIS.....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
5.1 ACIDIFICAÇÃO BIOLÓGICA.....	36
5.2 EXTRATO APARENTE.....	38
5.2 PH.....	41
5.3 BIOMASSA SECA E CONTAGEM DE LEVEDURAS.....	43
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Alimentos fermentados começaram a ser produzidos a muitos séculos, tendo como características aumento da estabilidade de armazenamento e modificação na textura de sua matéria-prima, foram se popularizando pelo interesse nas propriedades organolépticas geradas. Eles são muito populares atualmente, representando uma boa porcentagem do que é consumido diariamente, tendo como exemplo, produtos lácteos: queijo, iogurte, coalho e leite azedo; bebidas alcoólicas, como vinho, cerveja e cidra; vegetais fermentados como picles e chucrute; além de carnes fermentadas como salames e salsichas (SOCCOL, 2013).

Evidências supõem que a criação da cerveja se deu há 9000 anos na antiga Mesopotâmia, onde os sumérios por acaso descobriram a transformação que ocorria com cereais em contato com água. Nos primórdios ela era vista como algo divino e por volta da idade média se tornou mais difundida na Europa pela produção através da igreja católica com seus mosteiros, nesse período a bebida era diferente do que encontramos hoje, pois não haviam as tecnologias empregadas atualmente, sendo trigo o principal ingrediente (CERVBRASIL, 2018).

O estudo sobre os processos de produção, o desenvolvimento de técnicas e o registro de receitas se iniciou na idade média dentro de mosteiros, locais estes que se desenvolvia o conhecimento graças ao domínio da escrita. Époça em que era usada não só como bebida inebriante, também como remédio e uma opção ao consumo de água em tempos que na maioria das vezes não havia potabilidade (HORNSEY, 2003 *apud* MORETTO, 2022).

As cervejas historicamente foram armazenadas e transportadas em barris de madeira, o tempo em que eram mantidas assim influenciava seus sabores e aromas. Conforme a modernização da produção e da industrialização, novas metodologias e estilos de cerveja ganharam mais espaço no mercado, assim cervejas populares se tornaram mais leves e de aromas e sabores mais simples (MORETTO, 2022).

Nos dias atuais as grandes cervejarias dominam o mercado da bebida com as chamadas cervejas comerciais, porém nos últimos anos vem crescendo o consumo de cervejas artesanais elaboradas por microcervejarias. Estas se consolidam no mercado por oferecer aos consumidores diversos estilos que são produzidos com ingredientes e métodos diversificados, que apresentam experiências organolépticas às vezes desconhecidas em cerveja aos clientes (BARRETO, 2022).

O termo “Craft Beer” foi criado nos Estados Unidos pela necessidade de distinguir as cervejas comerciais das cervejas artesanais, apesar de não significar um estilo específico, as cervejas artesanais seguem normas rígidas de qualidade. Entende-se por artesanais ou especiais, cervejas produzidas com matérias primas de maior qualidade, com nenhum ou poucos aditivos químicos e adjuntos (WUNDERLICH *et al.*, 2005 *apud* FEISTAUER, 2016).

A cerveja ácida vem se destacando nos últimos anos, devido ao sabor único, além de ser um estilo que não é restrito a um processo de produção, origem ou ingrediente. Sua acidez é caracterizada pela alta concentração de ácidos orgânicos e baixo pH, sendo em sua maioria resultado da fermentação de bactérias ácido lácticas (BAL) , assim, diversas alternativas existem a ser exploradas em sua fermentação, para definir técnicas de produção e sabores (PRAIA, 2022).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CERVEJAS ÁCIDAS (SOUR BEER)

São cervejas com sabor intencionalmente azedo, conhecidas por serem produzidas de forma espontânea com uma mistura de microrganismos do ambiente, sendo fermentações que demoram para ser concluídas e são difíceis de serem controladas (DYSVIK *et al.*, 2019).

No contexto cervejeiro “sour” é um termo que traduzido significa azedo, se referindo a percepção ácida e azeda que estas cervejas apresentam. A característica pode ser proveniente de contaminantes sendo classificada como “off-flavour”, ou pode ser criada de maneira intencional através de bactérias selvagens ou inoculadas tais como: *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. (HORNINK & GALEMBECK, 2019).

O termo “sour” abrange várias cervejas diferentes, que têm em comum sabor azedo com altas concentrações de ácido láctico e acético, refletindo um pH baixo podendo chegar próximo a 3, este advindo do metabolismo das bactérias e leveduras (BOSSAERT *et al.*, 2019).

As principais espécies que podem ser adquiridas comercialmente para se produzir cerveja sour são do gênero *Lactobacillus*, entre elas: *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. lindneri*, *L. buchneri*, *L. delbrueckii*, *L. brevis* e *L. rhamnosus*. Em todas as espécies, a maioria do carbono é direcionado para produção de ácido láctico, entretanto algumas também produzem ácido acético em uma concentração dez vezes menor que láctico (SILVA, 2019).

Quando se compra uma cerveja ácida, se escolhe entre duas diferentes categorias, que indicam a forma com que são elaboradas, sendo: *kettle sour* ou tradicional *sour* / selvagem. Na categoria *kettle sour*, a acidificação do mosto normalmente envolve a adição de bactérias do ácido láctico, sendo este mantido aquecido enquanto ocorre a fermentação láctica. Já o processo de produção da tradicional *sour* / selvagem ocorre por fermentação mista, incluindo uma levedura ale ou lager, uma ou ambas bactérias *lactobacillus* spp. e *pediococcus* spp. ainda alguma levedura selvagem *Brettanomyces* spp. (LEIBTAG, 2021).

A maioria das cervejas vendidas contém apenas *Saccharomyces spp.*, sendo que a presença de outros organismos nesses casos indicam defeito na bebida, microrganismos que deterioram cerveja incluem acetobactérias, bactérias ácido-láticas e leveduras *Brettanomyces spp.* Por outro lado, a acidificação melhora a acessibilidade do amido e previne o crescimento de outros microrganismos favorecendo o crescimento de *Saccharomyces spp.* (BOSSAERT *et al.*, 2019).

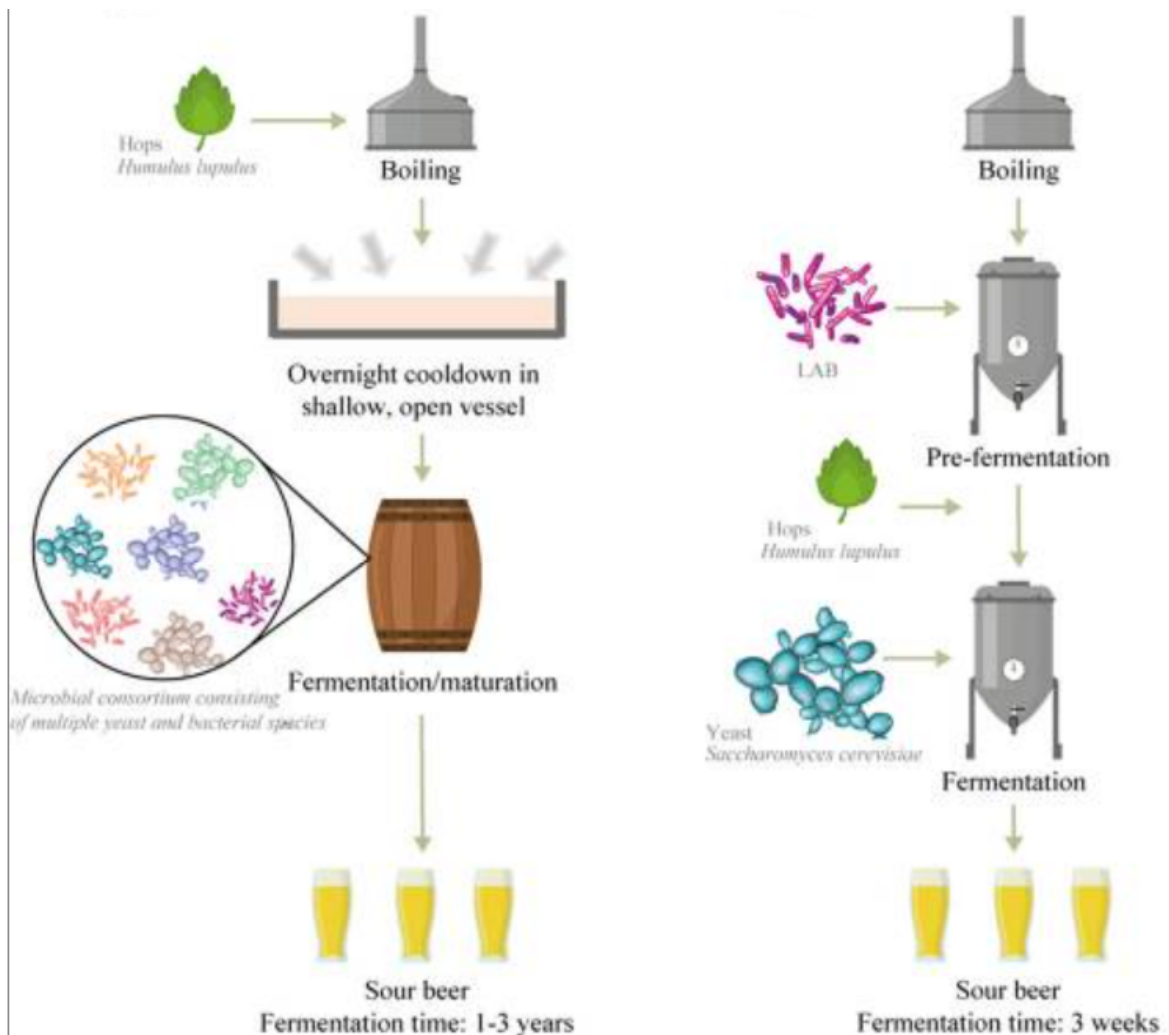
Atualmente, para se produzir cervejas ácidas se utilizam métodos que vão desde o azedamento espontâneo, até a inoculação de bactérias ou culturas mistas à maneira tradicional, como também a técnica *kettle souring* moderna (BOSSAERT *et al.*, 2019).

## 2.2 KETTLE SOUR

É o processo em que o mosto se acidifica por ação de bactérias ácido láticas, frequentemente usando lactobacilos antes da fermentação alcoólica. É uma técnica rápida que se finaliza a cerveja em até 3 semanas, ao invés de 1 até 3 anos, como nas cervejas ácidas tradicionais / selvagem por maturação em barril de madeira (Imagem 1). O *kettle souring* permite controlar facilmente a queda do pH, dando um resultado mais previsível pois minimiza as contaminações, ainda se torna mais vantajoso caso o mosto seja pasteurizado após acidificação, pois permite a adição de leveduras sem o risco de contaminação no decorrer da fermentação alcoólica (TONSMEIRE, 2014 *apud* ALMEIDA, 2017).

Esta técnica possibilita ao cervejeiro maior controle sobre a produção de ácido, pelo fato da acidificação poder ser interrompida em qualquer momento pela fervura do mosto, assim, consumindo menos tempo que a fermentação tradicional / selvagem. Porém há desvantagem no caso de a pré fermentação (acidificação) ocorrer na própria tina de fervura, pois interrompe a produção de outras receitas pelo equipamento até a finalização desta etapa do procedimento. Em pequenas cervejarias normalmente a técnica é realizada aos finais de semana, evitando assim atrasos na rotina de produção (OSBURN *et al.*, 2018).

Imagem 1 - Formas de acidificação da cerveja: tradicional a esquerda e moderna a direita.



Fonte: DYSVIK *et al.*, 2020.

O ato de ferver o mosto depois de ser acidificado elimina compostos voláteis que tenham sido produzidos neste processo, por isso produz cervejas que por vezes são criticadas pela falta de complexidade. Para evitar algumas das desvantagens sensoriais, alguns cervejeiros envelhecem em barris de carvalho a fim de acrescentar complexidade às mesmas. Sendo assim, a fermentação tradicional por cultura mista recebe menos críticas por ser capaz de produzir mais sabor e complexidade do que o *kettle souring*, entretanto necessita de muito mais tempo para sua finalização, além de mais espaço para o armazenamento dos barris de madeira em que estão contidas (OSBURN *et al.*, 2018).

## 2.3 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL)

O gênero *Lactobacillus*, descrito pela primeira vez já em 1901, vem se expandindo muito rapidamente nas últimas décadas. Até recentemente, o gênero compreendia mais de 250 espécies. Em 2019, a análise da sequência completa do genoma desse grande número de espécies mostrou que os membros do gênero estão filogeneticamente entrelaçados com outros gêneros, como: *Pediococcus spp.*, *Fructobacillus spp.*, *Paralactobacillus spp.* e *Leuconostoc spp.*, e que a heterogeneidade do gênero era quase invisível na taxonomia bacteriana (ZHENG *et al.*, 2020).

No passado, várias espécies do gênero *Lactobacillus* já haviam sido colocadas em novos gêneros, como: *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Eggerthia*, *Kandleria*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ou *Weissella*. Porém, comparações baseadas no genoma inteiro recentemente usadas sugeriram a necessidade de uma reorganização taxonômica muito mais profunda, resultando na geração de 23 novos gêneros e redução do gênero original de *Lactobacillus* para apenas 38 espécies em torno da espécie-tipo, *Lactobacillus delbrueckii* (ZHENG *et al.*, 2020).

As BAL geralmente estão associadas a habitats ricos em nutrientes como alimentos tipo leite, carne e legumes, algumas também habitam a flora normal da cavidade oral e trato geniturinário de animais e humanos. Os gêneros de interesse para fermentar alimentos incluem: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* (SOCCOL, 2013).

Estas são a principal fonte de ácido láctico de alimentos fermentados, também produzem vários compostos que contribuem para as características do alimento, além de produzirem substâncias antimicrobianas capazes de inibir microrganismos deteriorantes e patógenos. Os principais gêneros aplicados na produção de cervejas azedas são *Lactobacillus* e *Pediococcus* (SOCCOL, 2013)..

BAL são capazes de produzir compostos organolépticamente ativos, além do ácido láctico em bebidas à base de malte de cevada. Destes incluem ácido acético e ácido fórmico, acetato de etila uma variedade de álcoois superiores, aldeídos, cetonas e compostos fenólicos (DYSVIK *et al.*, 2019).

Graças aos avanços no sequenciamento genômico, análise genômica comparativa e clonagem de genes; houve aumento no interesse em aplicar este conhecimento a fim de projetar vias metabólicas dessas bactérias visando a síntese

de compostos que apresentem atributos sensoriais, nutricionais e de saúde. A engenharia de vias metabólicas para BAL tem sido usada para sintetizar produtos alimentícios em biorreatores, sendo o principal ácido láctico, mas também bacteriocinas, adoçantes de baixa caloria, compostos de aroma, aminoácidos, exopolissacarídeos e vitaminas do complexo b (SOCCOL, 2013).

*Lactobacillus buchneri* é uma bactéria heterofermentativa, produtora de ácido láctico e ésteres, estes remetendo a frutas amarelas e pêssego. Em sua aplicação deve se evitar a presença de oxigênio para evitar a formação de ácido acético, essa bactéria possui capacidade de atingir um pH mínimo de 3,6 (BIO4, 2022).

*L. buchneri* pode ser utilizada para produção de cervejas sour, podendo ser aplicada em kettle sour tanto em fermentações secundárias como em fermentações primárias junto com a levedura. Gera uma acidez neutra, sendo uma das poucas espécies que cresce bem em baixas concentrações de oxigênio. Ela não necessita de uma cama de CO<sub>2</sub> no fermentador para acidificar o mosto, porém é sensível ao lúpulo e não atenua o mosto cervejeiro (LEVTECK, 2022).

*Lactobacillus brevis* é uma cepa clássica utilizada para produzir acidez nas cervejas de estilo sour, ela pode ser aplicada sozinha seguindo a metodologia *kettle sour* ou inoculada junto com a levedura antes da fermentação no método conhecido como *co-pitching*. Esta gera uma acidez láctica mais limpa que a acética, sendo um microrganismo heterofermentativo e como todo lactobacilo é sensível a altas doses de lúpulo (YEASTLAB, 2022).

A bactéria *Lactobacillus brevis* gera uma acidez limpa na boca e em seu aroma, e produz mais ácido láctico que *Lactobacillus buchneri*, assim, é capaz de baixar o pH até 3,1 quando se utilizada no método *kettle sour*. Para se utilizar *L. brevis* deve se evitar a presença de oxigênio, pois este pode favorecer a produção de ácido acético que não é desejável para cerveja (BIO4, 2022).

## 2.4 ESTILOS MAIS POPULARES DE CERVEJA ÁCIDA

Alguns guias foram criados a fim de estabelecer critérios para concursos de cerveja artesanal, os mais seguidos são o BJCP (Beer Judge Certification Program) e o BA (Beer Association), estes guias entregam importantes informações para elaboração de receitas, pois estabelece parâmetros tais como: graduação alcoólica, amargor, extrato inicial e final, cor, aroma, carbonatação, ingredientes,

exemplos comercializados, além da sensação na boca que as cervejas devem apresentar (MORETTO, 2022).

O BJCP é uma organização que padroniza e ajusta as características de correspondência aos estilos de cerveja, atualmente havendo 154 estilos de cerveja validados que vão das mais conhecidas como pilsen até cervejas mais elaboradas com adição de frutas, raízes, madeira, especiarias, mel e legumes (SILVA, 2022).

As cervejas ácidas podem ser produzidas de muitas maneiras diferentes e abrangem uma grande variedade de estilos de cerveja. As cervejas azedas mais comuns são de estilo belga, incluindo *Lambics*, *Flanders Red Ale* e *Old Brown*, ao lado de outros como *American Wild Ale*, *Berliner Weisse* e *Gose* (BOSSAERT *et al.*, 2019).

Berliner Weisse e Gose são os estilos mais comuns de cerveja azeda alemã, neles o malte de trigo compõe uma porção relevante do total de malte utilizado e os lactobacilos fazem papéis imprescindíveis nas suas produções. Estes estilos são originários de Berlin e Goslar (ou Leipzig), sendo produtos produzidos tanto pelos métodos tradicionais quanto por técnicas mais modernas, a principal diferença entre elas é o tempero, que na Gose recebe sal e coentro (BOSSAERT *et al.*, 2019).

#### 2.4.1 Berliner Weisse

Uma cerveja de alta fermentação, produzida com maior parte de trigo e cevada, normalmente clara, com acidez suave, espuma compacta e estável. Caracterizada por ser muito refrescante graças a suave acidez e possui teor alcoólico próximo a 3%, tem boa estabilidade sensorial e sabor de levedo e maçã similar ao de sidra, pouco amargor com notas esterificadas frutadas e florais (BUHRMANN, 2017).

#### 2.4.2 Catharina Sour

Este foi o primeiro estilo de cerveja brasileiro, reconhecido oficialmente pelo BJCP em 2012. Têm como características ser baseada em cerveja de alta fermentação com trigo, de consistência leve e refrescante. Leva frutas frescas, possui acidez limpa, com baixa graduação alcoólica, carbonatação elevada e baixo amargor (SILVA, 2022).

Suas frutas são normalmente tropicais, que podem ser complementadas com especiarias que não sobrepõem o caráter da fruta. No aroma a fruta deve ser rapidamente perceptível a um nível médio para alto, porém a acidez deve ser detectável a um nível baixo apenas de suporte a fruta. O aroma do malte pode estar presente a um nível baixo, de forma a caracterizar pão, sem caracterizar lúpulo, álcool intenso e leveduras (STRONG, 2021 *apud* RAMOS, 2022).

Na aparência a cor pode variar conforme a fruta e as especiarias usadas, sendo geralmente clara. A opacidade pode ir de límpida a turva, variando bastante conforme a idade e o tipo da fruta utilizada, sempre efervescente de colarinho médio para alto com boa retenção e variando a tonalidade da espuma conforme a fruta (STRONG, 2021 *apud* RAMOS, 2022).

#### 2.4.3 American Wild Ale

É uma variação de cerveja sour, similar as *lambics* e *ouds* belgas, mas diferente em sua produção e fermentação. O termo selvagem não remete diretamente a fermentação ser espontânea, mas sim pelo uso de microrganismos não *Saccharomyces* em sua fermentação. Esta cerveja normalmente é elaborada a partir de uma cerveja base, sendo usado *berliner weisse* ou *saison* e até mesmo *blonde ale*, assim, a base é trabalhada pela fermentação e maturação em barris de madeira para gerar a característica “funky” através das leveduras *Brettanomyces* spp. (ERICKSEN, 2020).

### 2.5 VARIÁVEIS NA FERMENTAÇÃO POR LEVEDURAS

Qualquer mosto preparado de cereais maltados fornece um meio capaz de produzir biomassa de leveduras, componentes aromáticos (*flavours*) e etanol. Para garantir essa capacidade, é necessário controlar parâmetros como a temperatura e a quantidade de leveduras inoculadas (taxa de inóculo ou *pitch rate*) (SILVA, 2019).

O período de tempo entre a inoculação da levedura e a detecção da emissão de gás carbônico no fermentador (lag time) é um indicador importante para se basear a saúde das leveduras e o vigor da fermentação, ele representa a combinação de vários processos pré fermentativos que relacionam bem a qualidade total da fermentação, sendo que separados esses processos não representam bem em relação ao tempo (PALMER, 2001).

Mesmo que a composição exata do mosto seja desconhecida, pode se estabelecer relação entre a assimilação das principais substâncias contidas no mosto pelas leveduras e os produtos gerados pelo metabolismo microbiano. Alterar a composição do mosto, modificando a relação carbono/nitrogênio, pode ser usada como uma estratégia para obtenção de mudanças desejáveis na fermentação (SILVA, 2019).

A maioria das cervejas são produzidas com *Saccharomyces cerevisiae*, mas existem estilos de cerveja que usam de outros microrganismos para realizar fermentações primária, secundária, mista ou selvagem. Sendo: *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Brettanomyces*, os mais conhecidos, eles se comportam diferentemente na presença de oxigênio e açúcares do mosto, além da temperatura (DAWSON, 2014 *apud* MORETTO, 2022).

O genótipo das cepas de leveduras é de grande importância para fermentação, todas leveduras cervejeiras têm capacidade de respiração limitada, mesmo assim seu metabolismo é sempre fermentativo. Por isso, a maior parte dos produtos metabolizados dos açúcares são etanol e gás carbônico, em que as concentrações máximas produzidas são determinadas pelo genótipo (SILVA, 2019).

### 2.5.1 Substrato

A composição nutricional do meio de propagação e do mosto são de extrema importância na fermentação, uma baixa concentração de compostos nitrogenados pode acarretar grandes problemas na fermentação. Quanto mais similar a composição do iniciador para as leveduras for do mosto a ser fermentado, melhor será a fermentação. O zinco na forma de seus sais, são importantes para o crescimento da levedura, porém quantidades maiores que 0,6 mg/L são tóxicas a mesma (SILVA, 2019).

### 2.5.2 Oxigenação Do Mosto

É o processo de dissolver o oxigênio nele, provendo o oxigênio que a levedura precisa para aumentar a taxa de crescimento. Ela precisa de oxigênio para sintetizar ácidos graxos e esteróis que são usados para formar a membrana celular, além de outras reações bioquímicas no interior da célula. Esta taxa de transferência de oxigênio é um fator limitante para propagar a levedura, pois estes compostos citados estão diretamente ligados com a atenuação da fermentação (SILVA, 2019).

### 2.5.3 Temperatura

As leveduras quando expostas a temperaturas além do seu intervalo adequado, geram características, que a depender do estilo podem ser favoráveis ou não. Em baixas temperaturas leveduras tendem a encolher, aumentando os ácidos graxos insaturados em sua membrana, o que induz uma redução no transporte de solutos para o interior da célula, sendo utilizado como uma forma de inativação das mesmas (SILVA, 2019).

### 2.5.4 pH

O pH é definido como a alcalinidade ou acidez de uma solução. Leveduras conseguem se multiplicar em pH ácido, mas são melhores em pH de 4 a 6. O mosto cervejeiro da maioria das cervejas que não são ácidas normalmente apresenta um pH entre 5,2 a 5,5 e a maioria das bactérias que o contaminam, são sensíveis a pH abaixo de 5. A maior parte das bactérias crescem mais dentro de pequenas variações de pH, próximas à neutralidade com pH entre 6,5 até 7,5. Poucas bactérias são capazes de crescer em pH 4, algumas bactérias acidófilas possuem altos graus de tolerância à acidez, estas sendo aplicadas para estilos de cervejas ácidas (SILVA, 2019).

### 2.5.5 Pressão Osmótica

A água realiza múltiplos papéis na biologia, mesmo não sendo um nutriente, ela é indispensável para o crescimento microbiológico. As bactérias se nutrem pela passagem das substâncias em solução na sua membrana citoplasmática. Além de ser o solvente universal, ela exerce função primordial na regulação térmica, graças ao seu alto calor específico. Em média, o conteúdo celular de água das bactérias é de aproximadamente 85%, esta pode sair por elevações na pressão osmótica. Quando bactérias se encontram em água destilada, meio onde a pressão osmótica é baixa, a água tende a entrar nas células podendo induzir a lise celular em microrganismos de parede celular fraca (SILVA, 2019).

## 2.6 CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO

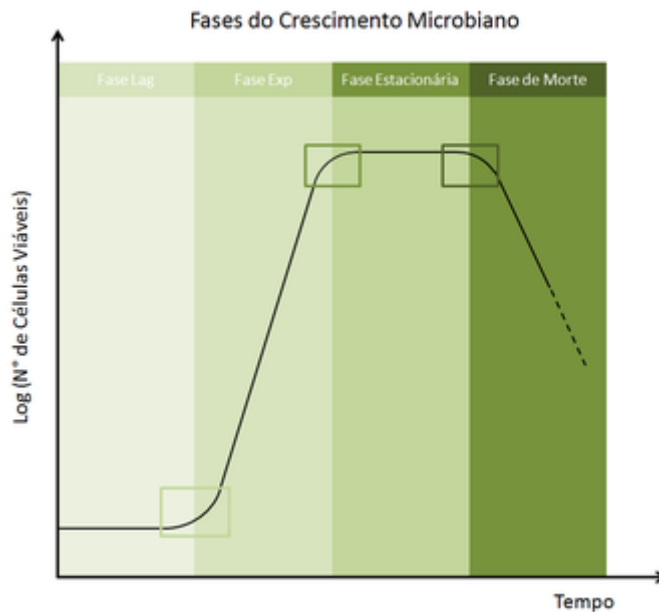
É um estudo que consiste em analisar a evolução do número dos componentes do cultivo em função do tempo. O microrganismo, seus produtos do metabolismo, substrato e nutrientes contidos no meio, são valores que permitem o traçado das curvas de ajuste (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

São necessários valores de um intervalo, que permitam definir o perfil de tais curvas para se obter um intermediário a análise adequada do fenômeno, o substrato limitante e o produto de interesse econômico geralmente são as variáveis escolhidas para o estudo. Estes dados são indispensáveis para o dimensionamento de uma produção, pois através deles se transpõem um experimento de laboratório para escala industrial (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O estudo da cinética também possibilita a comparação quantitativa entre cultivos apresentando diferentes condições de pH e temperatura, através dos dados de variáveis como: velocidades de transformação e fatores de conversão que são obtidos pelas curvas de ajuste. Porém os critérios de comparação são relativos ao que se almeja obter do processo, como por exemplo, se por razão econômica o tempo da fermentação for a parte mais relevante, a produtividade deve ser avaliada considerando isso (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Ao acompanhar um meio líquido com microrganismos em crescimento, enquanto a quantidade de nutrientes se mantém superior às suas necessidades e não havendo acúmulo de substâncias tóxicas, o aumento em número ou massa, ocorre exponencialmente na maioria dos casos, segundo uma progressão geométrica. Em processos descontínuos, as condições de crescimento não ficam ideais por muito tempo. Criando um gráfico geral de crescimento (Imagem 2) nesse tipo de cultura se observa quatro fases: fase de lag, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte (BORZANI *et al.*, 2001).

Imagem 2 - Curva de crescimento microbiano



Fonte: UNICAMP, 2022.

A fase lag se dá no momento que se inoculam as leveduras, onde elas crescem mais lentamente, devido a necessidade de biossintetizar novos componentes além de se adaptar ao novo meio. Na fase exponencial o crescimento é mais intenso e rápido, apresentando uma proporção exponencial, sendo o momento em que as células estão mais saudáveis e com funcionamento normal. Já na fase estacionária, a população chega ao tamanho máximo máximo, pois à medida que surgem novas células as anteriores morrem, não havendo crescimento da comunidade. A fase de morte é onde ocorre um decréscimo na concentração de células viáveis ao longo do tempo (UNICAMP, 2022).

## 2.7 ANÁLISE DE AMOSTRAS

A análise de cerveja inclui, entre outras, as determinações da densidade, grau alcoólico, acidez, teor de gás carbônico, extrato real, extrato aparente e extrato primitivo. O extrato real representa todos os sólidos que compõem a cerveja, este aumenta conforme a taxa de evaporação de água aumenta. O extrato aparente é o valor de extrato considerando a presença de álcool, sendo utilizado para aferições diárias do decorrer da fermentação e o extrato primitivo está relacionado com a quantidade de extrato presente no mosto inicial utilizado para fins de caracterização legal da cerveja (SPIESS, 2016).

Uma das metodologias mais utilizadas para quantificar leveduras, mede o crescimento em meio não sólido separando a biomassa do caldo de cultura. Centrifuga-se a amostra, então se lava com água para remover os sólidos solúveis do meio de cultura, por fim seca a biomassa em estufa a 105°C até chegar a um peso constante (GALVAGNO et al., 2010).

Na microbiologia mesmo sendo possível estudar o crescimento individual de organismos, na maioria das vezes o que se mensura é o crescimento de uma população, este nos sistemas biológicos é representado pelo acréscimo ordenado de todos os componentes de protoplasma, seja em massa total ou pelo número de indivíduos (BORZANI *et al.*, 2001).

Dentre os principais métodos para identificar o número de organismos de uma solução, estão a contagem do número total de indivíduos e a contagem de microrganismos viáveis.

As medidas de turbidez ou densidade óptica são obtidas pela determinação da quantidade de luz difratada em uma suspensão de células, pois as partículas pequenas difratam a luz proporcionalmente a sua concentração, sendo que a redução da quantidade de luz transmitida que passa pela suspensão de células é uma medida de densidade celular. Usa-se um espectrofotômetro na faixa de 550 nm de comprimento de onda, com 0.15 até 0.50 de absorbância (GALVAGNO et al., 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a taxa inóculo adequada da levedura liofilizada comercial Fermentis US-05 (França) para uma fermentação rápida do mosto cervejeiro acidificado biologicamente em escala industrial, de receita *Berliner Weisse* da Cervejaria 277 Craftbeer (Foz do Iguaçu).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o comportamento do pH durante a acidificação biológica e fermentação alcoólica das leveduras
- Verificar o comportamento do extrato aparente durante a fermentação alcoólica
- Quantificar as leveduras no decorrer da fermentação por pesagem de biomassa seca e contagem direta de leveduras e comparar as duas técnicas

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 PREPARO DO MOSTO

O mosto utilizado foi proveniente da receita de estilo "Berliner Weisse", fornecido pela cervejaria 277 Craft Beer, localizada em Foz do Iguaçu - PR, composto por 50% de malte pilsen e 50% de malte de trigo, ambos adquiridos da Cooperativa Agrária (Paraná). Após a brassagem, a gravidade original resultante medida no densímetro de massa específica a 20°C foi de 1034 e o pH foi de 4,59.

### 4.2 ACIDIFICAÇÃO BIOLÓGICA (PRÉ FERMENTAÇÃO)

Após a fervura do mosto, que não leva lúpulo em sua produção, este foi bombeado ao tanque passando pelo chiller de placas do equipamento através de tubulação de inox e mangueira de grau alimentício, reduzindo a temperatura do mosto para 37°C, sendo a temperatura ideal ao desenvolvimento de bactérias ácido lácticas. Nesta linha de transferência continha sistema que injetava 0,3 kg de pressão com gás carbônico, a fim de evitar a oxigenação do mosto.

Com o tanque contendo 1000 litros de mosto, para acidificar pela técnica rápida foram introduzidos quatro quilos de malte pilsen pela tampa superior, dessa forma os grãos de malte forneceram a carga microbiana presente na superfície de suas sementes para acidificar o mosto. Sendo utilizado malte pilsen armazenado do estoque de produção, envoltos em uma malha de tecido voil.

### 4.3 INTERRUPTÃO DA ACIDIFICAÇÃO BIOLÓGICA

Depois de 36 horas acidificando a 37°C, o mosto chegou ao pH de 3,54; adequado para o perfil de cerveja ácida, então o mosto foi bombeado para as tinas de mosturação e fervura da plataforma de produção, através do uso de mangueira alimentícia industrial, ao qual foi novamente fervido por 30 minutos com adição de 200 gramas de lupulo Barth Haas Hallertau Magnum (Alemanha), conforme a imagem 3.

Imagem 3 - Retorno do mosto acidificado para a tina de fervura.



Fonte: o autor.

A segunda fervura tem como função inativar os microrganismos que baixaram o pH do mosto, a fim de favorecer o crescimento das leveduras, além de eliminar compostos voláteis indesejáveis para este estilo de cerveja (SILVA, 2019).

#### 4.4 ARMAZENAMENTO DO MOSTO

Após a segunda fervura, o mosto novamente passou pelo trocador de temperatura, onde saiu com temperatura de 20°C. Nesta etapa foi coletado o mosto acidificado em barril de inox, conforme a figura 3. As amostras foram armazenadas em dois barris de inox 30 litros previamente limpos e sanitizados, através do uso da lavadora de barris automatizada.

Imagem 4 - Armazenamento do mosto acidificado



Fonte: o autor.

Os barris contendo o mosto foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  em container refrigerado, por 5 dias a fim de preservar suas características, até serem levados ao laboratório da Unila onde foram descongelados à temperatura ambiente, local onde foram realizadas as etapas seguintes.

#### 4.4 PREPARO DOS MINI FERMENTADORES

A fermentação foi acompanhada, através de 15 pequenos fermentadores que lotaram a capacidade da incubadora, sendo elaborados com baldes alimentícios iguais novos de 3200 ml, que receberam um furo lateral na altura de 3 centímetros do fundo do balde, adaptados com uma torneira de bebedouro plástica nova, para simular a saída de tanque fermentador de maior capacidade e um sistema de airlock adaptado (Imagem 4).

Imagem 5 - Baldes alimentícios utilizados na fermentação



Fonte: o autor.

A altura da torneira de coleta das amostras, foi posicionada para simular a posição do local de envase de barris e coleta de amostras em um tanque industrial.

O sistema do bloqueio de ar consistia em 33 centímetros de mangueira alimentícia que conectava a tampa de cada balde a tampa de uma garrafa 500 ml de água mineral contendo água até metade e com uma abertura lateral para saída de pressão.

Cada balde alimentício ficou durante 15 minutos submerso em solução de ácido peracético na concentração de 1% (v/v), então levados rapidamente ao fluxo laminar onde foram preenchidos com 2500 ml do mosto, através do uso de balões volumétricos de 1000 ml e 500 ml, que também foram previamente sanitizados na solução do ácido peracético pelas mesmas condições. Todo o sistema de extração de mosto do barril também foi sanitizado conforme o descrito, sendo a forma padrão de sanitização utilizada na indústria cervejeira.

#### 4.5 INOCULAÇÃO DAS LEVEDURAS

Para a inoculação foram utilizadas leveduras liofilizadas fermentis US-05 (França) que são indicadas para o estilo proposto, foram divididas em 4 tratamentos de quantidade de células, sendo calculada de acordo com a ficha técnica fornecida no site da empresa (ANEXO 1), sendo calculadas por peso seco de acordo com o valor fornecido pela ficha técnica que consta um mínimo de 6 bilhões de células por grama. Estes tratamentos foram repetidos em quadruplicata com exceção do tratamento 4 de maior dosagem que foi realizado apenas em triplicata devido a falta de espaço na incubadora.

As dosagens de fermento liofilizado foram definidas e calculadas através do site: <https://www.brewersfriend.com/yeast-pitch-rate-and-starter-calculator/> (Acesso em 15 de novembro de 2022), utilizando o valor de 6 bilhões de células por grama indicado na ficha técnica do fermentis US-05 (ANEXO 1) juntamente com a gravidade original do mosto, para determinar a razão da quantidade de milhões de células por ml por grau plato (Milhões de células/ml/°plato). As taxas foram determinadas pelo padrão fornecido no site para leveduras de alta fermentação, este padrão apresenta indicações quanto ao tipo de fermentação, a condição da levedura e a densidade do mosto. As dosagens definidas foram apresentadas na tabela 1, abaixo:

Tabela 1 - Definição das dosagens nos tratamentos:

Experimento	Peso de levedura liofilizada	Taxa de inóculo
Tratamento 1	• 2,5000 g	0,75 milhão de células / ml / ° plato
Tratamento 2	• 3,3333 g	1 milhão de células / ml / ° plato
Tratamento 3	• 4,1667 g	1,25 milhão de células / ml / ° plato
Tratamento 4	• 5,0000 g	1,5 milhão de células / ml / ° plato

Fonte = o autor.

O sistema para preenchimento dos baldes fermentadores, de padrão para chope foi todo sanitizado, a forma de sanitização consiste em deixar os equipamentos submersos em uma solução de água destilada com ácido peracético em 1% (v/v) por no mínimo 10 minutos. O sistema de chope é composto pelo barril de inox contendo o mosto a temperatura ambiente, válvula extratora padrão S, torneira de chope italiana e cilindro de gás carbônico regulado na pressão de 2 kgf/cm<sup>2</sup>, todos estes interligados por mangueiras e conexões alimentícias DM fit (Coréia do Sul).

A pesagem do fermento para as diferentes dosagens foi feita em balança analítica com precisão de 4 casas decimais, em placas de Petri autoclavadas que foram tampadas e imediatamente levadas ao fluxo laminar, sendo a inoculação feita de maneira aleatória nos baldes, sendo todos identificados de acordo com a dosagem e repetição. Todos os 15 baldes fermentadores, foram mantidos em refrigeração na incubadora B.O.D. modelo SL - 200/300 (Solab científica), colocados em posições aleatórias dentro do equipamento, sob temperatura de 20°C indicada na ficha técnica, durante 6 dias. Sendo retirados do equipamento apenas uma vez ao dia para coleta de 100 ml como amostra de cada balde fermentador.

#### 4.6 EXTRATO APARENTE

Para avaliar o desenvolvimento da fermentação utilizamos a metodologia do extrato aparente com densímetro de massa específica a 20°C, onde 100 ml de cada balde foi coletado com uso de proveta sendo transferido para Erlenmeyer de 250 ml, onde foram agitados a fim de descarbonatar o líquido.

Em seguida o conteúdo retornou a proveta, então foi aferido o menisco em que o densímetro apresentou para cada amostra sob a temperatura de 20°C.

#### 4.7 PH

O procedimento utilizado para analisar o pH das amostras foi realizado com medidor de pH modelo mPA 210 MS (Tecnoyon instrumentação), sendo utilizados os mesmos 100 ml avaliados no extrato aparente, a fim de não consumir muito material dos fermentadores. O aparelho foi calibrado com tampões a temperatura ambiente a cada dia de uso, as amostras foram medidas duas vezes, sendo apresentado a média aritmética.

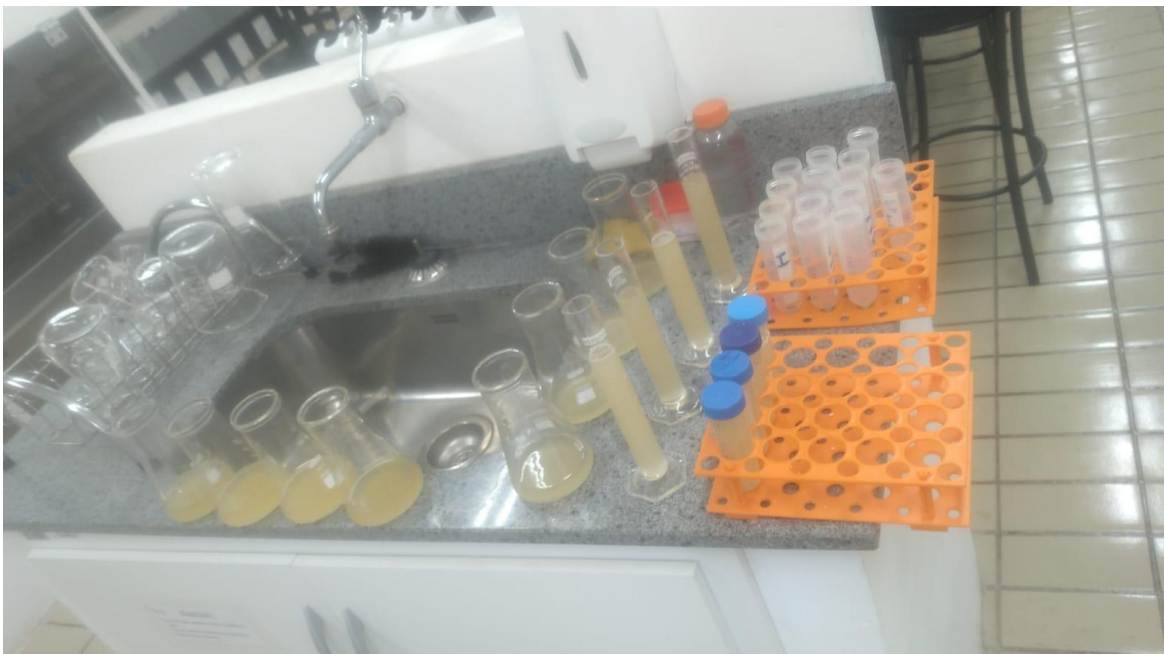
#### 4.8 PESO DE BIOMASSA SECA

Para avaliar a biomassa sólida, foi coletado amostra dos Erlenmeyers que foram aferidos os valores de pH, sendo utilizado proveta de 50 ml para quantificar o volume (imagem 6) e estes transferidos aos tubos falcon de mesma capacidade. Os tubos foram previamente autoclavados e pesados, sendo anotado no próprio frasco sua massa antes de receber a amostra.

Os tubos devidamente tampados foram centrifugados por centrífuga refrigerada modelo SL - 701 (Solab Científica), configurada para 6000 RPM em 14°C durante 10 minutos, sendo um minuto de aceleração e um de desaceleração. Seu tambor para tubos falcon de 50 ml com capacidade para 8 frascos, possuía uma distância de 116 milímetros de raio.

O sobrenadante foi retirado e os tubos contendo pellet foram secos em estufa a 70°C durante 24 horas, após isto foram pesados e a média apresentada no gráfico 3.

Imagem 6 - Preparo de tubos falcon para centrifugação



Fonte: o autor.

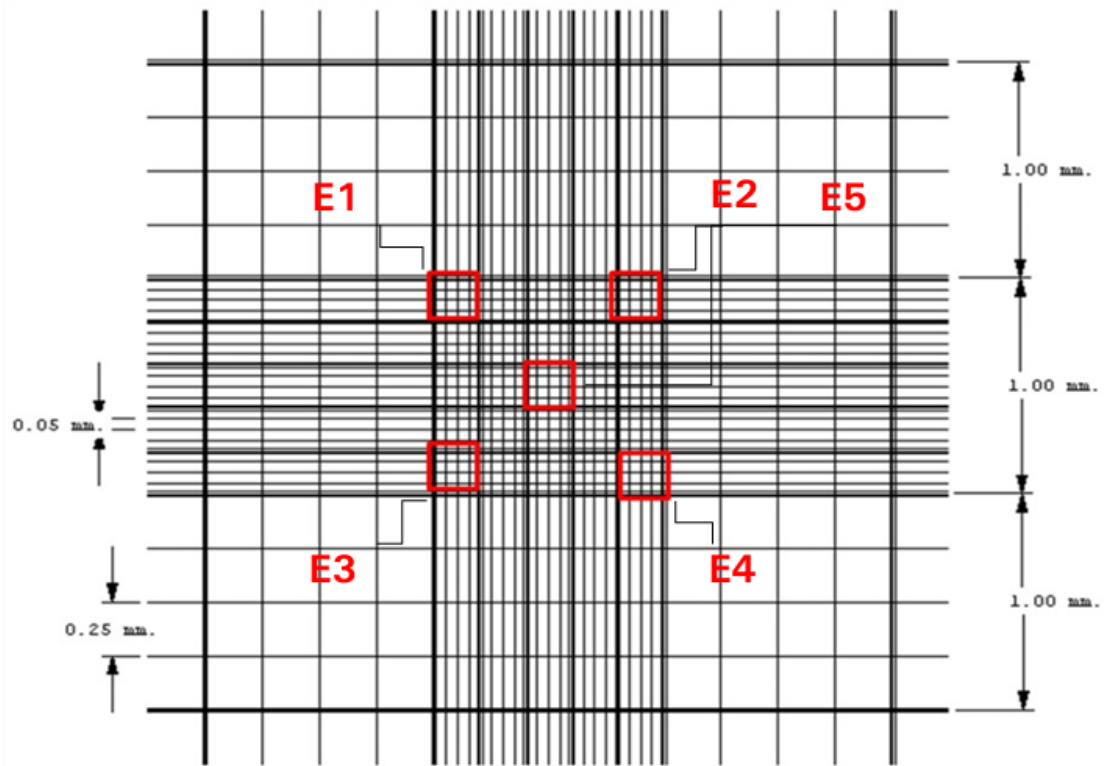
#### 4.9 CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS TOTAIS

A contagem das leveduras foi realizada utilizando câmara de Neubauer espelhada, conforme a metodologia descrita pela Dra. Gabriela Muller no módulo 3 do curso de mestre cervejeiro. Foi utilizado parte das amostras que não foram armazenadas nos tubos falcon para pesagem de biomassa seca. Em todas etapas de coleta dos dados, os Erlenmeyers contendo mosto em fermentação foram agitados moderadamente, a fim de manter as amostras homogêneas.

Com uso de micropipetas de volume fixo, a diluição para a contagem foi preparada usando 1 ml de amostra com 1 ml de água destilada autoclavada, inserida em tubo de ensaio autoclavado. Cada tubo foi agitado em vortex modelo NA 3600 (Norte Científica) por 30 segundos, então, rapidamente coletado 100 microlitros e aplicados na câmara de Neubauer, aguardou-se 1 minuto e foi feita a contagem.

Pela metodologia usada, o quadrante maior do centro da câmara, que é subdividido em 25 quadrados menores, como mostra a imagem 5, foi analisado para a presença de células de leveduras. Na forma de contagem realizada, foram contabilizados 5 dos 25 quadrados menores (Imagem 7), sendo os 4 cantos e o quadrado central.

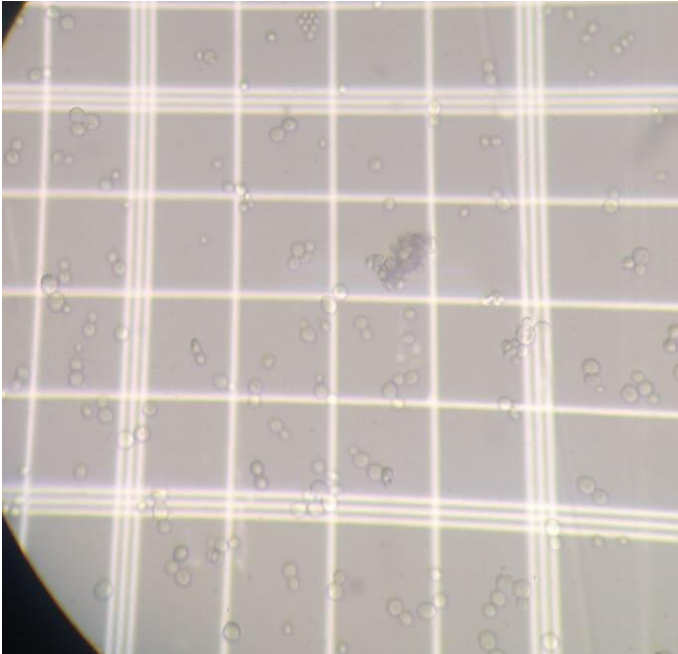
Imagem 7 - Áreas E1, E2, E3, E4, E5 utilizadas na contagem pela câmara de Neubauer



Fonte: BETTIOL, 2012.

Foi levado em consideração apenas células que tangenciam em 2 laterais do perímetro de cada quadrante, além das que estavam contidas dentro, de forma que todos os núcleos claramente visíveis foram considerados nos grumos e os brotamentos em divisão que possuíam ao menos metade do tamanho da célula mãe (Imagem 8).

Imagem 8 - Visualização obtida no microscópio de amostra para contagem



Fonte: o autor.

Para determinação do total da quantidade de células por ml, foi aplicado a fórmula:

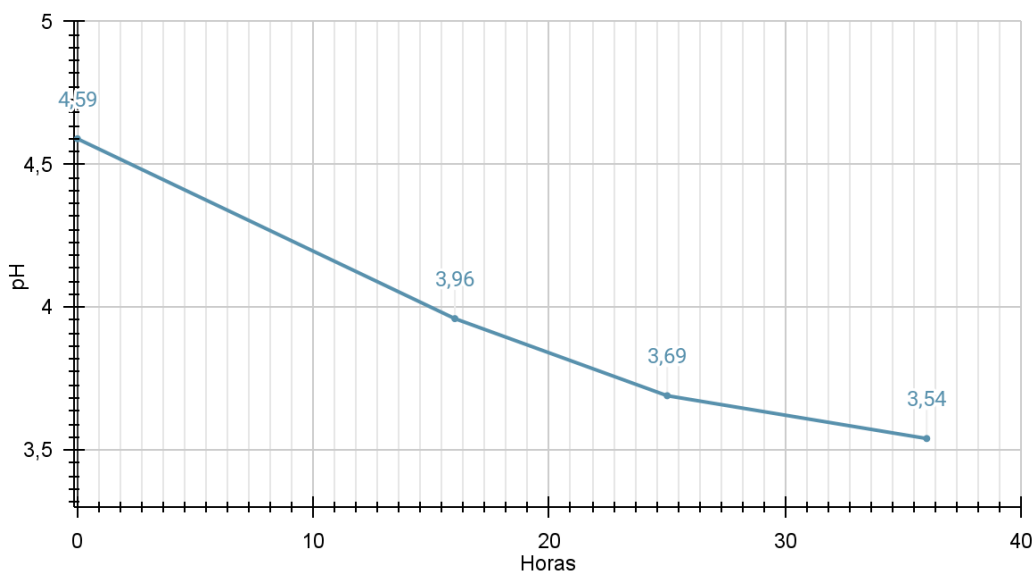
$$\text{células/ml} = n^{\circ} \text{ células contadas} \times 5 \times \text{fator de diluição} \times 10000$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ACIDIFICAÇÃO BIOLÓGICA

Logo após a inoculação dos quatro quilos de malte no tanque contendo os 1000 litros de mosto, se deu início a contagem do tempo para verificar a queda do pH na pré fermentação, os dados coletados possibilitaram a criação do gráfico abaixo:

Gráfico 1 - Acidificação biológica do mosto a 37°C



Fonte: o autor.

O procedimento de acidificação do mosto ocorreu em menos de 48 horas, na produção industrial a primeira aferição de pH é realizada após mais de 12 horas da inoculação do malte contendo as bactérias de sua flora natural. O acompanhamento da redução de pH normalmente é feito apenas por coleta de amostra e aferição com aparelho pHmetro, sem disponibilizar a composição e a quantidade dos microrganismos envolvidos no processo.

Referente ao malte que é utilizado como inóculo de lactobacillus para acidificação do mosto, o processo de maltagem consiste em maceração, germinação e secagem. Sendo que após a maceração, células de microrganismos rapidamente se multiplicam no grão e na água utilizada devido às condições ambientais que favorecem a proliferação devido às condições que estão impostas (BOKULICH & BAMFORTH, 2013).

Existem microrganismos que prejudicam a qualidade do malte durante a germinação, pois alguns competem por oxigênio com o embrião inibindo a germinação, entretanto Alexander Mauch e seus colaboradores demonstraram que a adição de bactérias ácido lácticas apresentaram uma diminuição no crescimento de radículas da semente, reduzindo a perda de produto durante a maltagem (MAUCH *et al.*, 2011).

O'Sullivan e colaboradores estudaram a microflora de maltarias e cervejarias, descreveram que durante o processo de maceração do malte a carga microbiana diminui, porém microrganismos termotolerantes em especial bactérias ácido lácticas homofermentativas permanecem ativas por ser um ambiente favorável às mesmas, sendo rico em nutrientes e umidade (O'SULLIVAN *et al.*, 1999).

Lowe e colaboradores pesquisando a acidificação biológica de mosto, avaliaram que o crescimento bacteriano durante a maceração do malte, uma etapa do processo de maltagem, pode ter efeitos benéficos, pois a acidificação da maceração através de bactérias do ácido láctico melhora a extração de açúcares durante a brassagem, a fermentabilidade do mosto, o rendimento de nitrogênio do mosto, a estabilidade de espuma, a cor e o sabor da cerveja (LOWE *et al.*, 2005).

Em uma pesquisa para um método de enumeração de *Lactobacillus* sp., Matthew Hodgkin e seus colaboradores utilizaram citometria de imagem para acompanhar a produção por *kettle sour*. Nesse método utilizaram marcadores fluorescentes verde Syto BC e Syto 9 para determinar as concentrações totais de *L. plantarum*, *L. brevis* e *L. bulgaricus*. Para validar a citometria os resultados foram comparados diretamente por contagem de placas, os resultados das contagens foram multiplicados em cada diluição para obter a concentração original da cultura estoque resultando em diferenças estatisticamente insignificantes entre os métodos de contagem (HODGKIN *et al.*, 2020).

Dessa forma, para aplicar a técnica de kettle sour em estudos posteriores se torna interessante uma metodologia de análise da acidificação que entregue mais informações da quantidade das bactérias durante o processo, principalmente quando se trata de um inóculo desconhecido como o caso dos quatro quilos de malte que forneceram os microrganismos que acidificaram o mosto deste estudo. Assim, a citometria e apresentara uma forma de avaliar mais detalhadamente a acidificação, permitindo um controle mais exato e instantâneo para tomada de decisão quanto a qualidade e a padronização do mosto acidificado.

## 5.2 EXTRATO APARENTE

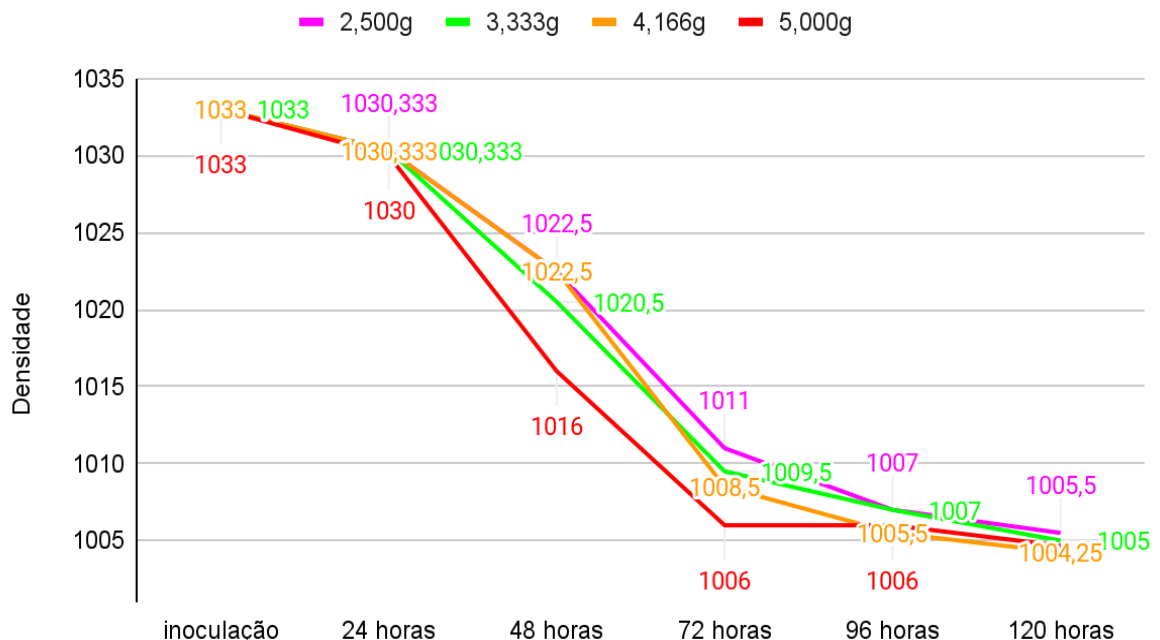
As 15 amostras foram aferidas a cada 24 horas ao longo de 120 horas, então foi elaborado o gráfico 2. Neste gráfico, cada ponto da linha apresenta a média aritmética dos valores coletados em cada dosagem. Ao final da fermentação as diferentes dosagens apresentaram extrato conforme a tabela abaixo:

Tabela 3 - Extrato final medido pelo densímetro de massa específica.

Experimento	Média da gravidade final pelo densímetro a 20 °C
Tratamento 1 (2,500g)	1005,5
Tratamento 2 (3,333g)	1005,0
Tratamento 3 (4,166g)	1004,25
Tratamento 4 (5,000g)	1004,66

Fonte: o autor.

Gráfico 2 - Média do extrato aparente nas diferentes dosagens.



Fonte: o autor.

Ao final da fermentação, as cervejas renderam um teor alcoólico muito próximo, em torno de 3,7% (V/V). Sendo que o tratamento com maior dosagem de fermento (tratamento 4) finalizou a fermentação primeiro em torno de 72 horas.

Entretanto, o tratamento com a segunda maior dosagem de US-05 (tratamento 3) resultou em uma densidade final mais baixa em relação aos outros.

O tratamento 1 em que foi inoculado a menor dose de US-05 apresentou extrato aparente igual aos outros até o tempo de 24 horas, então as 48 horas de fermentação ainda se manteve igual ao tratamento com a segunda maior dosagem de fermento (tratamento 3).

Após isto o tratamento 1, fermentou mais lentamente em relação aos outros tratamentos, de acordo com as amostragens feitas no decorrer do tempo.

A dosagem de 3,3333 g de US-05 apresentou a segunda maior queda na densidade do mosto, pela verificação de extrato aparente até o momento de 48 horas de fermentação, então foi passado pelo tratamento 3 que continha uma dosagem superior que a sua (4,1667 g), entre as 48 e 72 horas em diante

Lorenzo Peyer e colaboradores em seu estudo verificaram que o crescimento de leveduras US-05 em mosto acidificado foi retardado de 2 a 4 dias, além disso, as contagens de células foram menores em comparação a um mosto controle não acidificado, sendo que atenuações semelhantes entre si foram encontradas. Ademais, verificaram que a qualidade final das cervejas variou consideravelmente a depender da forma de acidificação aplicada no mosto, segundo eles, a acidificação do mosto através de *Lactobacillus amylovorus*, gera uma cerveja brilhante com pequenas falhas organolépticas (PEYER *et al.*, 2017).

Ainda neste estudo, verificaram que em um tratamento específico no qual adicionaram novamente BAL junto com as leveduras, houve um certo crescimento bacteriano nos três primeiros dias, entretanto não chegou fornecer uma acidificação adicional, indicando que atividade das bactérias foi limitada durante a fermentação alcoólica. Por fim, o tratamento controle que não foi acidificado, obteve a maior variação no ph, devido a liberação de subprodutos ácidos e remoção de compostos tamponantes, além disso, o tratamento controle foi que obteve maior velocidade na redução do teor de extrato e maior número de células de leveduras (PEYER *et al.*, 2017).

O estudo de Anna Dysvik e colaboradores concluiu que as BAL pré acidificando o mosto, contribuem além de apenas a produção de ácido láctico para as características sensoriais da cerveja tanto para compostos voláteis como para ácidos orgânicos, porém este benefício não supera o da acidificação química. Neste estudo, ao que se trata do crescimento microbiano, não detectaram BAL em nenhum

experimento após fervura, em um tratamento que ocorria acidificação a taxa de BAL caiu pela metade quando adicionado mosto altamente lupulado e levedura US-05, porém não conseguiram definir se esta queda na viabilidade foi ocasionada pela depleção de aminoácidos essenciais, competição por nutrientes, pH reduzido, aumento de etanol ou a introdução de lúpulo. Neste estudo, assim que inoculadas as leveduras, detectaram queda na contagem quantidade de unidades formadora de colônia (CFU) para todos os tratamentos (DYSVIK *et al.*, 2019).

Devido a estes conhecimentos experimentais se define que a forma da aplicação da metodologia de acidificação rápida, seja em escala industrial ou caseira, que busca uma fermentação mais eficaz se inicia elaborando um mosto que seja propenso a acidificação com o uso de bactérias do ácido lático, seguido de uma fervura quando se atinge o pH desejado ao paladar. Então, se trabalha neste mosto como se estivesse preparando uma receita de cerveja mais comum em que se fermenta com leveduras para geração de etanol. Ao final temos uma produção em que ocorreram duas fervuras e duas fermentações, sendo a acidificação conhecida no meio cervejeiro como pré fermentação.

Outro estudo de Anna Dysvik e colaboradores, realizando testes com *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. buchneri* em pequena e grande escala, observaram que houve taxa de crescimento e redução de pH mais rapidamente em fermentações com temperatura mais elevada, mas isto não influenciou no valor de pH final, além disso, verificaram que o desempenho de *L. brevis* parece ser mais robusto em diferentes condições estressoras, em comparação com os outros dois lactobacilos. De acordo com eles, a presença de iso alfa ácidos foi o fator mais estressante entre os investigados, sendo que *L. brevis* era mais resistente a isso também devido a presença dos genes *hitA*, *horA* e *horC*, que são diretamente relacionados à resistência ao lúpulo (DYSVIK *et al.*, 2020).

Ainda neste trabalho, nos resultados dos testes com múltiplos estressores, determinaram que *L. buchneri* não é recomendável para fermentação de cerveja ácida na presença de estressores, principalmente os iso alfa ácidos do lúpulo, pois gerou uma alta produção de diacetil indesejado, entretanto poderia ser utilizada pela técnica kettle sour que é realizada mediante estresses reduzidos. Por fim, concluíram que a co fermentação controlada de *S. cerevisiae* (US-05) e *L. plantarum* que é vulnerável aos estresses, poderia gerar uma cerveja azeda em 21

dias, sendo um produto com maior intensidade de sabor total, odor total e sabor de frutas secas (DYSVIK *et al.*, 2020).

## 5.2 PH

Entre a aferição de pH do mosto, no momento que se interrompe a acidificação biológica o transferindo para a fervura, e, o instante em que se inoculam as leveduras para os tratamentos onde novamente se realiza medição do pH, verifica-se uma redução de quatro décimos no valor de pH, que passou de 3,54 para 3,13. Podendo ser um indicativo de, mesmo após a fervura, as bactérias não foram completamente inativadas e continuaram a reduzir o pH do mosto durante esse período.

Todas as 15 amostras foram verificadas diariamente quanto ao pH, sendo agrupadas conforme o tratamento, então, com a média apresentada dos valores, foi possível elaborar a tabela 2, abaixo:

Tabela 2 - Média do pH das amostras no decorrer da fermentação.

Tratamento	Inoculação	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
2,5000 g	pH = 3,13	pH = 3,185	pH = 3,192	pH = 2,875	pH = 2,940	pH = 2,998
3,3333 g	pH = 3,13	pH = 3,180	<b>pH = 3,178</b>	pH = 2,852	pH = 2,938	pH = 2,988
4,1667 g	pH = 3,13	pH = 3,170	pH = 3,195	pH = 2,848	pH = 2,925	pH = 2,988
5,0000 g	pH = 3,13	pH = 3,140	<b>pH = 3,086</b>	pH = 2,850	pH = 2,940	pH = 2,993

Fonte: o autor.

As 24 horas de fermentação todos os tratamentos apresentaram um aumento no valor de pH aferido, sendo que foi notado uma relação: quanto menor a dosagem de fermento maior ocorreu um acréscimo nestes valores.

As 48 horas de fermentação, os dois tratamentos que apresentaram uma queda maior no valor de extrato aparente aferido (tratamento 2 e 4), sendo mais rápidos na fermentação, apresentaram uma pequena queda no valor de pH em relação ao que havia sido medido às 24 horas. Já os outros dois tratamentos (tratamento 1 e 3), que apresentaram uma queda mais lenta no valor de extrato aparente, apresentaram um pequeno aumento no valor de pH em relação ao que foi aferido as 24 horas.

No momento das 72 horas de fermentação, todas as amostras tiveram uma queda significativa no pH, baixando o valor para casa decimal de 2,8. Sendo assim, que pela média dos valores aferidos o tratamento com menor dosagem de US-05 manteve o pH mais alto entre eles (2,875) e o tratamento 3 que gerou a gravidade final mais baixa ao final da fermentação, apresentou o pH mais baixo entre eles neste momento.

Quando estavam em 96 horas de fermentação, houve uma subida de uma casa decimal nos valores aferidos, todos passando para casa de 2,9. Porém o tratamento 3, que por fim resultou na cerveja de FG menor, se manteve mais ácida e os outros tratamentos apresentaram valores muito próximos de pH entre si.

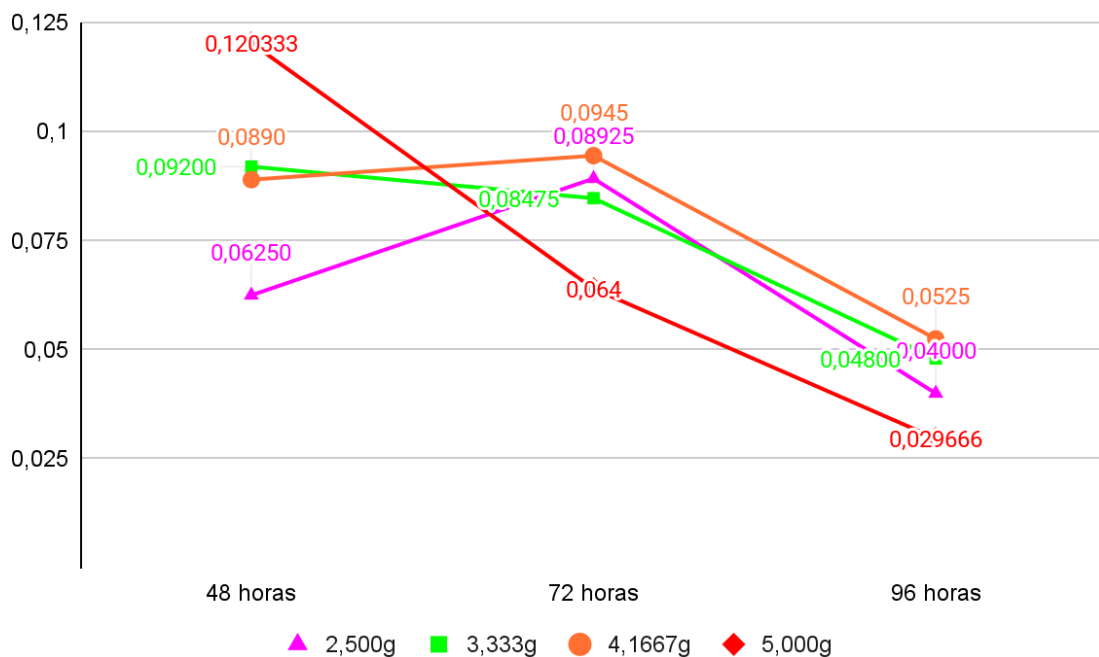
Na última medição de pH, as 120 horas, todos os tratamentos apresentaram valores muito próximos de pH entre si, diferenciando-se apenas por um número, na casa centesimal.

### 5.3 BIOMASSA SECA E CONTAGEM DE LEVEDURAS

Para estas análises, foi possível apenas verificar o intervalo de tempo de 48 a 96 horas, devido a dificuldades na implantação das técnicas de quantificação. Entretanto, a representação dos gráficos obtidos pelas duas técnicas (gráfico 3 e 4) apresenta similaridade. A contagem direta de leveduras e a pesagem de biomassa seca diminuíram ao decorrer da fermentação, devido a posição do local de coleta das amostras. Além disso, os valores entre as duas metodologias de quantificação não foram totalmente proporcionais.

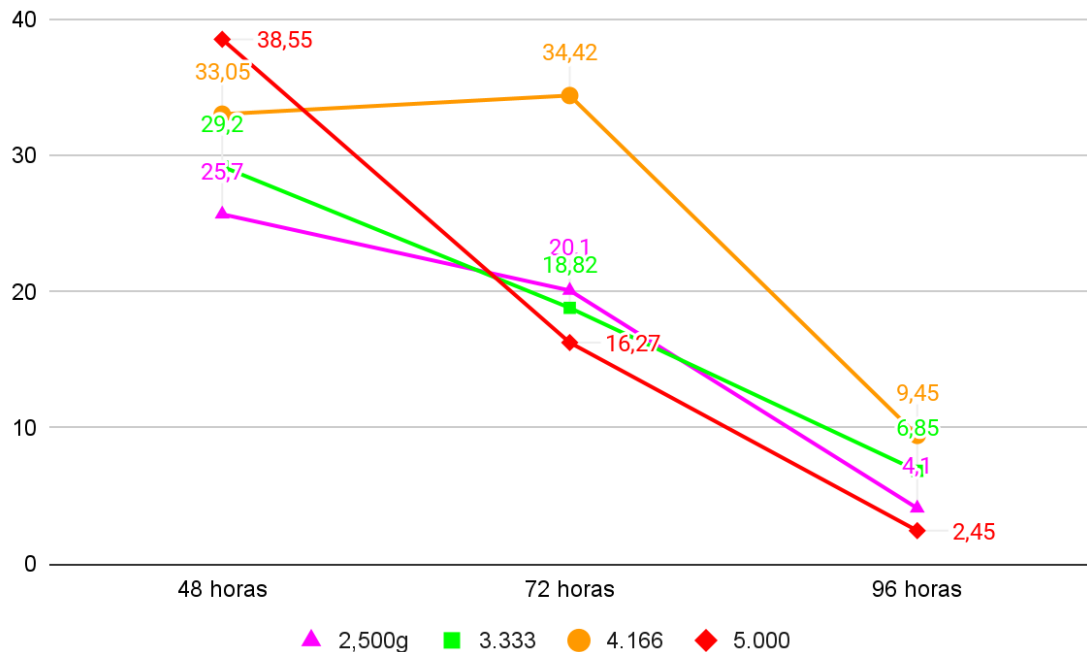
O gráfico 3 apresenta os valores obtidos pela centrifugação dos 50 ml de amostra da cerveja, em que foi descartado o sobrenadante e o tubo falcon dessecado em estufa. Já o gráfico quatro apresenta a contagem direta em câmara de Neubauer da amostra coletada ao mesmo instante.

Gráfico 3 - Média do peso seco de biomassa em gramas no período entre 48 e 96 horas.



Fonte: o autor.

Gráfico 4 - Média da contagem de leveduras em milhões por mililitro do período entre 48 e 96 horas.



Fonte: o autor.

No momento de 48 horas de fermentação, os tratamentos 2 e 3 que tiveram as dosagens de inóculo intermediárias de US-05, apresentaram valores muito próximos entre si, e consideravelmente distante das dosagens máxima e mínima de fermento do experimento, pela metodologia de pesagem de biomassa seca. Já os valores apresentados pela metodologia de contagem direta de leveduras, manteve uma distância uniforme entre eles, de acordo com o gráfico, seguindo a proporcionalidade de maior dose resultando em mais células verificadas. Dessa forma a metodologia de contagem direta de leveduras totais, aparentemente gera dados mais confiáveis da amostra em análise.

Em 72 horas de fermentação, a coleta de dados manteve uma mesma ordenação de posições dos tratamentos nas duas metodologias de quantificação, porém não havia proporcionalidade entre os dois gráficos (3 e 4). Foi observado que o tratamento 4 que possuiu a maior dosagem de fermento, passou da posição de maior contagem e pesagem do período analisado anterior, para a menor contagem e pesagem desse momento de análise, tempo este em que, no gráfico 2, de extrato aparente, constava o final de sua fermentação. O que pode indicar que as leveduras migraram para o topo do fermentador devido à escassez de açúcares fermentescíveis.

Ainda no intervalo de 72 horas foi detectado a maior quantidade de leveduras contadas e pesadas no tratamento 3, dosagem esta que resultou na gravidade final mais baixa conseqüentemente gerando mais álcool, o que indica ser a taxa com maior taxa de conversão, de acordo com o estudo. E os tratamentos 1 e 2, que tiveram as duas menores dosagens de inóculo, se mantiveram no intermédio do gráfico pelas duas metodologias.

As 96 horas de fermentação, no último momento em que se coletou amostras para as metodologias de contagem e pesagem, os dois gráficos apresentaram a mesma ordem e distância relativamente proporcional dos tratamentos. Havendo apenas uma inversão nas posições dos tratamentos 1 e 2 que mantinham posição intermediária pela análise do período anterior. O tratamento que já havia finalizado a fermentação se manteve com menor contagem e peso de biomassa, e o tratamento que obteve o maior rendimento fermentativo apresentou maior contagem e peso de biomassa.

Aneta Ciosek e colaboradores realizaram um trabalho, que comparou a ordem de inoculação em *Lactobacillus brevis* WLP672 e leveduras US-05, além da inoculação simultânea das mesmas, verificaram que a utilização de açúcares por parte das bactérias, mesmo sendo heterofermentativas, para produção de gás carbônico, foi insignificante em comparação com a produção de gás pelas leveduras. Ademais, verificaram que quando inoculadas simultaneamente bactérias e leveduras, a fermentação ocorria mais rapidamente, em comparação a fermentações no qual as bactérias foram inoculadas alguns dias após as leveduras. Estas pesquisas fornecem as informações que são repassadas no meio cervejeiro de um mestre ao outro, que levam a elaborar metodologias de produção como a utilizada neste trabalho, no qual primeiramente se deve introduzir bactérias para após sua acidificação serem inoculadas as leveduras para produção de álcool (CIOSEK *et al.*, 2019).

Ainda, eles concluíram que as leveduras, quando são adicionadas alguns dias após as bactérias, a fermentação termina primeiro que nas outras duas formas de inoculação, sugerindo que as bactérias tiveram um efeito sinérgico nas leveduras. Sendo esta a forma mais vantajosa de se obter uma cerveja ácida, como foi realizado este experimento, sendo algo já conhecido pelos cervejeiros profissionais. Na pesquisa de Ciosek e colaboradores, não verificaram atraso no crescimento ou diminuição da contagem de leveduras devido a acidificação do meio. Porém

verificaram que, em todos os ensaios no qual as leveduras foram adicionadas dias antes das bactérias, o pH final foi mais alto (próximo a 4) que, no ensaio ao qual as duas foram adicionadas simultaneamente (próximo a 3,7). Por fim, ainda verificaram que as cervejas em que foram adicionadas bactérias dias antes das leveduras, consumiram menos extrato real e conseqüentemente produziram um teor alcoólico menor, algo que demonstra uma necessidade de uma maior taxa de inóculo para estes tipo de cerveja em relação a cervejas que não contém bactérias, caso a necessidade seja a obtenção de um grau alcoólico proporcional (CIOSEK *et al.*, 2019).

## 6 CONCLUSÕES

Ao final desse experimento, a partir dos dados obtidos, concluímos que a maior taxa de inóculo, correspondente a 1,5 milhões de células por ml a cada grau, forneceu a fermentação mais veloz, sendo praticamente completada em 72 horas, assim, esta taxa se torna mais interessante para a escala industrial.

O pH final de todas as dosagens foi praticamente o mesmo, foi percebida uma ligeira queda no pH estando correlacionada com o ritmo da fermentação que possivelmente seja resultado da produção de gás carbônico por parte das leveduras, este que acaba por gerar ácido carbônico no meio.

A metodologia de contagem de leveduras foi mais simples e eficaz na produção de resultados, sendo preferível em relação à pesagem de biomassa seca centrifugada.

## 7 REFERÊNCIAS

AGRÍCOLA, Repositório Público da Faculdade de Engenharia. **Crescimento Microbiano, 2022**. Disponível em: [https://wiki.feagri.unicamp.br/doku.php?id=fa733:crescimento\\_microbiano](https://wiki.feagri.unicamp.br/doku.php?id=fa733:crescimento_microbiano). Acesso em: 13 maio 2023.

AKA, Solange *et al.* Characterization of lactic acid bacteria isolated from a traditional Ivoirian beer process to develop starter cultures for safe sorghum-based beverages. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 322, p. 108547, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108547>.

ALMEIDA, Ana Filipa F. **Estudo da aplicação de diferentes culturas microbiológicas na produção de cerveja artesanal**. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Minho, Escola de engenharia, Mestrado integrado em engenharia biológica/ ramo tecnologia química e alimentar, Braga, p. 81, 2017.

ANTÔNIO, William Faria. **INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTIRPES DA *Saccharomyces cerevisiae* NA FERMENTAÇÃO DA CERVEJA**. 2021. 40 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Farmácia, Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Gama, 2021.

AQUARONE, E. *et al.* Biotecnologia industrial. Volume 4, Biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo, SP. Edgard Blucher, 2001.

ASSIS, Higo Moreira de *et al.* CERVEJA ARTESANAL: componentes e processos produtivos. **Inovação, Gestão e Sustentabilidade na Agroindústria**, Recife, p. 113-132, jul. 2021. Instituto Internacional Despertando Vocações. <http://dx.doi.org/10.31692/978-65-88970-19-5.113-132>.

BARRETO, Rafael Amadeu. **Avaliação do uso de grãos de kefir para a realização do kettle sour em mosto cervejeiro**. 2022. 35 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2022.

BETTIOL, Wagner *et al.* **Avaliação da qualidade de produtos à base de Trichoderma**. Jaguariúna: Embrapa, 2012. 44 slides, color.

BIO4 (Curitiba). **Como fazer kettle sour em 12 passos**. 2017. Disponível em: <http://bio4.com.br/como-fazer-sour-beers-em-12-passos/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

BORZANI, Walter *et al.* Biotecnologia industrial. Volume 1, Fundamentos. São Paulo, SP. Edgard Blucher, 2001.

BOSSAERT, Sofie; CRAUWELS, Sam; ROUCK, Gert de; LIEVENS, Bart. The power of sour – A review: old traditions, new opportunities. **Brewingscience**, Nuremberg, n. 72, p. 78-88, 30 abr. 2019. Fachverlag Hans Carl GmbH. <http://dx.doi.org/10.23763/BrSc19-10bossaert>.

BRITO JÚNIOR, Marcello Rocha de. **Elaboração e caracterização de cerveja com polpa do fruto da Juçara (*Euterpe edulis* Mart.)**. 2020. 67 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

BUHRMANN, Jurgen. **Craft Bier Trend - Cervejas Sour**. In: AGRÁRIA WORKSHOP BRASIL, 2017.

BOKULICH, Nicholas A.; BAMFORTH, Charles W.. The Microbiology of Malting and Brewing. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 77, n. 2, p. 157-172, jun. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mnbr.00060-12>.

CALLAWAY, Ellen. The Beer Geeks: a lab in belgium is using genetics to make a perfect beer yeast. **Nature**. Berlim, p. 484-486. Jul. 2016.

CARDOSO, Marina Passos Soares *et al.* DESENVOLVIMENTO DE DUAS FORMULAÇÕES BASE DE CERVEJA ESTILO SOUR EMPREGANDO KEFIR E KOMBUCHA NA FERMENTAÇÃO. **Brazilian Journal Of Development**, São José dos Pinhais, v. 7, n. 1, p. 5616-5628, 2021. Brazilian Journal of Development. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n1-382>.

CARVALHO, Giovani Brandão Mafrá de *et al.* ELEMENTOS BIOTECNOLÓGICOS FUNDAMENTAIS NO PROCESSO CERVEJEIRO: 1º PARTE – AS LEVEDURAS. **Revista Analytica**. São Paulo, p. 36-42. Out. 2006.tooo

CERVBRASIL, associação brasileira da indústria cervejeira: Breve histórico. Disponível em: [http://www.cervbrasil.org.br/novo\\_site/a-cerveja-historia/](http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/a-cerveja-historia/). Acesso em: 11 de jan. 2023.

CHIARA, Matteo de; BARRÉ, Benjamin P.; PERSSON, Karl; IRIZAR, Agurtzane; VISCHIONI, Chiara; KHAIWAL, Sakshi; STENBERG, Simon; AMADI, Onyetugo Chioma; ŠUN, Gašper; DOBERLEK, Katja. Domestication reprogrammed the budding yeast life cycle. **Nature Ecology & Evolution**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 448-460, 24 fev. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-022-01671-9>.

CIOSEK, Aneta *et al.* Sour beer production: impact of pitching sequence of yeast and lactic acid bacteria. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 126, n. 1, p. 53-58, 6 nov. 2019. The Institute of Brewing & Distilling. <http://dx.doi.org/10.1002/jib.590>.

CLEMENTE-JIMENEZ, J.M. *et al.* Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 98, n. 3, p. 301-308, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.007>.

COELHO NETO, Dorval; MOREIRA, Laysa; CASTRO, Eustáquio; SOUZA, Warley; FILGUEIRAS, Paulo; ROMÃO, Wanderson; FOLLI, Gabriely; LACERDA, Valdemar. ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE CERVEJAS BRASILEIRAS: uma avaliação entre as bebidas artesanais e industriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 518-530, 2022. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170857>.

COLPO, Iliane *et al.* CONTROLE ESTATÍSTICO DE PROCESSOS COMO ESTRATÉGIA DE GESTÃO: A BUSCA DA QUALIDADE EM CERVEJARIAS ARTESANAIS. **Gestão Contemporânea**. [S.L.], p. 1-27. nov. 2021.

COSTA, Gabriel de Alencar. **DESAFIOS DO MERCADO DE CERVEJAS ARTESANAIS**. 2022. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

DALMORO, Marlon; FELL, Guilherme. DIMENSÕES ARTESANAL E MASSIFICADA NA CONSTRUÇÃO DO MERCADO CERVEJEIRO. **Revista de Administração de Empresas**, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 47-58, fev. 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-759020200106>.

DEZORDI, Ana Paula da Rosa. **GESTÃO ESTRATÉGICA DE CUSTOS NO SEGMENTO DE MICROCERVEJARIAS ARTESANAIS**: variáveis de precificação do produto. 2021. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento Regional, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Desenvolvimento Regional, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2021.

DONG, Jian-Jun *et al.* Predictive analysis of beer quality by correlating sensory evaluation with higher alcohol and ester production using multivariate statistics methods. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 161, p. 376-382, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.006>.

DYSVIK, Anna *et al.* Co-fermentation Involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* Species Tolerant to Brewing-Related Stress Factors for Controlled and Rapid Production of Sour Beer. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, n. 279, p. 1-16, 21 fev. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00279>.

DYSVIK, Anna *et al.* Pre-fermentation with lactic acid bacteria in sour beer production. **Journal Of The Institute Of Brewing**, Londres, v. 125, n. 3, p. 342-356, 2019. The Institute of Brewing & Distilling. <http://dx.doi.org/10.1002/jib.569>.

DYSVIK, Anna *et al.* Microbial Dynamics in Traditional and Modern Sour Beer Production. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 86, n. 14, p. 1-14, 2 jul. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00566-20>.

ERICKSEN, Lauro. **Conhecendo Estilos #3: American Wild Ale**. 2020. Disponível em: <https://papocultura.com.br/cerveja-american-wild-ale/>. Acesso em: 16 abr. 2023.

ERTEN, Huseyin; TANGULER, Hasan; CAKIROZ, Hanife. The Effect of Pitching Rate on Fermentation and Flavour Compounds in High Gravity Brewing. **Journal Of The Institute Of Brewing**, Londres, v. 113, n. 1, p. 75-79, 2007. The Institute of Brewing & Distilling. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.2007.tb00259.x>.

FABRICIO, Mariana Fensterseifer. **PADRONIZAÇÃO DO PROCESSO PRODUTIVO DE KOMBUCHA PELA APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSO**. 2022. 128 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.

FAGUNDES, Gustavo. **OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CIP EM MICRO CERVEJARIA**. 2021. 46 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2021.

FARIAS, Jean Lucas Ribeiro de *et al.* Produção artesanal de cerveja: levantamento da microrregião de Francisco Beltrão. **Brazilian Journal Of Development**, São José dos Pinhais, v. 8, n. 5, p. 42204-42215, 31 maio 2022. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv8n5-614>.

FEISTAUER, Lucas Brambilla Hilbig. **Propriedades antioxidantes da cerveja artesanal**. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

GALVAGNO, Miguel Angel; FORCHIASSIN, Flávia. Fisiologia dos fungos: crescimento, morfologia e diferenciação. *In*: ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2ª. ed. rev. Caxias do Sul: Educs, 2010. cap. 3, p. 91-122. ISBN 9788570615626.

GÄNZLE, Michael G *et al.* Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion In Food Science**, [S.L.], v. 2, p. 106-117, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>.

GIBSON, Brian R. *et al.* Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **Fems Microbiology Reviews**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 535-569, set. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x>.

GLAZER, Alexander N.; NAKAIDO, Hiroshi. **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

GOERL, Bárbara Vitt. **ANÁLISE DAS PERDAS FINANCEIRAS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO EM UMA CERVEJARIA ARTESANAL DA REGIÃO SUL DO BRASIL**. 2022. 79 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Engenharia de Produção, Uniritter, Porto Alegre, 2022.

GOMIDE, João Victor Boechat; CUNHA, Elton Vieira; GOMIDE, Guilherme Boechat. Detecção e contagem automáticas de leveduras viáveis e inviáveis utilizando técnicas de visão computacional. **Conjecturas**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 401-418, 3 mar. 2022. Uniao Atlantica de Pesquisadores. <http://dx.doi.org/10.53660/conj-690-806>.

GONÇALVES, João L.; FIGUEIRA, José A.; RODRIGUES, Fátima P.; ORNELAS, Laura P.; BRANCO, Ricardo N.; SILVA, Catarina L.; CÂMARA, José S.. A powerful methodological approach combining headspace solid phase microextraction, mass spectrometry and multivariate analysis for profiling the volatile metabolomic pattern of beer starting raw materials. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 160, p. 266-280, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.065>.

GONÇALVES, Juliana Neves *et al.* Elaboração de cerveja artesanal do estilo caxiri beer com adição de camu camu (*Myrciaria dubia*). **Brazilian Journal Of Science**. Rio Verde - GO, p. 101-108. 01 abr. 2022.

HODGKIN, Matthew *et al.* A novel image cytometry-based *Lactobacillus* bacterial enumeration method for the production of kettle sour beer. **Journal Of Microbiological Methods**, [S.L.], v. 177, p. 106031, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106031>.

HORNINK, Gabriel Gerber & GALEMBECK, Gabriel. **Glossário cervejeiro**. Alfenas, MG. Editora Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), 2019.

HORSNEY, Ian S.. **A history of beer and brewing**. Cambridge: Rsc Paperbacks, 2003.

HÜBNER, Dagna Sunara. **Produção de cerveja estilo Catharina Sour com polpa de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) e gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*)**. 2019. 62 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

IMAIZUMI, Vitor Massami. **CERVEJA COM JABUTICABA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ENERGÉTICA E SENSORIAL**. 2019. 96 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutor em Agronomia (Energia na Agricultura), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu), Botucatu, 2019.

LEMONS, Margarida Barbosa Pereira de. **Ageing profiling of commercial and craft beers: a sensorial and chemical overview**. 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica, Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2014.

LEVTECK (Florianópolis). **Lactobacillus buchneri**. 2022. Disponível em: <https://levteck.com.br/produto/lactobacillus-buchneri/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

LIEBTAG, Miles. **Empório da Cerveja**. Disponível em: <https://blog.emporiiodacerveja.com.br/cerveja-kettle-sours-versus-cerveja-sours-traditional> Acesso em: 11 de outubro 2022.

LIMA, Urgel de Almeida *et al.* Biotecnologia industrial. Volume 3, Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo, SP. Edgard Blucher, 2001.

LITI, Gianni *et al.* Population genomics of domestic and wild yeasts. **Nature**, [S.L.], v. 458, n. 7236, p. 337-341, 11 fev. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07743>.

LOURENÇO, Jefté Macário. **UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NOS PROCESSOS INDUSTRIAIS PARA FABRICAÇÃO DE CERVEJAS**. 2021. 28 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Universidade do Extremo Sul Catarinense – Unesc, Criciúma, 2021.

LOWE, Deirdre P.; ULMER, Helge M.; BARTA, Reinhold C.; GOODE, Declan L.; ARENDT, Elke K.. Biological Acidification of a Mash Containing 20% Barley Using

Lactobacillus Amylovorus FST 1.1: its effects on wort and beer quality. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 96-106, jun. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1094/asbcj-63-0096>.

MAUCH, Alexander; JACOB, Fritz; COFFEY, Aidan; ARENDT, Elke K.. Part I. The Use of Lactobacillus Plantarum Starter Cultures to Inhibit Rootlet Growth during Germination of Barley, Reducing Malting Loss, and its Influence on Malt Quality. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 69, n. 4, p. 227-238, set. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1094/asbcj-2011-1027-01>.

MEDEIROS NETO, Moisés Sesion de. **PROCESSO DE FERMENTAÇÃO LÁTICA VISANDO A PRODUÇÃO DE CERVEJA TIPO CATHARINA SOUR**. 2018. 34 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2018.

MELLO, Livia Silva Simões; SIQUEIRA, Vinicius Lacerda. **ESTUDO DE CERVEJAS ÁCIDAS**. 2017. 51 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química e de Petróleo, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2017.

MENEZES, Natália Viviane Santos de. **AVALIAÇÃO SENSORIAL E CARACTERIZAÇÃO DE CERVEJA DE TRIGO ADICIONADA DE PSEUDOFRUTO DO CAJU (ANACARDIUM OCCIDENTALE) E CASCAS DE LARANJA (CITRUS SINENSIS)**. 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

MORADO, Ronaldo. Larousse da Cerveja. São Paulo, SP. Larousse do Brasil, 2009.

MORETTO, João Luiz Mendes Lima. **Maturação de cervejas – o estado da arte**. 2022. 43 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

NUNES, Joyce da Silva. **AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE NA PRODUÇÃO DE CERVEJA**. 2021. 40 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Engenharia Química, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2021.

OLIVEIRA, Nayara Aline Muniz de. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja**. 2011. 45 f. Monografia (Especialização) - Curso de Microbiologia Ambiental e Industrial, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

OSBURN, Kara *et al.* Primary souring: a novel bacteria-free method for sour beer production. **Food Microbiology**, Londres, v. 70, p. 76-84, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.007>.

O'SULLIVAN, T.F.; WALSH, Y.; O'MAHONY, A.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, D.. A Comparative Study of Malthouse and Brewhouse Microflora. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 105, n. 1, p. 55-61, 1999. The Institute of Brewing & Distilling. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.1999.tb00006.x>.

PALMER, Jhon J. **How to brew : everything you need to know to brew beer right the first time.** Boulder, Co: Brewers Publications, 2006.

PEREIRA, Rafael Murta. TECNOLOGIA CERVEJEIRA: DESENVOLVIMENTO DE PESQUISAS E ANÁLISES CIENTÍFICAS NAS ÁREAS DE CERVEJARIA. **Revista da Jopic**, Teresópolis, v. 7, n. 11, p. 209-230, Jul. 2021.

PEÇANHA, Gabriel da Costa. **ANÁLISE DE BOWTIE PARA UM PROCESSO TÍPICO DE CERVEJARIA ARTESANAL.** 2022. 68 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Engenharia Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2022.

PEYER, Lorenzo C. *et al.* Sour Brewing: impact of lactobacillus amylovorusfst2.11 on technological and quality attributes of acid beers. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 75, n. 3, p. 207-216, jun. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1094/asbcj-2017-3861-01>.

PIECZONKA, S.A., Zarnkow, M., Diederich, P. *et al.* **Archeochemistry reveals the first steps into modern industrial brewing.** *Sci Rep* 12, 9251 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12943-6>

PORT, Sabrina Aparecida. **CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE CERVEJA TIPO LAMBIC.** 2017. 40 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Agronomia Com Ênfase em Agroecologia, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, 2017.

PRAIA, Ana Beatriz *et al.* Sour Beer with Lacticaseibacillus paracasei subsp. paracasei F19: feasibility and influence of supplementation with spondias mombin l. juice and/or by-product. **Foods**, [S.L.], v. 11, n. 24, p. 4068, 16 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods11244068>.

ROGERS, Cody M. *et al.* Terminal acidic shock inhibits sour beer bottle conditioning by *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 57, p. 151-158, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.012>.

SALES, Lucas da Silva; SOUZA, Patrick Gomes de. PRODUÇÃO DE CERVEJA DO ESTILO CATHARINA SOUR COM ARAÇÁ-BOI (EUGENIA STIPITATA MCVAUGH) / CATHARINA SOUR BEER PRODUCTION WITH ARAÇÁ-BOI (EUGENIA STIPITATA MCVAUGH). **Brazilian Journal Of Development**, São José dos Pinhais, v. 7, n. 1, p. 1599-1613, 2021. *Brazilian Journal of Development*. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n1-109>.

SANTOS, Amanda da Silva *et al.* Aplicação da fermentação mista na produção de cervejas artesanais. **Diversitas Journal**, Santana do Ipanema, v. 6, n. 1, p. 783-800, 29 jan. 2021. Universidade Estadual de Alagoas. <http://dx.doi.org/10.17648/diversitas-journal-v6i1-1585>.

SANTOS, José Guilherme Domingues Araújo de Bragança dos. **Produção de fenóis voláteis por *Brettanomyces/ Dekkera bruxellensis*: a influência da concentração dos precursores e de outros fatores.** 2014. 36 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado de Viticultura e Enologia, Universidade do Porto, Porto, 2014.

SANTOS, Lilian de Lima. **CERTIFICAÇÃO DA QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS AVALIAÇÃO DA CERVEJARIA KAIRÓS.** 2019. 60 f. TCC

(Graduação) - Curso de Bacharel em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

SANTOS, Yuri José da Silva. **CONTROLE MICROBIOLÓGICO NA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE CERVEJAS**. 2022. 47 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2022.

SCARPELLI, José Vitor. **DMAIC APLICADO À REDUÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO E AO BAIXO RENDIMENTO DE VOLUME DE MOSTO DE UMA CERVEJARIA ARTESANAL**. 2021. 39 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2021.

SCHMIDELL, Willibaldo *et al.* Biotecnologia industrial. Volume 2, Engenharia bioquímica. São Paulo, SP. Edgard Blucher, 2001.

SCHREINER, Ligia Lindner. **Padrões Microbiológicos de Alimentos Conceitos e Alterações**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária Anvisa, Novembro/2020. Color.

SILVA, Carlos Henrique Gomes da; OLIVEIRA, Luana Lechenakoski de; WESTPHAL, Thais Thaynara; ROCHA, André Felipe; IGLIKOVSKI, Sandro Marcos; CEOLA, Duan. Caracterização da cerveja Catharina Sour produzida com insumos catarinenses / Characterization of Catharina Sour beer brewed with raw materials from Santa Catarina state. **Brazilian Journal Of Development**, São José dos Pinhais, v. 8, n. 5, p. 38180-38198, 17 maio 2022. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv8n5-359>.

SILVA, Carlos Henrique Pessôa de Menezes e . **Microbiologia da Cerveja: do básico ao avançado, o guia definitivo**. 1 ed. São Paulo: Livraria da Física, 2019.

SILVA, Danielle Ferreira da; SOUZA, Patrick Gomes de; ALBUQUERQUE, Patrícia Melchionna. Avaliação da eficácia dos principais métodos de estabilização coloidal da cerveja tipo American Lager / Evaluation of the effectiveness of the main colloidal stabilization methods of the American Lager beer. **Brazilian Journal Of Development**, São José dos Pinhais, v. 7, n. 4, p. 34657-34670, 5 abr. 2021. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n4-090>.

SILVA, Gildo Almeida da. Dekkera e Brettanomyces: Leveduras não Competitivas que Deterioram Vinhos. **Embrapa Uva e Vinho**. Bento Gonçalves, p. 1-72. dez. 2005.

SILVA, Hamir Gonçalves da; SOUZA, Patrick Gomes de; PINHEIRO, Clairon Lima. Estudo da reutilização de leveduras imobilizadas sobre a qualidade da cerveja Cream Ale/ Study on the reuse of immobilized yeasts on the quality of Cream Ale beer. **Brazilian Journal Of Development**, São José dos Pinhais, v. 7, n. 4, p. 43083-43095, 29 abr. 2021. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n4-665>.

SILVA, Isabela Guedes Pires da *et al.* Morfotipagem de colônias de leveduras cultivadas em meio de cultura YEPD / Morphotyping of yeast colonies grown on YEPD culture medium. **Brazilian Journal Of Development**, São José dos Pinhais,

v. 7, n. 11, p. 105258-105270, 16 nov. 2021. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n11-243>.

SILVA, Jessiane Donato da. **ESTUDO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE (APPCC) NA PRODUÇÃO ARTESANAL DE CERVEJA: UMA REVISÃO**. 2021. 108 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Química Tecnológica e Industrial, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2021.

SILVA, Layra Lobato da. **CERVEJA ESPECIAL: CATHARINA SOUR E FRUIT BEER**. 2021. 37 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Campus Venda Nova do Imigrante, Instituto Federal do Espírito Santo, Venda Nova do Imigrante, 2021.

SILVA, Pérsio Alexandre da. **POTENCIAL TECNOLÓGICO DE LEVEDURAS NÃO-SACCHAROMYCES**. 2022. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

SILVA, Thamara do Carmo Oliveira. **O INTEGRATIVA DA LITERATURA SOBRE A PRODUÇÃO E QUALIDADE DE CERVEJAS ARTESANAIS**: uma análise bibliométrica. 2021. 76 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Química, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2021.

SILVA, Vicente Damo Martins da *et al.* Desenvolvimento de cerveja estilo Catharina Sour de frutas vermelhas utilizando *Lactobacillus plantarum*. **Research, Society And Development**, Vargem Grande Paulista, v. 11, n. 9, p. 1-12, 20 jul. 2022. *Research, Society and Development*. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i9.32009>.

SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A.M.; REZAEI, K.. Advanced analytical methods for the analysis of chemical and microbiological properties of beer. **Journal Of Food And Drug Analysis**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 202-222, 14 jul. 2020. *The Journal of Food and Drug Analysis (JFDA)*, Food and Drug Administration, Taiwan (TFDA). <http://dx.doi.org/10.38212/2224-6614.2228>.

SOCCOL, Carlos Ricardo; ASHOK, Pandey; LARROCHE, Christian. *Fermentation processes engineering in the food industry*. Boca Raton, Fla.: Crc Press/Taylor & Francis Group, Llc, 2013.

SOUZA, Patrick Gomes de; CARVALHO, Mirela Furtado. A valiação do oxigênio dissolvido na cerveja durante o processo de trasfega entre a fermentação e maturação. **Brazilian Journal Of Science**. Manaus, p. 75-81. 1 fev. 2022.

SPIESS, Silvano. **Cervejeiro Caseiro: Extrato da Cerveja**. 2016. Disponível em: <https://ocaneco.com.br/extrato-da-cerveja/>. Acesso em: 13 maio 2023.

STRONG, Gordon. **BJCP Beer Style Guidelines – 2021 Edition**. Disponível em: <https://www.bjcp.org/beer-styles/introduction-to-beer-styles/>. Acesso em: 14 jan. 2023.

VERBELEN, P. J. et al. Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. **Applied Microbiology And Biotechnology**, Berlim, v. 82, n. 1, p.

155-167, fev. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1779-5>.

VEZZOSO, Ana Livia. **Práticas 3 e 4: Coleta de amostra para inóculo, plaqueamento nos meios; Preparo do extrato enzimático bruto. Determinação da atividade enzimática específica.** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo – Usp, 2020.

VIANA, Rebeca Andrade. **Métodos de controlo de qualidade nas diferentes etapas de produção de cervejas artesanais.** 2021. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Aplicações em Biotecnologia e Biologia Sintética, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2021.

VRIESEKOOOP, Frank *et al.* 125th Anniversary Review: bacteria in brewing. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 118, n. 4, p. 335-345, dez. 2012. The Institute of Brewing & Distilling. <http://dx.doi.org/10.1002/jib.49>.

YEASTLAB (Franca). 2018. **YLB9003 - Lactobacillus Brevis.** Disponível em: <http://www.yeastlab.com.br/produtos/ylb9003---lactobacillus-brevis>. Acesso em: 20 nov. 2022.

ZHENG, Jinshui *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** On-Line, p. 2782-2858. Abril 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>. Acesso em: 20 dezembro 22.

## ANEXO 1



## SafAle™ US-05



Fermento Ale Americano, selecionado para produzir cervejas bem balanceadas com baixo diacetil e com um paladar final bem "crispy" e limpo. Forma uma firme camada de espuma e apresenta uma habilidade muito boa de se manter em suspensão durante a fermentação.

**INGREDIENTES:** Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), Agente Emulsificante: E491

ÉSTERES TOTAIS	ÁLCOOIS SUPERIORES TOTAIS	AÇÚCARES RESIDUAIS	FLOCULAÇÃO	SEDIMENTAÇÃO
40	269	11 g/l*	+/-	média
ppm em mosto com 18°P a 20°C em tubos EBC	ppm em mosto com 18°P a 20°C em tubos EBC	*3g maltotriose/L correspondendo a uma atenuação aparente de 81%		

Leveduras cervejeiras secas da Fermentis são conhecidas por ter a habilidade de produzir uma grande variedade de estilos de cerveja. A fim de comparar nossas cepas, nós fizemos testes em condições laboratoriais com um mosto padrão para todas as cepas e condições padrão de temperatura (SafLager: 12°C por 48h e depois 14°C / SafAle: 20°C). Nós focamos nos seguintes parâmetros: produção de álcool, açúcares residuais, floculação e cinética da fermentação.

Dado o impacto da levedura na qualidade da cerveja pronta é recomendado respeitar as instruções de fermentação prescritas. Nós instruímos fortemente aos usuários a fazerem testes de fermentação antes de qualquer uso comercial de nossos produtos.

**FERMENTAÇÃO:** idealmente a 18-28°C (64-82°F)

**DOSAGEM:** 50 a 80 g/hl

**INSTRUÇÕES DE REIDRATAÇÃO:** Polvilhar a levedura em no mínimo 10 vezes o seu peso em água estéril ou mosto de 25 a 29°C (77°F a 84°F). Deixar descansando por 15 a 30 minutos.

Gentilmente mexer por 30 minutos, e dosar o creme resultante no tanque de fermentação.

Alternativamente, dose a levedura diretamente no tanque de fermentação desde que a temperatura do mosto esteja acima de 20°C (68°F). Polvilhe progressivamente a levedura seca no mosto certificando-se que a levedura cubra toda a superfície do mosto disponível para evitar grumos. Deixar por 30 minutos, para então misturar o mosto usando aeração ou pela adição de mosto

#### ANÁLISE TÍPICA:

% peso seco:	94.0 – 96.5
Celulas Viáveis no empacotamento:	> 6 x 10 <sup>9</sup> /g
Bactérias Totais*:	< 5 / ml
Bactéria ácido acético*:	< 1 / ml
Lactobacillus*:	< 1 / ml
Pediococcus*:	< 1 / ml
Levedura selvagem não <i>Saccharomyces</i> *:	< 1 / ml
Microorganismos Patogenicos:	de acordo com regulamentação vigente

\* Quando a levedura seca é inoculada a uma taxa de 100 g/hl, equivale a uma concentração de > 6 x 10<sup>6</sup> células viáveis/ml

#### ARMAZENAMENTO

36 meses a partir da data de produção. Durante o transporte: O produto pode ser transportado e armazenado em temperatura ambiente por períodos de tempo não excedendo 3 meses sem afetar sua performance.  
No destino final: Manter em condições secas e frescas (< 10°C/50°F).

#### VIDA ÚTIL

Ver data máxima para consumo impressa no pacote. Pacotes abertos devem ser selados e mantidos a 4°C (39°F) e usados dentro de 7 dias após abertos. Não usar pacotes moles ou danificados.

FOLHA DE DADOS TÉCNICOS - SafAle™ US-05 - Rev: Julho2017

The obvious choice for beverage fermentation    

Fermentis Division of S.I. Lesaffre - BP 3029 - 137 Rue Gabriel Péri - 59703 Marcq-en-Barœul, Cedex - FRANCE - Tel. +33 (0)3 20 81 62 75 - Fax. +33 (0)3 20 81 62 70 - www.fermentis.com