



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Karen Pequeno Brasil Montenegro

**Viabilidade de produção de cerveja artesanal utilizando
*Saccharomyces boulardii***

JOÃO PESSOA
2017

Karen Pequeno Brasil Montenegro

**Viabilidade de produção de cerveja artesanal utilizando
*Saccharomyces boulardii***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito para obtenção do Título de Biotecnologista.

Orientador:

Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire

Coorientador:

Bacharel em Biotecnologia Rafael Limongi de Souza

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M777v Montenegro, Karen Pequeno Brasil.
Viabilidade de produção de cerveja artesanal utilizando
Saccharomyces boulardii / Karen Pequeno Brasil
Montenegro. - João Pessoa, 2017.
55 f. : il.

Orientação: Kristerson Reinaldo de Luna Freire.
Coorientação: Rafael Limongi de Souza.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Levedura Sacchamomyces boulardii. 2. Cinética de
fermentação. 3. Cerveja artesal. 4. Probiótico. I.
Freire, Kristerson Reinaldo de Luna. II. Souza, Rafael
Limongi de. III. Título.

UFPB/BC

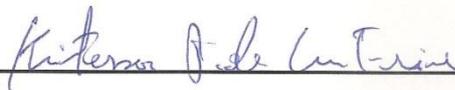
Karen Pequeno Brasil Montenegro

**Viabilidade de produção de cerveja artesanal utilizando
*Saccharomyces boulardii***

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: 21 de Novembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA:



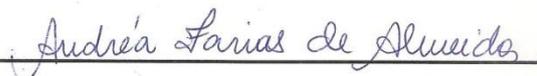
Prof Dr Kristerson Reinaldo de Luna Freire
CBiotec - UFPB
(Orientador)



Rafael Limongi de Souza
(Coorientador)



Profª Drª Adna Cristina Barbosa de Sousa
CBiotec - UFPB
(Examinadora)



Profª Drª Andréa Farias de Almeida
CBiotec - UFPB
(Examinadora)

Dedico este trabalho os meus pais, minhas irmãs e ao meu namorado Luiz Renato por todo apoio, carinho e presença em toda minha jornada na graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e inteligência para superar todas as dificuldades e forças para enfrentar todos os obstáculos que apareceram no decorrer dessa caminhada.

A todos os professores do curso de biotecnologia por todos os anos de aprendizado, especialmente ao professor Valdir Braga que me deu a primeira oportunidade de iniciação científica ainda no primeiro período, a professora Maria de Socorro França pela oportunidade de poder trabalhar em um projeto de extensão tão gratificante e enriquecedor.

Em especial ao meu orientador professor Kristerson Reinaldo de Luna Freire, pela oportunidade e por toda atenção, paciência e dedicação ao me orientar e guiar durante todos os momentos da realização deste TCC.

Ao meu co-orientador Rafael Limongi de Souza por toda ajuda, disponibilidade e atenção durante todo o processo de realização desse trabalho.

Aos meus colegas Thiago Gonçalves Cavalcanti e Mateus da Silva Matias Antunes que reservaram um pouco do seu tempo para me ajudar na realização dos experimentos.

A minha banca avaliadora professora Adna Cristina B. de Sousa e a professora Andréa Farias de Almeida, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

A todos os alunos e servidores do CBiotec que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação tanto pessoal como profissional.

A todos a minha mais sincera gratidão.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

(Madre Teresa de Calcutá)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de cores para classificação do tipo de cerveja.....	31
Figura 2: Consumo do substrato (°Brix) pelo tempo de fermentação no primeiro experimento piloto.....	34
Figura 3: Absorbância por tempo do processo fermentativo no segundo experimento piloto.....	35
Figura 4: pH pelo tempo de fermentação.....	36
Figura 5: Porcentagem de atenuação aparente por tempo de fermentação.....	38
Figura 6: Concentração celular pelo método da absorbância pelo tempo de fermentação.....	39
Figura 7: Curva de calibração relacionando a maior absorbância do processo fermentativo com sua biomassa.....	39
Figura 8: Correlação desenvolvida através da equação da reta, entre o valor da biomassa e o consumo de substrato ao longo do processo fermentativo..	41
Figura 9: Correlação desenvolvida por Fernandes (2017).....	41
Figura 10: Linha de tendência linear para obtenção do $\mu_{\text{máx}}$ (velocidade específica máxima de crescimento celular), para fase mais próxima da exponencial do experimento.....	42
Figura 11: Linha de tendência linear para a obtenção do V_m (velocidade média de consumo do substrato).....	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABV	Alcohol by volume
° C	Grau Celsius
CERVBRASIL	Associação Brasileira da Indústria da Cerveja
DNS	Ácido dinitro-salicílico
g_x/g_s	Gramas de células por gramas de substrato
IBU	International bitternerss units
NaOH	Hidróxido de sódio
Nm	Nanômetros
P_x	Produtividade em células
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
V_m	Velocidade média de consumo de substrato
$Y_{x/s}$	Fator de conversão de substrato em células
$\mu_{máximo}$	Velocidade específica máxima de crescimento

GLOSSÁRIO

Ascomicética – filo *ascomycota* encontrada em substratos ricos em açúcares simples, como as frutas.

Biomassa - quantidade de matéria viva, presente em determinado *habitat*, comumente expressa como peso de organismos por unidade de área do *habitat*, ou como volume ou peso de organismos por unidade de volume do *habitat*.

Carbonatação – dissolução de CO₂ na cerveja a fim de se obter espuma.

Debris – Fragmentos de substâncias

Extrato de Malte – açúcar na forma de um xarope viscoso de coloração marrom escuro, sabor adocicado e característico, extraído da cevada malteada.

Fermentação - reação espontânea de um corpo orgânico pela presença de um fermento que o decompõe.

Lúpulo – planta que pertence à ordem Urticaceae, da família Cananbinaceae e gênero *Canabis* e confere aroma e amargos às cervejas.

Mosto – mistura açucarada destinada da fermentação alcoólica.

Probiótico – micro-organismos que trazem benefícios a saúde quando consumidos.

Substrato – fonte de carbono para o desenvolvimento de um organismo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1. A história da cerveja.....	16
3.2. Mercado cervejeiro brasileiro.....	18
3.3. Processo fermentativo da cerveja.....	20
3.4. Levedura cervejeira.....	21
3.5. <i>Saccharomyces boulardii</i>	22
3.6. Estudo cinético da fermentação.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Material.....	26
4.2. Métodos.....	26
4.2.1. Produção do mosto.....	26
4.2.2. Preparo do inóculo	27
4.2.3. Produção da cerveja	27
4.2.4. Análise fermentativa.....	28
4.2.4.1. Crescimento celular.....	28
4.2.4.2. Consumo do substrato.....	28
4.2.4.3. pH.....	29
4.2.4.4. Determinação da biomassa.....	29
4.2.4.5. Contagem de células.....	30
4.2.4.6. Teste limite de atenuação	30
4.2.5. Análise física- química da cerveja.....	30
4.2.5.1. Determinação de cor.....	30
4.2.5.2. Determinação de açúcares redutores.....	31
4.2.5.3. Determinação do teor alcoólico.....	32
4.2.6. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Experimento piloto.....	33
5.2. Terceiro experimento.....	36
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

RESUMO

O mercado de cervejas artesanais vem crescendo no Brasil, e despertam o interesse do consumidor de explorar vários estilos e categorias de cervejas que, geralmente, não são produzidas em grandes cervejarias. O consumidor busca cada vez mais qualidade e variedade de estilos, sabores e aromas no ramo cervejeiro. As leveduras, além de responsáveis pelo processo fermentativo, conferem a cerveja aromas e sabores característicos, estabelecendo alguns padrões de estilos e aumentando valor agregado destes produtos. O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade e a cinética fermentativa da levedura *Saccharomyces boulardii*, que é utilizada como medicamento e probiótico para gastroenterites, na produção de cerveja artesanal. Também foram avaliadas as características físico-químicas da cerveja produzida e calculados o $\mu_{\text{máx}}$ (velocidade específica máxima de crescimento) V_m (velocidade média de consumo de substrato) e o P_x (produtividade em células). Foram realizados três experimentos pilotos para ajustar as condições fermentativas para a *S. boulardii*. A fermentação foi conduzida em 19°C e monitorada por quatro dias. Dentre os parâmetros avaliados, o pH da cerveja reduziu até um valor de 4,5. O resultado de atenuação aparente teve no ponto 91 horas 59,45% de atenuação, sendo considerado bom. Os resultados do cálculo do $\mu_{\text{máx}}$ e do P_x foram de 0,0101 h⁻¹ e 0,02050 g.L⁻¹.h⁻¹ respectivamente. As análises físico-químicas da cerveja foram similares ao que foram vistos para produção de cerveja pela *S. cerevisiae*, o teor alcoólico encontrado foi de 4,5 % ABV, a análise da cor pelo método EBC teve como resultado uma cerveja clara com tonalidade ouro, comum a cervejas do tipo ale e o valor de açúcares redutores foi de 7,76 g/L. Foi observado que após o envase, que a cerveja manteve uma quantidade leveduras suspensas ($1,72 \times 10^7$ células/mL), bem como excelente viabilidade (86 %). Os resultados encontrados mostram que apesar de diferenças na cinética de fermentação, a *S. boulardii* foi capaz de fermentar uma cerveja com qualidades cinéticas próximas às leveduras cervejeiras comerciais, mantendo uma viabilidade celular de 86% após o envase, podendo conferir possíveis propriedades probióticas ao produto.

Palavras-chaves: *Saccharomyces boulardii*, cinética de fermentação, cerveja artesanal, probiótico.

ABSTRACT

The artisanal beer market has been growing in Brazil and has aroused consumers' interest in exploring various styles and categories of beer that are not usually produced in large breweries. Consumers seek more quality and variety of styles, flavors and scents in the brewing business. Yeasts, in addition to being responsible for the fermentation process, give the beer aromas and characteristic flavors, establishing some style patterns and increasing the added value of these products. The objective of this study is to evaluate the viability and fermentative kinetics of yeast *Saccharomyces boulardii*, which is used as medicine and probiotic for gastroenteritis, in the production of artisanal beer. The physico-chemical characteristics of the beer produced were also evaluated and the $\mu_{\text{m\acute{a}x}}$ (maximum specific growth rate), V_m (medium velocity of substrate consumption) and P_x (cell productivity), were calculated. Three pilot experiments were performed to adjust the fermentation conditions for *S.boulardii*. The fermentation was conducted at 19 ° C and monitored for four days. Among the evaluated parameters, the pH of the beer reduced to a value of 4.5. The apparent attenuation result had at the point 91 hours 59.45% attenuation being considered good. The result of the calculation of μ_x and P_x were de 0,0101 h⁻¹ e 0,02050 g.L⁻¹.h⁻¹ respectively. Physicochemical analyzes of beer were similar to what have been seen for beer production by *S. cerevisiae*, the alcohol content was 4.5% ABV, the color analysis by the EBC method resulted in a light beer with gold tonality, common to beers of ale type and the value of reducing sugars was 7.76 g / L, which also coincides with the expected values. It was observed that after bottling, the beer kept a number of yeasts suspended (1.72 x 10⁷ cells/ mL) as well as excellent viability (86%). The results showed that despite differences in fermentation kinetics *S. boulardii* was able to ferment a beer with kinetic qualities close to the commercial brewer's yeast, maintaining a cellular viability of 86% after the package, which could impart possible probiotic properties to the product.

Key words: *Saccharomyces boulardii*, fermentation kinetics, artisanal beer, probiotic.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009, Art. 36. cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. Conforme o Larousse da Cerveja, até o final do século XIX o processo de fermentação não era compreendido. Por isso, acreditava-se que era algo mágico e até mesmo, milagroso. Foi somente em 1827 que o botânico Jean Baptiste Henri Joseph Desmazières publicou um artigo que falava da levedura como um ser vivo, mas sem ser atribuído à atividade fermentativa. Depois disso o francês Charles Cagniard-Latour em 1837 confirmou sua capacidade reprodutiva, seu aspecto globular e sua aparente alimentação com base em açúcares da cana-de-açúcar. Os estudos continuaram até que em 1883 o cientista Emil Christian Hansen foi capaz de isolar e cultivar uma cepa de levedura e compreender sua ação (THE BEER TIMES, 2006).

As leveduras cervejeiras, tradicionalmente usadas na produção de cervejas, são cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (tipo ale) ou *S. pastorianus* (tipo lager), que representam um grupo diversificado de micro-organismos (OLIVEIRA, 2011).

S. boulardii é uma levedura similar morfológicamente a *S. cerevisiae*. Apesar de serem provenientes do mesmo gênero, elas diferem em diversas propriedades metabólicas, genéticas e até mesmo taxonômicas. *S. boulardii* foi inicialmente isolada de frutos da lichia e mangostim em 1923 pelo cientista francês Henri Boulard (KEGELE *et al*, 2009). Atualmente essa levedura vem sendo utilizada tanto como agente profilático quanto como agente terapêutico de diarreias e outras doenças gastrointestinais. Estudos mais aprofundados levaram a descoberta de propriedades que comprovam sua ação probiótica como a sobrevivência no trânsito do trato gastrointestinal, seu crescimento ótimo á 37°C e a capacidade de inibir agentes patogênicos (CZERUKA, 2007).

Visando o melhor entendimento sobre o uso da espécie de *S. boulardii* no processo de fabricação de cerveja, o intuito deste trabalho foi estabelecer um experimento para o acompanhamento da cinética de fermentação do mosto

cervejeiro para a produção de cerveja a partir de uma linhagem de *S. boulardii* comercialmente disponível na forma farmacêutica em cápsula e conhecida pelo nome de Floratil®.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir uma cerveja artesanal e avaliar a cinética de fermentação utilizando a levedura *S. boulardii*, proveniente do medicamento Floratil®.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar comportamento de consumo do substrato da *S. boulardii* durante a fermentação;
- Avaliar comportamento do pH no decorrer do processo fermentativo;
- Analisar a cinética de crescimento celular da *S. boulardii* no decorrer da fermentação;
- Avaliar as propriedades físico-químicas e viabilidade celular da cerveja engarrafada.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. A história da cerveja

Estima-se que o homem começou a utilizar bebidas fermentadas há 30 mil anos. Estudos indicam que a produção da cerveja teve seu início por volta de 8000 a.C. Esta bebida foi desenvolvida paralelamente aos processos de fermentação de cereais. Na Antiguidade, difundiu-se lado a lado com as culturas de milho, centeio e cevado, entre os povos da Suméria, Babilônia e Egito. Também foi produzida por gregos e romanos durante o apogeu destas civilizações (MEGA, 2011).

No século XI, os mosteiros começaram a ter iniciativas de produzir cerveja em maior escala. Dois séculos depois, século XIII, o cervejeiro passou a ser reconhecido como artesão e o *gruit* (mistura de ervas usadas para dar amargor à cerveja, antecessor do lúpulo) passou a ser amplamente utilizado. Em meados do século IX, Abbot Adalhard, do mosteiro Beneditino de Corbie, no norte da França, cria um conjunto de regras para a administração do mosteiro, entre as quais a colheita de lúpulo suficiente para produzir cerveja, sendo esta a primeira ligação documentada entre lúpulo e cerveja (MORADO, 2009).

Com a Revolução Industrial, o modo de produção e distribuição sofreu mudanças decisivas. Estabeleceram-se, então, fábricas cada vez maiores na Inglaterra, Alemanha e no Império Austro-Húngaro (MEGA, 2011).

A cerveja demorou a aportar no Brasil, tendo sido primeiramente trazida pela Companhia das Índias Orientais, no século XVII, junto com os holandeses. O produto sumiu por quase 150 anos com a saída dos holandeses do país em 1654, reaparecendo apenas em 1808 com a chegada da família real portuguesa ao Brasil colônia (MORADO, 2009). Com a grande influência inglesa na coroa portuguesa e também a Inglaterra sendo a maior produtora de cerveja da época, a cerveja mais apreciada no Brasil colônia era a proveniente da importação inglesa, as famosas *Pale Ale* e *Porter*.

A supremacia da cerveja inglesa durou até 1960, onde obteve um declínio significativo, devido principalmente a grande concorrência da cerveja

produzida no Brasil que possuía uma qualidade menor, mas também um valor mais acessível para a população. No final do século XIX a importação da cerveja alemã começou a ganhar força nos portos brasileiros. A grande inovação foi a forma como ela foi importada, em caixas e garrafas, diferente das antigas cervejas inglesas que eram importadas em barris (SANTOS, 2003).

As primeiras cervejarias brasileiras estavam situadas nas cidades do Rio de Janeiro, São Paulo e em colônias alemãs no sul do país. As cervejas brasileiras eram predominantemente produtos artesanais e de baixa qualidade e eram conhecidas como cervejas barbantes, pois possuía um alto grau de fermentação que, mesmo depois de engarrafadas, produziam uma enorme quantidade de gás carbônico, criando grande pressão. A rolha era amarrada com barbante para impedir que saltasse da garrafa (COUTINHO, 2016). Devido ao clima do Brasil o lúpulo e a cevada para a produção cervejeira precisava ser importado. Com as complicações diplomáticas se tornava cada vez mais difícil realizar a importação desses insumos, fazendo com que a cevada e o lúpulo fossem substituídos por adjuntos, como arroz, milho, trigo ou outros, fazendo com que a qualidade da cerveja caísse ainda mais assim como seu valor (SANTOS, 2003).

A primeira cervejaria industrializada no Brasil foi fundada por Friederich Christoffel em Porto Alegre nos anos de 1870 e 1880, onde em meados dos anos setenta chegou a produzir um milhão de garrafas. Apesar da grande produção, os problemas de fermentação e importação da matéria-prima ainda não teriam sido resolvidos. Esses problemas começaram a ser solucionados em 1880 onde no Rio de Janeiro chegavam as máquinas frigoríficas, que foram utilizadas para resfriar o ambiente e controlar a temperatura de fermentação, fazendo com que a cerveja fosse mais uniforme e padronizada (DANTAS, 2016).

Com essa nova tecnologia no Brasil grandes empresas foram fundadas, como a Brahma, fundada no Rio de Janeiro, e a Antártica, fundada em São Paulo.

3.2. Mercado Cervejeiro Brasileiro

O marco mais importante do mercado cervejeiro brasileiro foi em 1999 quando foi anunciada a fusão entre as duas grandes indústrias cervejeiras do país, a Brahma e a Antarctica, sendo fundada a Ambev, primeira multinacional brasileira, torna-se a segunda maior produtora mundial de cerveja, atrás apenas da Anheuser Bush, americana (SANTOS, 2003).

De acordo com a CervBrasil (2015) o setor cervejeiro é um dos mais relevantes da economia brasileira, com investimento próximo de R\$20 bilhões entre 2010 e 2014. Com mais de 2,2 milhões de pessoas empregadas ao longo da cadeia, é um dos maiores empregadores do Brasil. Por possuir um importante efeito multiplicador na economia, sua atuação movimenta uma extensa cadeia produtiva que é responsável por 1,6% do PIB e 14% da indústria de transformação nacional. Em 2014, foram produzidos 14 bilhões de litros de cerveja no Brasil, obtendo um faturamento de aproximadamente 70 Bilhões de reais e gerando mais de 20 bilhões em impostos (CERVBRASIL, 2015).

A produção de 2014 manteve o Brasil em terceiro lugar no ranking mundial de produção, atrás apenas da China e Estados Unidos, fazendo com que a taxa de produção nacional crescesse em média 5% ao ano, nos últimos 10 anos (CERVBRASIL, 2015).

O aumento na produção mundial de cerveja reflete o reposicionamento das grandes empresas do mercado nos últimos anos. Assim, em 2011, 40 empresas respondiam por 81.7% da produção global, e agora se percebe que a produção permanece concentrada, porém, em 11 empresas internacionais, quais sejam: AB InBev (18.6%), SABMiller (9.3%), Heineken (8.5%), Carlsberg (6.2%), China Resource Brewery Ltd. (5,40%), Tsingtao Brewery Group (3.8%), Grupo Modelo (2.9%), Yanjing (2.9 %) e Molson-Coors (2.5 %), respondendo por 60,1% da produção global (FREITAS, 2015). Com a aquisição do grupo SABMiller pela AB InBev em 2016 a sua supremacia no mercado cervejeiro se estabilizou ainda mais.

O Brasil se encontra na 27^o posição no ranking internacional de consumo com 66,9 litros per capita em 2014, enquanto o primeiro lugar se encontra a República Tcheca, com 147,1 litros per capita em 2014 (CERVBRASIL, 2015).

Segundo informações do Sindicerv (2007) o mercado brasileiro de cerveja é caracterizado por ter um público alvo jovem (61% entre 25 a 44 anos), mas, em virtude do baixo poder aquisitivo deste grupo, o consumo per capita ainda é considerado relativamente baixo se comparado a outros países como a República Checa que ocupa o 1^o lugar no ranking.

As classes C e D são responsáveis por 72% das vendas totais. Cerca de 60% do público consumidor de cervejas é do sexo masculino. O segmento de cervejas sem álcool responde por 1% do mercado, mas apresenta um crescimento de cerca de 5% ao ano, mais que o dobro do tradicional (2%), e movimenta mais de R\$ 110 milhões por ano (INSTITUTO LAFIS, 2007).

A indústria cervejeira no Brasil apresenta o mesmo fenômeno que vem ocorrendo em nível global: a intensificação das aquisições como forma de aumentar sua participação no mercado internacional e nacional, aparecendo o Brasil como um dos espaços mais importantes de valorização da bebida cervejeira (FREITAS, 2015).

Atualmente existem três grandes cervejarias que dominam o cenário e o mercado cervejeiro no Brasil: Ambev, Heineken e Grupo Petrópolis, que juntas contabilizam 90% de todo o setor. Os 10% restantes são conferidos as microcervejarias que de acordo com a Cervesia (2017) o Brasil deve chegar a 500 microcervejarias ao final de 2017. Essas microcervejarias produzem em cerca 91 milhões de litros anuais de cervejas artesanais o que equivale a 0,7% do mercado de cerveja no Brasil. No ano de 2015 obteve uma taxa de crescimento de aproximadamente 20% em relação a 2014.

A cerveja artesanal, ou também chamada de cerveja especial, tem perfil sensorial muito mais complexo se comparada às cervejas produzidas em escala industrial. Ela oferece sabor diferenciado e consegue ao mesmo tempo dispensar o consumo exagerado do produto. Esse ramo de cervejaria

conquista cada vez mais adeptos que estão dispostos a pagar mais por um produto melhor e que também estão em busca de uma qualidade de vida melhor em decorrência da menor ingestão de bebidas alcoólicas, por não ser necessário o consumo em quantidades elevadas (BELTRAMELLI, 2012, p.193)

3.3. Processo Fermentativo da Cerveja

O processo de fermentação ocorre após os processos de fervura e resfriamento, onde a levedura é inoculada no mosto e ela inicia o seu trabalho de transformações, onde modifica os açúcares fermentáveis presentes no mosto em dióxido de carbono (CO_2) e etanol. Procura-se, então, controlar a fermentação de modo a favorecer a manutenção e a produção dos aromas e sabores desejáveis e a eliminação dos indesejáveis. Os fatores mais importantes que ocorrem para isto são: a temperatura de fermentação, a duração, a contrapressão, a escolha adequada da levedura e a quantidade a ser empregada (MORADO, 2009).

A fermentação ocorre na parte solúvel do citoplasma das células das leveduras seguindo a via bioquímica conhecida como sequência de Embden-Parnas – Meyerhoff (Glicólise). No qual se trata da descarboxilação do piruvato em acetaldeído, sendo que o NADH o oxida, formando o álcool (OETTERER, 2006).

O início da fermentação é o momento em que a concentração de açúcar é mais elevada, sendo os principais açúcares fermentáveis presentes a maltose e a glicose. O oxigênio presente no mosto, que deve ser aerado no início da fermentação, é utilizado pela levedura como nutriente para sua multiplicação. Aminoácidos e alguns sais minerais também são nutrientes importantes neste processo (MORADO, 2009).

No decorrer da fermentação, o pH do mosto diminui para favorecer o desenvolvimento da levedura. O acompanhamento da cinética de fermentação pode ser feito pela atenuação do °Brix do mosto que reflete sua concentração de sólidos solúveis. Dependendo da concentração de açúcares fermentescíveis do mosto, tem-se maior ou menor concentração de álcool na mistura do final da fermentação (OETTERER, 2006).

A fermentação cervejeira pode ser efetuada por dois métodos: alta e baixa fermentação. A fermentação alta utiliza leveduras ditas altas e é realizada a uma temperatura entre 15° a 20°C. Durante essa fermentação as leveduras vêm a superfície, revitalizam-se fazendo com que a fermentação seja de curta duração, já a fermentação baixa utiliza leveduras ditas baixas e é realizada em temperatura entre 7° a 14°C. As leveduras não vem a superfície, não se revitalizam causando uma demora na fermentação, ou seja, ela dura mais tempo (ROCHA, 2006).

3.4. Levedura Cervejeira

As leveduras são fungos diferenciados, pois se apresentam em forma unicelular. As leveduras são mais eficientes na realização de alterações químicas por causa da sua razão área/ volume em comparação aos bolores. Devido a escassez de critérios morfológicos, as espécies de leveduras são diferenciadas mais de acordo com as suas características fisiológicas (PELCSAR, 1981).

A descoberta das leveduras ocorreu no final no século XIX, por Louis Pasteur, que fez um estudo específico sobre a atuação fermentativa das leveduras em cerveja e vinho. Além disso, foi nessa época em que se descobriu a rota da via metabólica da glicólise, sendo fundamental para a compreensão do processo fermentativo (VENTURINI; CEREDA, 2001; JACKSON, 2007).

A *S. cerevisiae* é uma levedura ascomicética gemulante típica, são elípticas, medindo cerca de 6 a 8 μm de comprimento por 5 μm de largura e se reproduzem assexuadamente por brotamento ou germulação. Sua classificação taxonômica esta descrita na Tabela 1. Cepas dessa espécie são utilizadas na produção de bebidas alcoólicas e pães. Na presença de oxigênio, as leveduras oxidam os açúcares a dióxido de carbono que são responsáveis pelas “bolhas de ar” no pão. As leveduras de cervejaria e padaria tem sido utilizadas a milhares de anos, assim a *S. cerevisiae* é uma levedura de grande importância econômica a muito tempo (PELCSAR Jr. *et al.*, 2004).

Todas as leveduras cervejeiras tradicionalmente usadas na produção de cervejas *ale* e *lager*, são cepas de *S. cerevisiae* que representam em totalidade um grupo diverso de micro-organismos. Para efeito histórico e não completamente taxonômico as leveduras *lager* são conhecidas como *S. carlsbergensis*. A maior diferença entre essas cepas o que justifica essa caracterização dos nomes e que as cepas *S. cerevisiae lager* (*S. carlsbergensis*) possuem os genes MEL que produzem a enzima extracelular melibiase, que permite a utilização do dissacarídeo melibiose (glicose – galactose), já as cepas do tipo *ale* carecem desse gene MEL, o que impossibilita a utilização da melibiose. Além disso, as cepas também diferem na sua capacidade de esporular, em condições improprias do meio, a levedura não consegue se reproduzir, formando assim esporos. As leveduras de alta fermentação (cepas *ale*) formam esporos após 48 horas, já as leveduras de baixa fermentação (cepas *lager*) possuem uma capacidade limitada de esporulação (OLIVEIRA, 2011).

Tabela 1: Taxonomia das leveduras *Saccharomyces*

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	
<u>Reino</u>	<u>Fungi</u>
<u>Filo</u>	<u>Ascomycota</u>
<u>Classe</u>	<u>Saccharomycetes</u>
<u>Ordem</u>	<u>Saccharomycetales</u>
<u>Família</u>	<u>Saccharomycetaceae</u>
<u>Gênero</u>	<u><i>Saccharomyces</i></u>

Fonte: autor

3.5. *Saccharomyces boulardii*

Em 1920, Henri Boulard, um microbiologista francês, estava no Sudoeste Asiático, à procura de uma linhagem de levedura que fosse capaz de suportar altas temperaturas, a fim de produzir um bom vinho (MARTINS, 2008). Enquanto estava lá houve uma epidemia de cólera e o pesquisador observou que ao prepararem uma chá com a casca de uma fruta local (lichia), os

sintomas melhoravam consideravelmente, principalmente a diarreia. Um tempo depois foi descoberto que essa casca estava recoberto por uma levedura e que ela era a razão pela qual o chá era tão eficiente. Deu-se então o nome de *S. boulardii* para o micro-organismo (FLORASTOR, 2017).

Segundo MCFARLAND, 1993 a levedura *S. boulardii* foi primeiramente identificada como uma espécie distinta do gênero hemiascomiceto *Saccharomyces*, mas com o passar dos anos e os avanços em métodos de tipagem foi aberto uma discussão sobre essa levedura, se deveria ser reclassificado como uma linhagem de *S. cerevisiae* ou permanecer como uma espécie a parte (MCFARLAND, 2010).

De acordo com PEDROSO, 2011 ainda há muitas controvérsias entre os pesquisadores sobre o real grupo taxonômico da *S. boulardii*. Foram utilizados diversos métodos diferentes para tentar comprovar a posição dessa levedura. Em 2002 MITTERDORFER *et al.* fez uma análise com o método da reação em cadeia de polimerase ou sequenciamento de rRNA e demonstraram que *S. boulardii* é indistinguível de outras linhagens de *S. cerevisiae*. Já em 2010 MCFARLAND analisou o polimorfismo em microsátélites e hibridização de retrotransposon o que indicou que *S. boulardii* pode ser diferenciada de outras linhagens de *S. cerevisiae*, por diferenças no metabolismo e fisiologia e pela habilidade de causar efeitos anti patogênicos.

EDWARDS-INGRAM *et al.* (2007), utilizando hibridização genômica comparativa para análise do genoma inteiro concluíram que *S. boulardii* e *S. cerevisiae* são membros da mesma espécie. Entretanto, apesar da semelhança genética, elas apresentam algumas diferenças metabólicas e fisiológicas. GRAFF *et al.* (2008) observou que a *S. boulardii* é extremamente semelhante geneticamente a *S. cerevisiae*, mas metabolicamente e fisiologicamente diferente, particularmente no que se refere ao crescimento e à resistência à temperatura de 37°C e estresse ácido, que são importantes características de um micro-organismo usado como probiótico.

A levedura *S. boulardii* tem sido testada em relação à eficácia clínica em diversos tipos de doenças agudas, incluindo diarreia associada ao uso de antibióticos, infecção por *Clostridium difficile*, diarreia do viajante e doença de

Crohn (MCFARLAND, 2010). Vários mecanismos de ação da levedura em infecções experimentais foram estudados. Experimentação animais e também em seres humanos foram realizadas, além de estudos in vitro, demonstram que a *S. boulardii* tem uma propriedade protetora e tem ações contra patógenos entéricos (CZERUCKA *et al.* 2007).

De acordo com MCFARLAND (2010). *S. boulardii* possui diferentes tipos de mecanismos de ação, podendo ser divididos em três principais meios: ação no lúmen intestinal, onde a levedura pode interferir com toxinas patogênicas, interagir com a microbiota normal, auxiliar no restabelecimento dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta e atuar como um regulador imunológico, tanto no interior do lúmen como sistematicamente; possui uma ação trófica além de efeitos de sinalização anti-inflamatórios na mucosa.

Não somente isso, IM e POTHOUKAKIS (2010), descrevem que a *S. boulardii* pode interferir na patogênese de doenças inflamatórias intestinais pela ação nas células T e na condição da diarreia por melhorar a bio-estrutura fecal.

3.6. Estudo cinético da fermentação

O objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é o de quantificar a taxa de crescimento celular, de consumo de substrato e formação de produtos e demais parâmetros relacionados, além de avaliar a influencia de fatores externos como pH, temperatura e etc. No caso da fermentação alcoólica esses valores são essenciais para se projetar adequadamente uma unidade industrial de produção de etanol (VIEGAS, 2003).

De acordo com Bailey e Ollis (1986), os modelos cinéticos normalmente usados em fermentações podem ser divididos em: não estruturados e não segregados, nos quais as células de micro-organismos são consideradas como soluto; estruturados e não segregados, onde as células são tratadas como seres individuais de múltiplos componentes, porém com composição média semelhante; não estruturados e segregados, onde as células são tratadas como seres individuais distintos, porém descritos por um único componente; e estruturados e segregados, onde as células de micro-organismos são considerados como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes.

Para o estudo da fermentação alcoólica, o modelo não estruturado e não segregado é o mais utilizado para descrever o comportamento das variáveis envolvidas.

A equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, que considera a presença de substrato como limitante para o crescimento (LUONG,1985). Na fermentação alcoólica, o rendimento de biomassa diminui com o aumento da concentração de etanol, indicando uma relação entre o rendimento da biomassa e a inibição pelo produto. O etanol começa a ter efeito inibitório na taxa de crescimento celular acima de 15g/L. A concentração máxima de etanol permitida, acima da qual as células não crescem foi predita em 112g/L (THATIPALAMA, ROHAI, HILL, 1992).

Tosetto (2002) analisou o comportamento cinético da cepa de levedura Y904 em nove diferentes matérias-primas provenientes de unidades produtoras de açúcar e álcool. Estudou-se as cinéticas de produção de etanol, células e de consumo de substrato, assim como o desempenho da cepa em cada matéria-prima com relação á produtividade e rendimento em etanol. Para a avaliação cinética, foram utilizados seis modelos do tipo não estruturado, os que mais se adequaram aos dados experimentais foram os modelos de Ghose e Thayagi (1979) e o de Jin *et al.* (1981), descritos por Tosetto (2002).

Vários ensaios foram realizados por Vasconcelos, Pinto e Silva (1992) e foi observado que a velocidade específica de produção de etanol esteve vinculada á velocidade específica de crescimento microbiano ate determinada fase da fermentação. Após essa fase, a diminuição da velocidade de crescimento microbiano não causou diminuição da velocidade específica de produção de etanol, mostrando que as mesmas não estão mais associadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

As matérias-primas, utilizadas na fabricação da cerveja foram: água potável filtrada, declorada e acidificada com solução ácido fosfórico 10%, malte de cevada, extrato de lúpulo, extrato de malte sem lúpulo Coopers Light / Claro, extrato de lúpulo HopAlpha Tetra, adquiridos em lojas especializadas pela internet. Levedura *S. boulardii* proveniente do medicamento Floratil® (200 mg). Foi adquirido em farmácia na cidade de João Pessoa. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química Orgânica Aplicada, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, e em parceria com o Laboratório de Produtos Fermento Destilados – LPFD/CT/UFPB.

4.2. Métodos

4.2.1. Produção do mosto

A produção do mosto foi realizada nas seguintes etapas, a etapa de moagem foi conduzida em moinho de dois rolos (MonsterMill®), com abertura de 0,8mm, a etapa de mosturação foi realizada em três paradas: a primeira a 64 °C por 60 minutos; a segunda a 69 °C por 20 minutos, com rampa de 5 min.; a terceira a 76 °C por 1 minuto, com rampa de 8 minutos. O consumo de amido foi verificado pelo reagente iodo 0,02 N. Após a mosturação, o mosto foi recirculado e filtrado, em tina de clarificação com fundo falso, onde a própria palha do malte fez o papel de filtro, até completar a clarificação.

O mosto clarificado foi transferido para a tina de fervura, e o resíduo da mosturação foi lavado com água filtrada, pré-aquecida (76°C) e com pH controlado (5,5), até que o líquido filtrado saísse da tina de clarificação na densidade específica de 1,010g/cm³. Após atingir fervura, o mosto permaneceu fervente durante 60 minutos, quando foi resfriado, utilizando-se um *chiller* de imersão com circulação de água gelada, até a temperatura de 15 °C. Após isso, o mosto foi fracionado em recipientes e armazenado em freezer com temperatura de -18°C.

4.2.2. Preparação do Inoculo

Para o preparo do inoculo foi descongelado 300ml do mosto previamente produzido. Após o descongelamento, o mosto foi fervido em erlenmeyer por 15 min para descontaminação. Então o mosto foi resfriado em banho de gelo e foi adicionado a ele 3 cápsulas do medicamento Floratil® (*Saccharomyces boulardii* – 17 liofilizada) totalizando 3 bilhões de células, sendo mantido em agitação magnética por 24 h, para a propagação.

4.2.3 Produção da cerveja

Foram descongelados 3 L do mosto, mantido a 0°C por dois dias, sendo o sobrenadante transferido para tina de fervura com mangueira atóxica acoplada em um tubo - sifão, para a seleção do mosto límpido. Logo em seguida foram adicionadas 12 gotas de extrato de lúpulo HopAlpha Tetra visando atingir um amargor de 10 IBUs, quantidade esta mínima de amargor para uma cerveja leve e clara. O mosto foi mantido em fervura por 15 min para descontaminação, resfriado em banho de gelo ate atingir a temperatura de 22 °C transferido para o tanque de fermentação.

Durante este processo, realizou-se a contagem de células em câmara de Neubauer do meio de propagação, visando saber o volume do inoculo a ser inoculado no mosto para de acordo com o White; Zainasheff, 2010, para obtermos no final 50 bilhões de células viáveis disponíveis para a fermentação. Adicionou-se 250 mL do inoculo no fermentador que foi mantido a uma temperatura de 19 °C para a fermentação. O envase foi realizado no 15º dia após o início da fermentação, realizado em garrafas de 300mL, previamente lavadas e sanitizadas com solução a 0,1% de desinfetante em pó a base de ácido peracético (PAC 200 - ADPRO). As garrafas foram fechadas com arrolhador manual e armazenadas em temperatura ambiente, por um período mínimo de 7 dias, e depois mantidas em geladeira ($4^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$) até o início das análises.

4.2.4 Análise fermentativa

Foi utilizado um fermentador com capacidade de 3 L de mosto. *Airlocks* foram utilizados para que o CO₂ pudesse ser eliminado durante a fermentação sem que o fermentado entrasse em contato com o ar, evitando contaminação e oxidação.

4.2.4.1 Crescimento celular

Foram coletadas amostras do mosto em fermentação a cada 4 h, até serem completadas aproximadamente 90 h de fermentação, todas em triplicata. As amostras foram coletadas através de uma torneira posicionada no meio do fermentador. As amostras foram analisadas através do método turbidimétrico, com o espectrofotômetro (NOVA – ABBE REFRACTOMETER) a 610nm. Como branco foi utilizado apenas o mosto sem a adição das leveduras, separado previamente e mantido em uma temperatura de aproximadamente 0°C para evitar contaminação. Para a obtenção da curva padrão foram submetidas a centrifugação (1020 g, rotor 12436, Centrífuga MPW-350, USA), em 8000 RPM por 6min das amostras coletadas, descartado o sobrenadante e o resíduo suspenso com soro a 0,9 % NaCl, sendo realizada cinco diluições seriadas de 1:1, para posterior leitura em espectrofotômetro a 610 nm. Sendo utilizado como branco apenas o soro a 0,9% NaCl.

4.2.4.2 Concentração do substrato

Foram coletadas amostras a cada 4h até serem completadas aproximadamente 90 h de fermentação, todas em triplicata. As medições foram realizadas utilizando-se um refratômetro previamente calibrado, e os resultados foram expressos em °Brix escala numérica de refração utilizada para determinar a concentração de sólidos solúveis da amostra analisada (IAL, 2008).

As medidas realizadas no refratômetro refletem a medida do extrato real, ou seja, são os sólidos solúveis mais o álcool etílico, sendo necessária

posterior correção da leitura. Estes resultados podem ser convertidos em densidade específica (SG), expressos em g/cm³, através da equação 1.

$$SG = 1,000019 + SS(0,003878634261280) \quad (1)$$

Onde SS= sólidos solúveis medidos em °Brix (Sparre's Brewery, 2017).

Para a medida da porcentagem de atenuação aparente foi utilizada a equação 2

$$(\% \text{ de atenuação}) = \frac{(OG-FG)}{(OG-1)} \times 100 \quad (2)$$

Onde OG é a densidade original do mosto antes da fermentação e FG é a densidade da cerveja após a fermentação (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

4.2.4.3 pH

Foram coletadas amostras a cada 4 h até que se completassem aproximadamente 90 h de fermentação. Foi obtido por medição direta com uso de pHmetro de bancada, calibrada com solução tampão de pH 4,0 e 7,0 (IAL, 2008).

4.2.4.4 Determinação da biomassa

A determinação da biomassa foi feita pelo método do peso seco. O peso seco consiste em utilizar um microtubo de massa conhecida e adicionar 2 mL do caldo fermentado. O microtubo foi submetido à centrifugação (10000 rpm por 10 minutos). Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi pesado e levado à estufa (OLIDEF-CZ) a 85 °C por 24h. Em seguida, o sedimento livre de umidade foi pesado. O procedimento foi realizado em triplicata. O peso seco foi determinado de acordo com a equação 3 (LIMA, 2001).

$$PS \text{ (g/mL)} = \frac{(\text{massa do microtubo} + \text{sedimento livre de umidade}) - \text{massa do microtubo}}{\text{volume da amostra}}, \quad (3)$$

Sendo PS = peso seco

4.2.4.5 Contagem e viabilidade das células

A contagem do número de células totais e viáveis, além da viabilidade celular foram realizadas por contagem em hemocítmetro na configuração de Neubauer, utilizando-se coloração diferencial das células pela solução de azul de metileno (0,1%), e analisado em microscópio binocular (Tecnal- Coleman, modelo N107), com aumento final de 400 X. A contagem de células foi realizada no inoculo, a cada 24 h durante a fermentação e na cerveja pronta (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). O cálculo da viabilidade é realizado segundo a equação 4, Para o cálculo de células totais/mL é utilizada a equação 5 e para o cálculo do valor de células viáveis/mL se utiliza a equação 6.

$$Viabilidade (\%) = \frac{(n^{\circ} \text{ total de células} - n^{\circ} \text{ células mortas})}{(n^{\circ} \text{ total de células}) \times 100} \quad (4)$$

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = n^{\circ} \text{ de cél contadas} \times 5 \times \text{Fator de diluição} \times 10^4 \quad (5)$$

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = n^{\circ} \text{ de cél Viáveis} \times 5 \times \text{Fator de diluição} \times 10^4 \quad (6)$$

4.2.4.6 Teste limite de atenuação

Com o mosto já pronto para fermentação foi retirada uma amostra de uma forma asséptica (200 mL), adicionados a 10g (aproximadamente 100 bilhões de células) da levedura *S. bouldarii* e deixado em agitação magnética por 24 horas. Visando atingir sua atenuação máxima do mosto. O resultado é expresso em FG (densidade final). O teste serve para saber o nível máximo de atenuação de uma levedura em determinado mosto (WHITE; ZAINASHEFF , 2010).

4.2.5 Caracterização físico-química da cerveja

4.2.5.1 Determinação de cor

Foi determinado segundo o método 9.6 da European Brewery Convention – EBC (2010), obtendo os resultados em EBC (Figura 1). Foi coletada uma amostra de aproximadamente 10 ml em triplicata da cerveja em

temperatura ambiente e foi realizada a descarbonatação utilizando o ultrassom por 20 min. Após a descarbonatação as amostras foram centrifugadas, por 10 min a 8.000 RPM e encaminhadas ao espectrofotômetro (NOVA – ABBE REFRACTOMETER) onde foram medidas a 430 nm e o branco sendo água destilada. Com o resultado da absorbância colocamos os valores na equação 7 para obter o resultado em EBC.

$$EBC = (Abs\ 430\ nm \times 12,7 \times d), \quad (7)$$

sendo $d = 1$ para as cervejas sem diluição.

MACRO DIVISÃO	SRM	TONALIDADE	EBC	CLASSIF.
Palha	2 - 3		3,94 - 5,91	Cerveja Clara até 20 EBC
Amarelo	3 - 4		5,91 - 7,88	
Ouro	4 - 5		7,88 - 9,85	
Âmbar	6 - 9		11,82 - 17,73	
Profundo âmbar / cobre luz	10 - 14		19,70 - 27,58	Cerveja Escuro ≥ 20 EBC
Cobre	14 - 17		27,58 - 33,49	
Profundo cobre/castanho claro	17 - 18		33,49 - 35,46	
Castanho	19 - 22		37,43 - 43,34	
Castanho Escuro	22 - 30		43,34 - 59,10	
Castanho muito escuro	30 - 35		59,10 - 68,95	
Preto	35 +		68,95 - 78,80	
Preto opaco	40+		>78,80	

Figura 1: Diagrama de cores para classificação dos tipos de cerveja

Fonte: Adaptado do BJCP, 2015

4.2.5.2 Determinação de açúcares redutores totais

Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) descrito por Santos (2007) e que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Agroindústria Tropical. Essa metodologia consiste na redução do ácido 3-

amino-5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo ácido carboxílico. O reagente DNS possui uma cor amarelada, após o aquecimento, torna-se avermelhado de acordo com a concentração de açúcares redutores presente na solução, o que permite sua leitura em espectrofotômetro a 540nm.

O teste foi realizado em triplicata. Pesou-se 0,5 g da cerveja e foi realizada uma diluição de acordo com o °Brix da cerveja, seguindo a Equação 8.

$$\frac{0,5ml \times (\text{Valor do } ^\circ\text{Brix} - 0,1)}{0,1}, \quad (8)$$

O resultado é a quantidade de água destilada em mL a ser utilizada para a diluição. Transferiu-se 1 mL desta diluição para um tubo de ensaio, juntamente com 1 mL de ácido clorídrico (HCl) á 1M e foi colocado em fervura por cinco minutos, depois foi adicionado 3mL de NaOH 1M e retirado uma alíquota de 1mL dessa solução, colocada em outro tudo de ensaio e adicionado 1 mL de DNS. Submeteu-se o tubo a 5 min em banho quente e resfriado em banho de gelo. Após o resfriamento foi adicionado 4 mL de água e com esta solução, realizou-se leitura em espectrofotômetro (NOVA – ABBE REFRACTOMETER) a 540 nm. Para o preparo do branco, no lugar de 0,5 mL da amostra, colocou-se 0,5 mL de água.

4.2.5.3 Teor alcoólico

O ebuliômetro foi utilizado para quantificar o teor de álcool em soluções mistas álcool-água, por meio da diferença entre as temperaturas de ebulição da água pura e da solução. Baseado nessa comparação foi possível determinar o percentual de álcool (v/v), com o auxílio de uma régua referencial (COSTA, 2010).

O equipamento conta com um condensador acoplado, assim como um termômetro para a medição da temperatura. Em seguida o pavio da lamparina foi aceso e aguardou-se entre 3 e 5 minutos para que a temperatura ficasse estabilizada. Anotou-se a temperatura e com o auxílio da régua de correção foi

determinado o teor alcoólico do fermentado. Ao término de cada leitura, o termômetro foi removido e o ebuliômetro foi lavado com água destilada.

4.2.6 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos analisados foram a velocidade específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), produtividade em células (P_x).

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi estimada pelo método de detecção da fase de crescimento exponencial.

A produtividade em células e o fator de conversão de substrato em células ($y_{x/s}$) foram determinados pelas Equações 9 e 10 (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P_x = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{t_f} \quad (9)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (10)$$

Onde:

$X_{m\acute{a}x}$ – Concentração máxima de células [g.L^{-1}]; X_0 – Concentração inicial de células [g.L^{-1}]; t_f – tempo final de fermentação [h]; $Y_{x/s}$ – Fator de conversão de substrato em células [g.g^{-1}]; S_0 – Concentração inicial de substrato [g.L^{-1}]; S – Concentração final de substrato [g.L^{-1}]; P_x – produtividade em células [$\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$];

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento Piloto

Inicialmente, foi utilizado o extrato de malte comercial, por teoricamente ser um extrato mais límpido, e gerar uma maior uniformidade para o

experimento, além de posterior padronização. O extrato de malte utilizado foi da empresa Coopers (*light* claro, sem lúpulo), No primeiro teste de fervura, observou-se a presença de precipitados, que foram removidos após o resfriamento. Após a preparação do inóculo todo conteúdo foi adicionado ao extrato de malte, mantido a uma temperatura de 22°C, onde continha $5,65 \times 10^8$ de células/mL com um °Brix inicial de 11,9. Foram realizadas coletas para a verificação do consumo de extrato ao longo de 72h de fermentação e observou-se que a cerveja parou de atenuar em 8,3 °Brix, ou seja, o processo fermentativo não se completou. Na figura 2 estão representados os valores obtidos ao longo da análise.

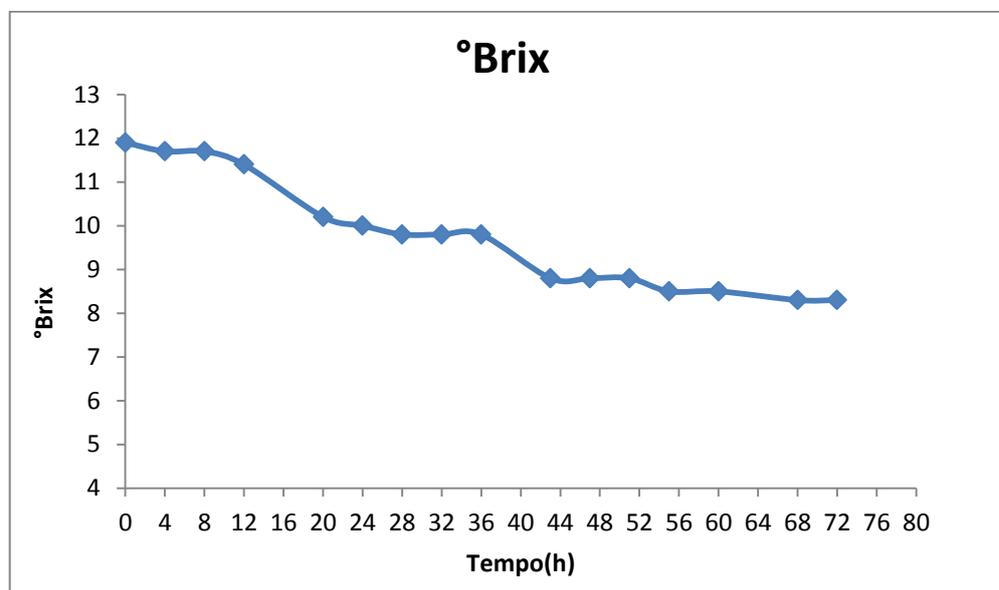


Figura 2: Consumo do substrato (°Brix) pelo tempo de fermentação no primeiro experimento piloto. Fonte: Autor

Como a levedura usada tinha atenuado o mosto em testes prévios acreditou-se que o motivo pelo qual a cerveja não atenuou tenha sido o extrato de malte utilizado para a fermentação. Foi realizado o teste limite de fermentação e o valor da leitura da densidade após 24 horas foi de $1,033 \text{ g/cm}^3$, mostrando que este extrato possui baixa fermentabilidade.

Optou-se por um segundo experimento piloto, substituindo o extrato de malte pelo mosto cervejeiro que foi produzido e filtrado de acordo com descrito na metodologia, de densidade $1,038 \text{ g/cm}^3$ que manteve a limpidez necessária

para a realização das análises fermentativas e, após o teste limite fermentação, apresentou o valor de densidade de $1,009 \text{ g/cm}^3$, após 24 horas.

Após a inoculação do fermento, uma contagem de células foi realizada no tempo zero. Foi inoculado 450 bilhões de células viáveis, o que é maior do que o esperado (50 bilhões). Na Figura 3, pode observar o gráfico de concentração celular feito com os valores de absorbância. Devido ao número de células inoculadas, foi decidido realizar um novo experimento onde foi realizado o cálculo da taxa de inóculo, antes de introduzir o fermento no mosto, pra obter uma estimativa do número de células produzidas ao final da propagação da levedura, visando inocular a quantidade ideal (50 bilhões de células ou $1,80 \text{ milhões de células/mL}^\circ\text{P}$) para a quantidade de cerveja a ser produzida (3 litros).

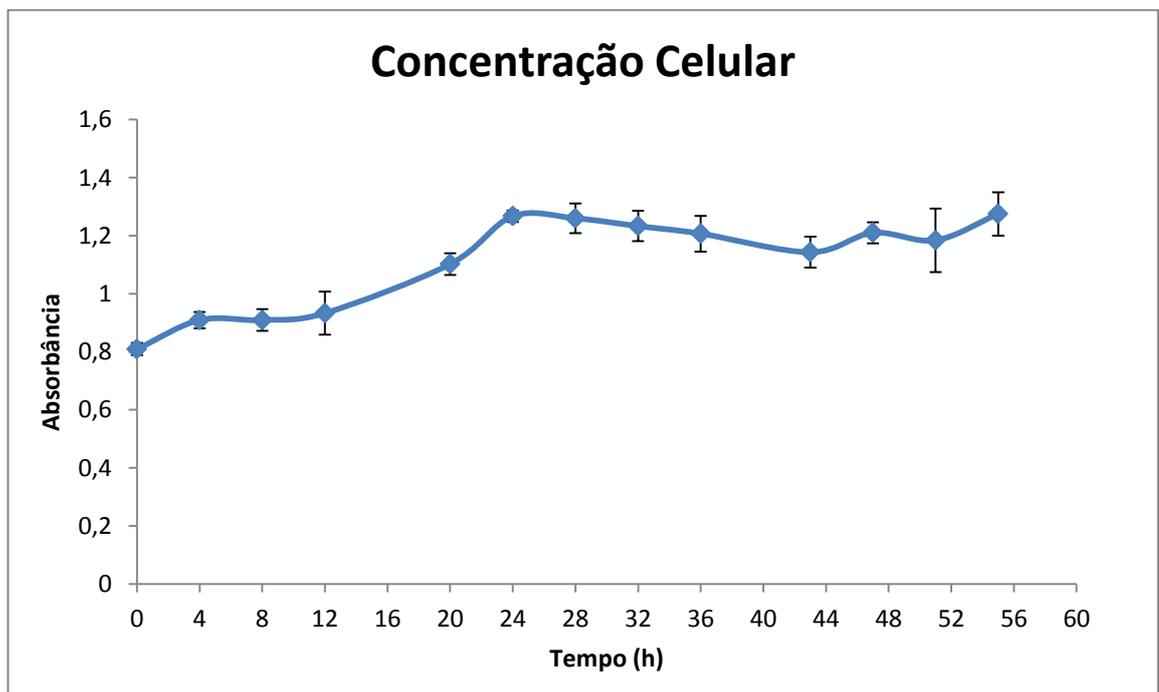


Figura 3: Absorbância por tempo do processo fermentativo no segundo experimento piloto.

Fonte:Autor

Os experimentos pilotos foram realizados a fim de ajustar as melhores condições para o processo fermentativo, devido ao fato da levedura *S. bouldarii* não ser uma levedura cervejeira.

5.2 Terceiro experimento

O mosto cervejeiro utilizado foi o mesmo do segundo experimento piloto (9,3 °Brix), mas antes de inocular a levedura no mosto, foi realizada a contagem de células e cálculo de viabilidade do inoculo propagado. Foi coletado do recipiente de propagação um volume suficiente para que haja 50 bilhões de células no fermentador, para 3 litros de mosto (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Os resultados da redução do pH para o experimento final estão apresentados na Figura 4.

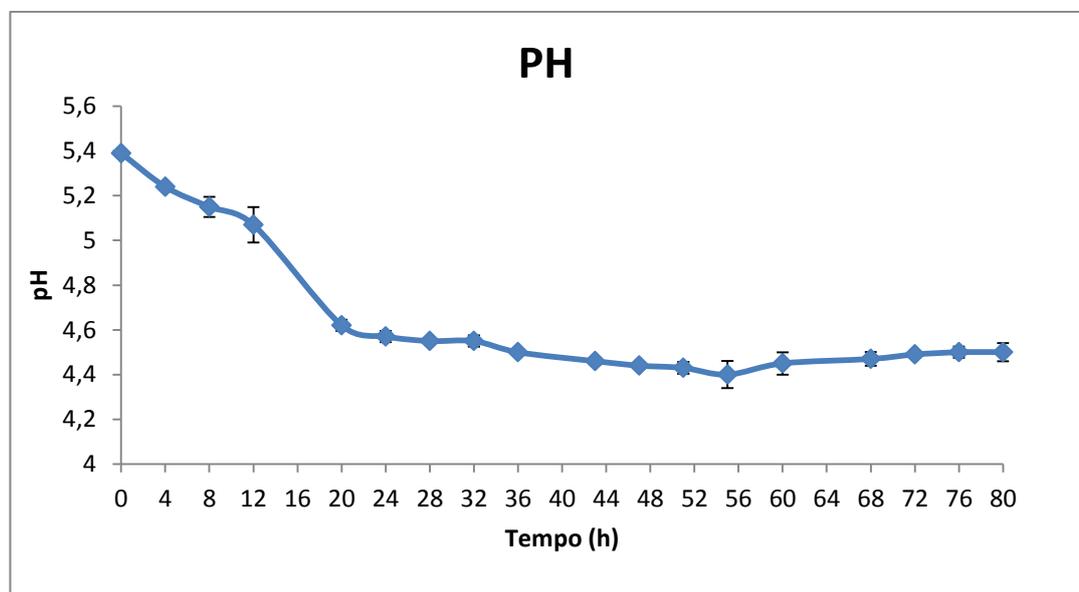


Figura 4: Valores do pH pelo tempo de fermentação. Fonte: Autor

Pode-se observar na figura 4 que a *S. boulardii* se comporta de forma semelhante às leveduras cervejeiras tradicionais, *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*, como observado nos experimentos de Barreto (2017). Ainda que, o pH 4,5 é similar ao das cervejas comerciais (BARRETO, 2017).

No início da fermentação o pH foi de 5,4 e no decorrer do processo fermentativo ele redziu exponencialmente até atingir o valor de 4,5 ao atingir 36 horas de fermentação, e permaneceu nesta faixa (4,4-4,5) até o final do processo. Logo, durante a fermentação o pH diminui em uma unidade. Segundo Aquarone *et al.* (2001), com o aumento da concentração de CO₂, bem

como com a produção de ácidos orgânicos, na fase anaeróbica do metabolismo das leveduras, é comum e esperado haver diminuição dos valores de pH.

Alguns autores sugerem que a superexpressão de genes relacionados à síntese de proteínas e respostas a estresses bióticos, poderiam contribuir para o aumento da taxa de crescimento e melhor sobrevivência de *S. boulardii* ao pH ácido (EDWARDS-INGRAM *et al.* 2007).

Segundo a FERMENTIS (2017) a levedura cervejeira *S. cerevisiae* se comporta de forma exponencial em relação à porcentagem de atenuação, no entanto *S. boulardii* demonstrou um comportamento próximo da linearidade, que pode ser explicado pela falta de adaptação da levedura com o mosto cervejeiro. Logo, foi observado que para *S. boulardii*, a curva de atenuação aparente (Figura 5), não apresentou comportamento exponencial característico das leveduras adaptadas ao processo fermentativo.

Às 96 horas de fermentação, a atenuação aparente registrada foi de 59 %, os sólidos solúveis foi de 3,8 °Brix (1,015 g/cm³). Após este momento, os sólidos solúveis medidos permaneceram constantes até o envase. O limite máximo de atenuação de *S. boulardii* neste mosto é de 1,009 g/cm³, o que daria uma atenuação máxima de 76 %, mostrando que, nas condições avaliadas da fermentação, essa levedura pode se enquadrar na categoria de baixa atenuação (WHITE; ZAINASHEFF 2010).

Para confirmação dessa capacidade atenuativa, faz-se necessário realizar novos experimentos em temperaturas maiores (21-24°C) e com densidades originais maiores (1,050-1,060 g/cm³). Esses resultados sugerem que *S. boulardii*, apesar de possuir uma atenuação mais linear, apresentou uma boa capacidade fermentativa, nas condições testadas.

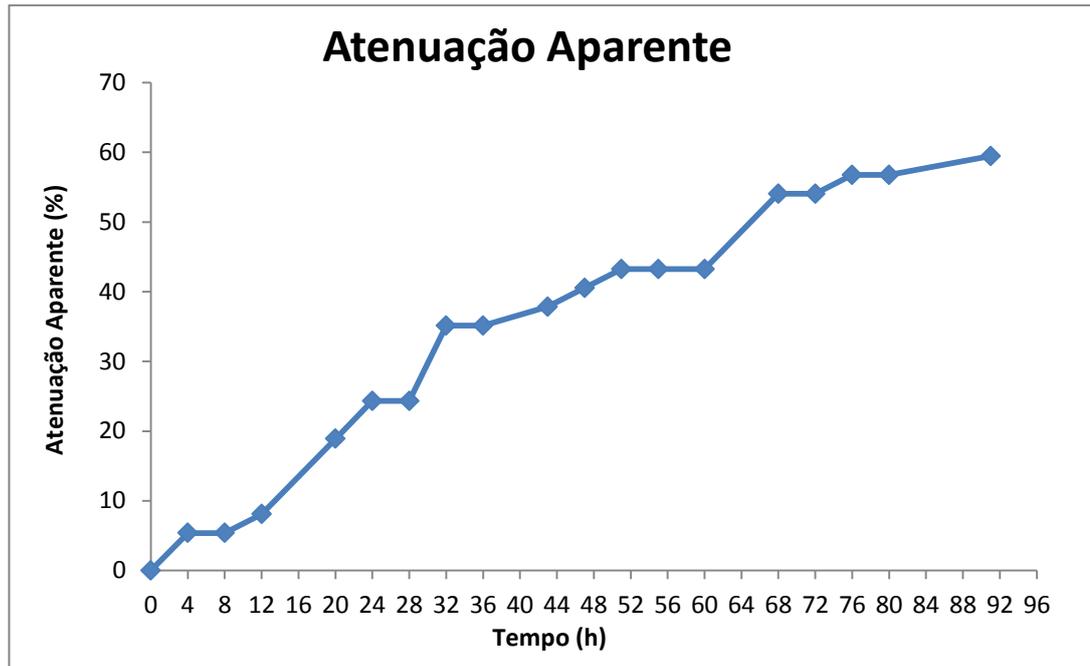


Figura 5: Gráfico da porcentagem de atenuação aparente por tempo de fermentação

Pode-se observar na Figura 7 a curva de calibração da diluição do ponto 28 da Figura 6. Selecionou-se este ponto, pois é o momento de maior concentração ao longo do processo fermentativo. A amostra foi diluída em série, cinco vezes, com proporção de 1:1. Após as diluições, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro e foi realizado um gráfico de absorbância X (Fatores de Diluição). Em seguida, conhecendo os valores de absorbância, o maior resultado dessa diluição foi correlacionado com a maior massa do processo fermentativo, adquirido pela análise do peso seco (Tabela 2).

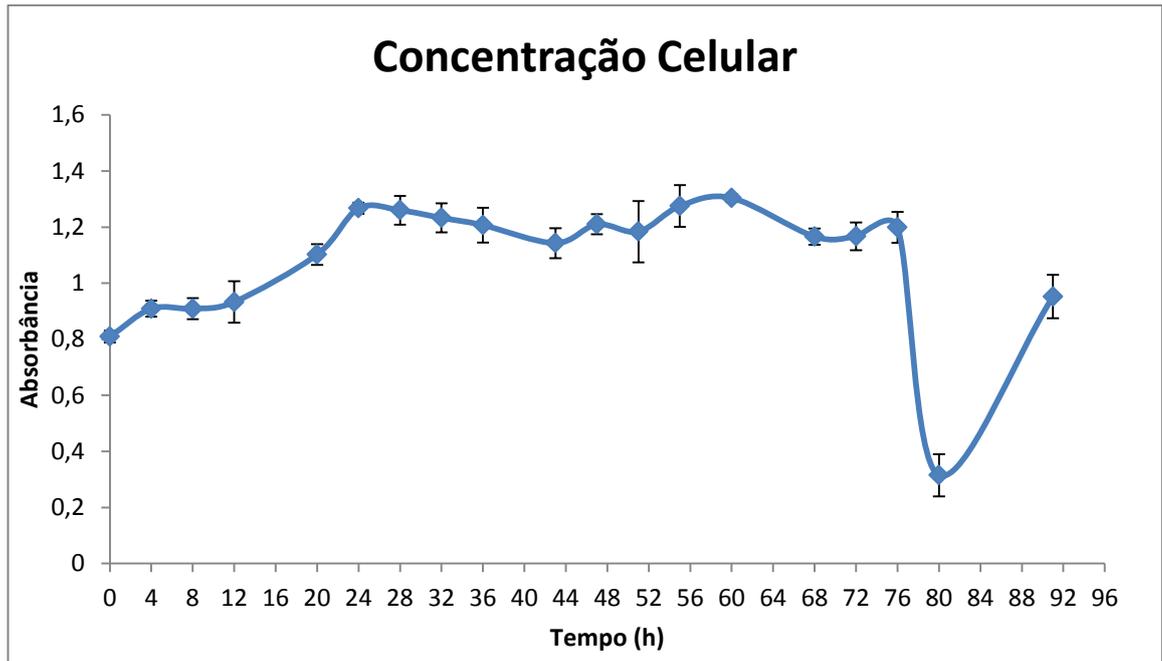


Figura 6: Gráfico da concentração celular pelo método da absorbância pelo tempo de fermentação. Fonte: Autor

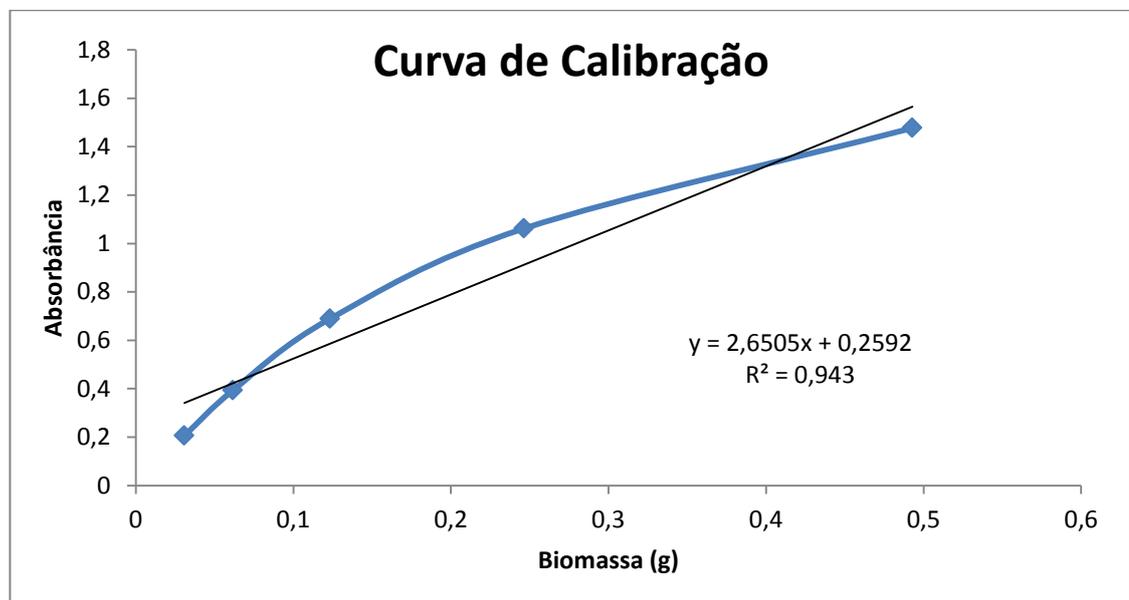


Figura 7: Curva de calibração relacionando a maior absorbância do processo fermentativo com sua biomassa. Fonte: Autor

Com a correlação entre absorvância e biomassa, foi obtida a equação da reta (Figura 7), a fim de podermos converter valores de absorvância em valores em gramas com um grau de confiabilidade de 94%. Com a equação da reta conhecida, o gráfico da Figura 8 foi construído, comparando a biomassa celular com o consumo de substrato em °Brix no decorrer do tempo de fermentação.

Ao comparar os resultados de *S. boulardii* observados na Figura 8 com a *S. cerevisiae* da Fermentis (cepa S-04) realizado por Fernandes (2017). (Figura 9) pode-se observar que a levedura comercial S-04 iniciou seu processo de floculação às 32 horas após o início da fermentação. *S. boulardii*, apenas inicia o processo nas últimas horas de análise, após 72 horas, mostrando que a levedura S-04 inicia seu processo de floculação antes do que *S. boulardii*.

Tabela 2: Valores das análises de peso seco em pontos específicos durante a fermentação.

	Peso seco (g/mL)
Ponto 28	0,49285
Ponto 32	0,46480
Ponto 36	0,45415
Ponto 43	0,46040
Ponto 47	0,45465
Ponto 51	0,45780

Fonte: autor

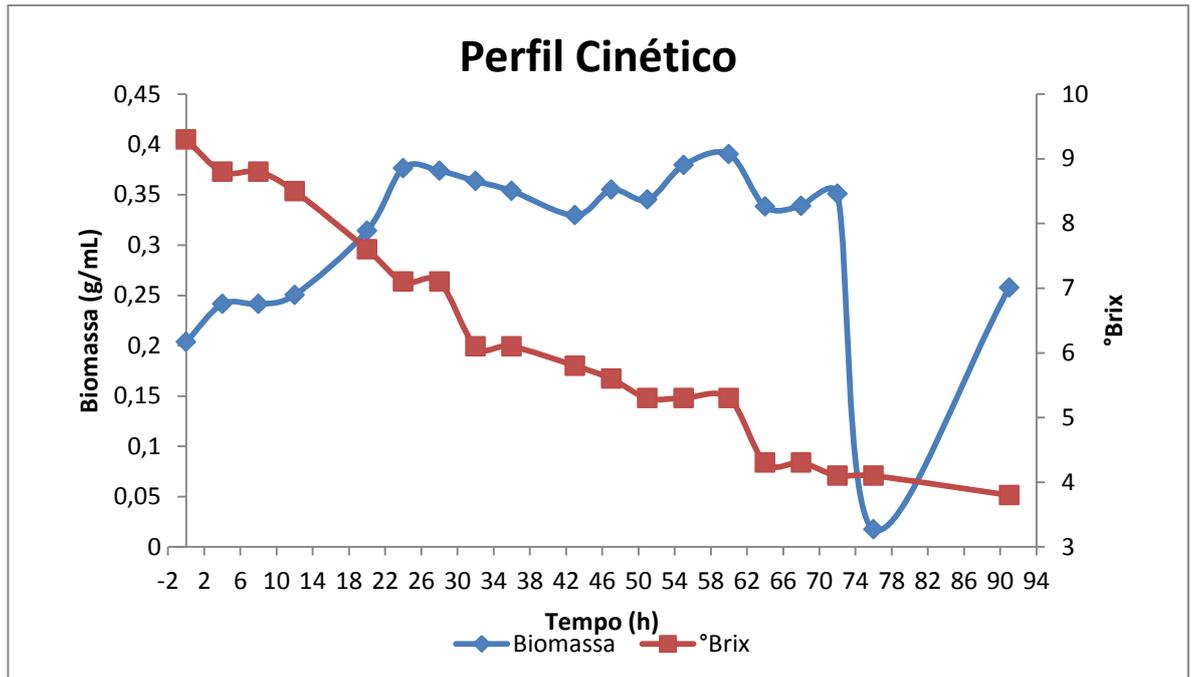


Figura 8: Correlação desenvolvida através da equação da reta, entre o valor da biomassa e o consumo de substrato ao longo do processo fermentativo. Fonte: Autor

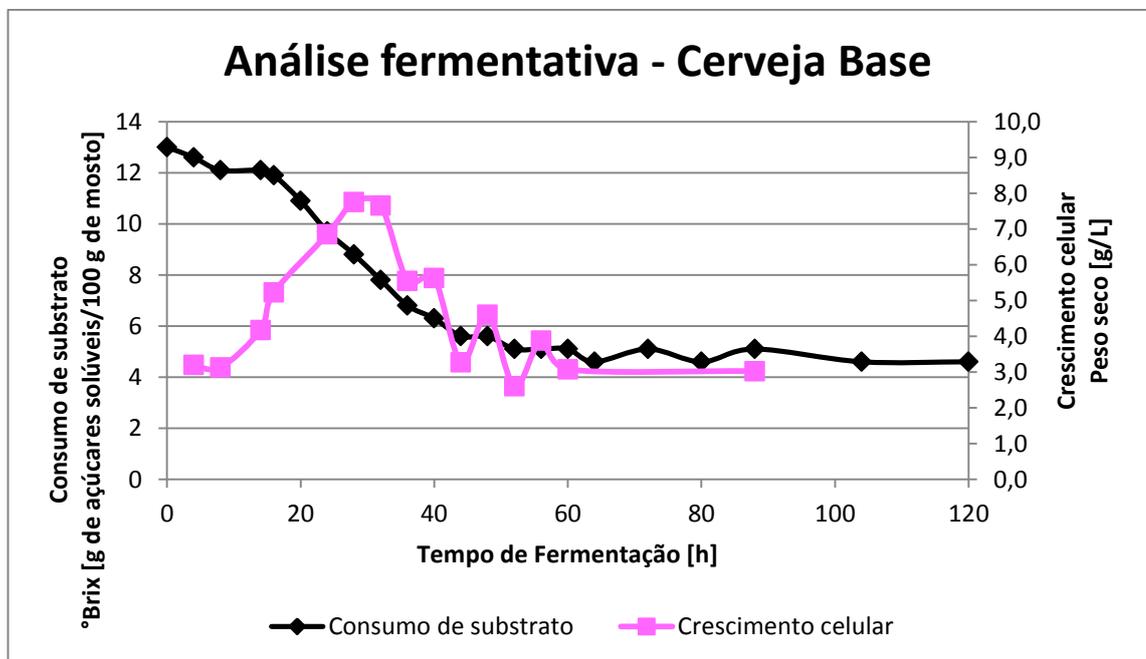


Figura 9: Correlação desenvolvida por Fernandes (2017).

Ao ser calculado a tangente das fases crescentes da curva, obteve-se a equação da reta, onde o coeficiente angular corresponde a velocidade específica de crescimento (Figura 10). Logo, a fase que melhor representa o crescimento é das 12h até às 24h, totalizando 3 pontos.

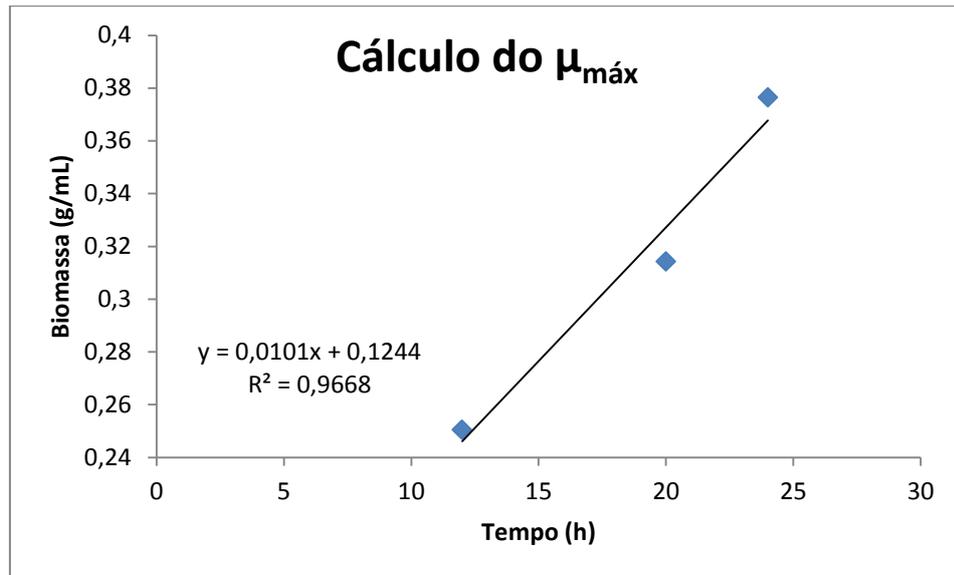


Figura 10: Linha de tendência linear para obtenção do $\mu_{\text{máx}}$ (velocidade específica de crescimento celular), para fase mais próxima da exponencial do experimento. Fonte: Autor

O $\mu_{\text{máx}}$ é o coeficiente angular da reta, ou seja, $\mu_x = 0,0101 \text{ h}^{-1}$. Quando comparado com Fernandes (2017) pode-se observar que o resultado da velocidade específica de crescimento obtido com *S. boulardii* foi menor do que a obtida com *S. cerevisiae* (S-04, Fermentis) ($\mu_{\text{máx}} = 0,2352 \text{ h}^{-1}$), ou seja, *S. boulardii* tem um crescimento mais lento.

O coeficiente angular da reta da Figura 11 equivale ao valor da velocidade média de consumo de substrato (V_m), ou seja, $V_m = 0,1161 \text{ g/L.h}$. Comparando com os dados de Fernandes (2017), ele obteve o seguinte resultado: $V_m = 0,2889 \text{ g/L.h}$. A fermentação de *S. boulardii* é mais lenta em relação ao consumo de substrato do que *S. cerevisiae* (S-04- Fermentis).

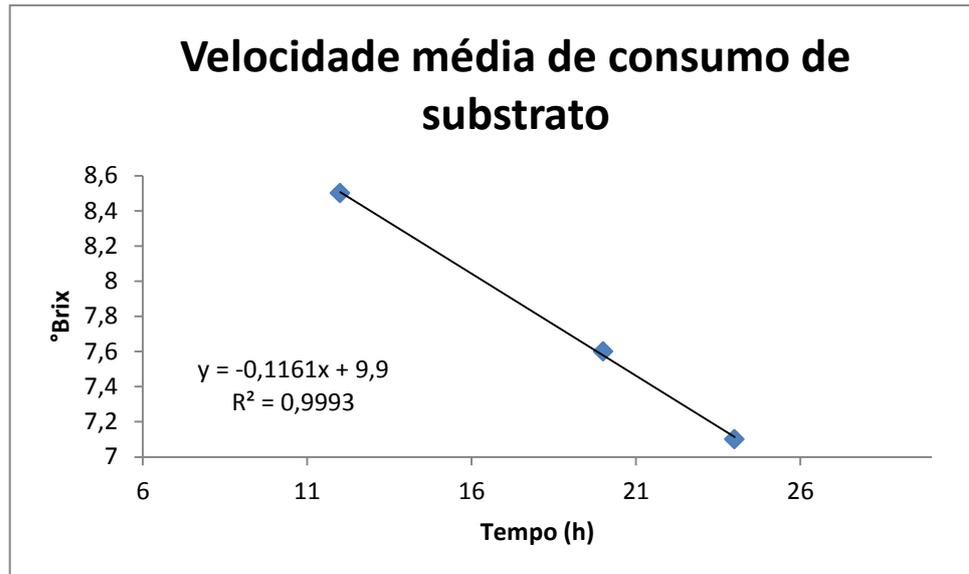


Figura 11: Linha de tendência linear para a obtenção da velocidade média de consumo de substrato (V_m). Fonte: Autor

Na Tabela 3 podemos observar o valor da produtividade em células e os valores dos fatores de conversão de *S. boulardii* no processo fermentativo.

Tabela 3: Valores do fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e produtividade em células (P_x)

Parâmetro	Unidade	Resultados
$Y_{x/s}$	g_x/g_s	0,19548
P_x	$g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	0,02050

Fonte: autor

O resultado obtido para a análise de produtividade em células com a *S. boulardii* foi de $0,02050 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, quando comparamos esse valor com o obtido por Fernandes (2017) ao analisar a *S. cerevisiae* S-04 produzida pela Fermentis ($P_x = 0,0875 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), observamos que a *S. boulardii* teve uma menor produtividade em biomassa, isso pode ter sido proveniente a diferença de temperatura de fermentação, Fernandes (2017) fermentou a *S. cerevisiae* á 22°C e a *S. boulardii* foi fermentada a 19°C .

Em Malta, 2006 foram calculados o valor de conversão do substrato em células em quatro diferentes ensaios com *S. cerevisiae*, os valores obtidos foram $0,07 \text{ g/g}$; $0,10 \text{ g/g}$; $0,22 \text{ g/g}$; $0,36 \text{ g/g}$. Os resultados obtidos com a *S. boulardii* estão de acordo com os obtidos por Malta (2006).

Na figura 6 pode ser observado um ponto discrepante na curva 80 horas, o que não é observado durante os demais horários de análise. O erro no resultado às 80 h, pode ter ocorrido devido a problemas técnicos na UFPB no momento da análise, por queda de energia.

A fermentação pode ser dividida em três etapas. A primeira etapa é a de latência, caracterizada pelo pouco crescimento celular, como observado na Figura 6 nas primeiras 6 primeiras horas de fermentação. A segunda fase as células entram em crescimento exponencial onde há o maior consumo de açúcar e a produção de etanol. Na Figura 6 podemos observar esse crescimento durante às primeiras 24 horas de fermentação, onde chega ao máximo o valor da absorbância.

Após esses valores, o número total de células nas amostras chega à etapa estacionária das células para a fermentação. Isso pode ser observado durante as demais horas do processo de fermentação que o valor da absorbância se mostra constante até chegar ao último ponto às 91 horas, que evidencia o processo de floculação, já que o valor da absorbância ($A = 0,952$) é próximo ao final de estágio de latência ($A = 0,933$, 12 h). Este processo é irreversível, e faz com que algumas células de leveduras se juntem formando agregados (GUIDO *et al.*, 2004). Segundo Dequin (2001) para a produção de cerveja a floculação é importante para a obtenção de um produto claro e de bom aroma.

A eficiência da fermentação e o perfil da qualidade do produto final estão intimamente ligados à quantidade e a saúde da levedura utilizada (BRIGGS *et al.*, 2004). Portanto, avaliar e prever a viabilidade da célula, bem como o desempenho da levedura durante a fase de fermentação é um requisito importante (CARVALHO *et al.*, 2008).

Na Tabela 4 pode-se observar as concentrações celulares durante os primeiros dias de fermentação apresentando o valor máximo de células 6×10^7 células/mL, com 86% de viabilidade, no terceiro dia de fermentação. Após essa fase as células começaram a flocular, diminuindo a quantidade e viabilidade, diminuindo o consumo de extrato.

Tabela 4: Quantidade e viabilidade das células de leveduras de *Saccharomyces boulardii*, nos dias de fermentação (1-4) e na cerveja pronta depois de engarrafada e pronta para consumo.

	N° total de células/ mL	Viabilidade (%)
Dia 1	1,09 x 10⁷	71%
Dia 2	3,85 x 10⁷	53%
Dia 3	6 x 10⁷	89%
Dia 4	3,65 x 10⁷	62%
Cerveja engarrafada ¹	1,72 x 10⁷	86%

¹ A análise foi realizada 15 dias após o envase. Fonte: Autor

Na Tabela 4 também pode-se observar que, mesmo após o envase, as células de *S. boulardii* continuaram viáveis, indicando que a cerveja possui células viáveis suficientes para apresentar propriedades probióticas. A ANVISA determina que para um alimento ser probiótico ele precisa ter um número mínimo de 10⁸ a 10⁹ unidades formadoras de colônias (UFC) (ANVISA, 2017).

Levando em consideração que uma cápsula do medicamento Floratil[®] liofilizado contém 10⁹ células viáveis, seriam necessários 67,6 mL da cerveja para equivaler a esta mesma quantidade de células.

Depois de engarrafada e refrigerada, foram realizadas as análises físico-químicas da cerveja, todas em triplicata e as médias dos resultados estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados das análises físico-químicas realizadas na cerveja engarrafada.

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	
Determinação de cor (EBC)	9,15 ± 0,0105
Teor Alcoólico (ABV)	4,5 % ± 0,1527
Açúcares Redutores	7,76 g/L ± 0,0025
Sólidos solúveis (°Brix)	2,8

Fonte: Autor

O resultado para determinação de cor da cerveja engarrafada foi de 9,15 EBC. Na Tabela de cores (Figura 1), equivale à tonalidade ouro, uma cerveja clara. Esse resultado pode se enquadrar em alguns estilos tipo *ale* apresentadas no BJCP (*Beer Judge Certification Program*) (BJCP, 2015). A análise de teor alcoólico pelo ebuliômetro apontou para um teor alcoólico de 4,5 % ABV. Esse valor diverge do resultado teórico calculado, que seria 3,4% ABV (SMITH, 2017).

Segundo Goiana (2016), em seus experimentos analisando cinco tipos de cervejas artesanais do Ceará, fermentadas com *S. cerevisiae*, os autores observaram que uma das marcas analisadas obteve o resultado de 7,3 g/L de açúcares redutores, sendo semelhante ao resultado obtido neste trabalho. Já quando comparamos o resultado obtido com Fernandes (2017), observamos uma grande diferença no valor obtido (21,5 g/L). Essa diferença pode ser atribuída à adição de acerola na cerveja analisada por Fernandes (2017), aumentando, assim os açúcares redutores.

A cerveja produzida com *S. boulardii* é viável do ponto de vista fermentativo, nas condições utilizadas neste trabalho. A fermentação apresentou uma boa descrição das fases, mostrando que a floculação é mais lenta que algumas cepas comerciais, mas que deve ser comparada a uma

cepa de cerveja tipo “Weissbier”, uma cerveja cuja levedura é de baixa floculação.

Com relação à atenuação, apesar de considerada baixa, faz-se necessário um experimento com um mosto de OG maior e temperaturas de fermentação maiores, para melhor análise. A cerveja produzida é uma cerveja de baixo teor alcoólico e que apresentou um bom número de células viáveis na garrafa, podendo ser futuramente avaliada quanto ao potencial probiótico. É necessário também realizar testes sensoriais de aceitação, mas, do ponto de vista geral, a cerveja feita com *S. boulardii* não apresentou *off flavors* e possui características da leve presença de fenólicos, levemente frutada, semelhante a uma cerveja “Weissbier”, com características próprias.

6 CONCLUSÃO

Com esse trabalho foi possível observar que *S. boulardii* apesar de não ser uma levedura cervejeira possui um bom comportamento quando colocada em condições de fermentação cervejeira, produzindo uma cerveja de qualidade.

A levedura mostrou um bom delineamento das etapas de fermentação nas primeiras 96 horas analisadas, demonstrando as etapas de forma clara e uma floculação mais lenta, mas eminente. Foi observada uma fermentação um pouco mais lenta que leveduras cervejeiras usuais, mas constante, atenuando 59 % do mosto às 96 h. Os demais parâmetros como o valor de pH (4,5), o teor alcoólico (4,5 % ABV) e a coloração (9,15 EBC) estavam similares aos resultados obtidos normalmente com *S. cerevisiae*.

Também foi observado que a levedura, mesmo depois do envase, apresentou um 1 bilhão de células viáveis por 68 mL de cerveja, indicando um possível potencial probiótico da cerveja, sendo necessários novos testes para comprovar esse potencial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia na produção de alimentos**. Vol. 4. Editora Blücher, São Paulo, 523 p., 2001.

BARRETO, M. C.; OLIVEIRA, H.G.D. **Monitoramento das propriedades físico-químicas de cerveja artesanal**. 57° congresso Brasileiro de química, Gramado/ RS, 2017.

BELTRAMELLI, M. APCV. Associação Portuguesa dos Produtores de Cerveja. 2012. **Cervejas, brejas e birras**. 2.ed. São Paulo: Leya, 2014.

BONACCORSI, M. M. **Guia de estilos de cervejas BJCP 2015**. Disponível em <<http://www.brauakademie.com.br/assets/bjcp-2015-beer-pt-br.pdf>>. Acesso em 25 Out 2017

BRASIL – **ALIMENTOS BEBIDAS E FUMO: CERVEJAS**, São Paulo: Instituto Lafis, 2007.

BRASIL. **Decreto n. 2314**, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da União, DF, 05 set. 1997.

BRIGGS, D. E.; Boulton, C. A.; Brookes, P. A.; Stevens, R. **Brewing: Science and Practice**, Cambridge: CRC Press. 2004

CARVALHO, G. B. M.; Silva, D. P.; Bento, C. V.; Vicente, A. A., Teixeira, J. A.; Felipe, M. G. A.; Almeida e Silva, J. B. **Banana as adjunct in beer production: Applicability and performance of fermentative parameters**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 155, 53-62. (2008).

CERVBRASIL, **Associação Brasileira da Indústria da Cerveja**. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf> Acesso em: 4 out. 2017

- COSTA, M. R. **Estudo comparativo das hidrolises ácidas e enzimas de matérias primas amiláceas visando a obtenção de etanol.** Alagoas, Programa de Pós – Graduação em engenharia química, UFAL, 2010. Dissertação de mestrado, 108 p.
- COUTINHO, C. **Portal cervesia . História da Cerveja**, 2016. Disponível em:<<https://www.cervesia.com.br/historia-da-serveja/71-a-serveja-no-brasil-de-1800-a-1850-seculo-xvii-a-xix.html>> . Acesso em: 09 Nov.2017.
- CZERUCKA, D.; Piche, T; Rampal, P. Review Article - **Yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii***. Aliment Pharmacol Ther, 2007
- DANTAS, V.N. **A trajetória da cultura cervejeira e sua introdução no Brasil.** Trabalho de Conclusão de curso, Bacharelado interdisciplinar em ciências humanas, Universidade federal de Juiz de Fora, 2016.
- DEQUIN, S. **The potential of genetic engineering for improving brewing,winemaking and baking yeasts.** Applied Microbiology Biotechnology. 2001
- EDWARDS-INGRAM, L.; GITSHAM, P.; BURTON, N.; WARHURST, G.;CLARKE, I.;HOYLE, D.; OLIVER, S.G.; STATEVA, L. **Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*.** Appl. Environ. Microbiol. 2007.
- IM, E.; POTHOUKAKIS, C. **Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research.** Gastroenterology. 2010.
- FERMENTIS. **Tips and tricks Active dry yeast and fermentation explained to brewers.** Disponível em: <https://fermentis.ovh/wp-content/uploads/2017/09/Brochure_Tips_and_Tricks_GB_web_planche-bd.pdf> Acesso em: 13 nov. 2017.

FERNANDES, L. M. **Produção sensorial de cervejas com acerola (*Malpighia emarginata* DC)**. Dissertação de mestrado – Pós-Graduação em engenharia química, Universidade Federal da Paraíba, 2017.

FREITAS, A. G. **Relevância do mercado cervejeiro Brasileiro: avaliação e perspectivas e a busca de uma agenda de regulação**. Pensamento e Realidade , 2015

FLORASTOR, 2017. Disponível em <<http://www.florastor.com>> Acessado em 28 out. 2017

GOIANA, M. et al. **Analises Físico- químicas de cervejas artesanais pale ale comercializadas em fortaleza, Ceará**. XXV Congresso brasileiro de ciências e tecnologia de alimentos. Outubro 2016 Gramado/RS

GUIDO, L. F., Rodrigues, P. G., Rodrigues, J. A., Goncalves, C. R., & Barros, A. A. **Food Chemistry**. 2004

IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo: IAL, 2008.

JACKSON, M. **Cerveja**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Zahar. 2007

KEGELE, F. C. O. et al. ***Saccharomyces boulardii*: novas perspectivas para a terapeuta em diarreia aguda**. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4243>. Acesso em 01 Nov. 2017

MALTA, H. L. **Estudo de parâmetros de Propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. Dissertação (mestrado) – pós-graduação em ciências de alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006

- MARTINS, F. S. **Efeito de dois probióticos, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG 905, na resposta inflamatória 84 induzida por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. *Typhimurium*.** Tese (Doutorado) - Programa de pós-graduação da faculdade de medicina, Universidade federal de Minas Gerais, 2008.
- MCFARLAND, L.V. **Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients.** World J. Gastroenterol. 2010.
- MEGA, J. et al. **A produção da cerveja no Brasil.** Citino, Número 1, 2011.
- MITTERDORFER, G.; MAYER, H.K.; KNEIFEL, W.; VIERNSTEIN, H. **Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques.** J. Appl. Microbiol. 2002.
- MORADO, R. **Larousse da cerveja.** 1ª Edição. São Paulo: Lafonte, 2009.
- OLIVEIRA, N. A. M. **Leveduras utilizadas no processo de Fabricação da cerveja.** Monografia – Pós-Graduação em microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011
- OTTERER, M. ; REGITANO-D'AREE, M. A. B.; SPOTO; M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos.** 1. ed. São Paulo: Manole, 2006
- PEDRODO, S. H. S. P. **Ação probiótica da levedura *Saccharomyces Boulardii*.** Monografia – Curso de especialização em microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAM, E.C.S. **Fungos: As Leveduras. In: Microbiologia** vol.1, pp. 345-366. McGraw-Hill, Brasil, 1981.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2ª Ed, v. 1, São Paulo: Pearson, 2004. 524p.

PORTAL CERVESIA. **Notícias de mercado Microcervejarias**. Disponível em <<https://www.cervesia.com.br/noticias-de-mercado-microcervejarias/2021-rasil-chega-%C3%A0-500-microcervejarias-em-2017,-aponta-levantamento-do-instituto-da-cerveja.html>> . Acesso em: 15 nov. 2017

REECK, C. B. et al. **Desenvolvimento e avaliação dos parâmetros cinéticos na fermentação de cerveja aromatizada**. Disponível em:<https://www.researchgate.net/profile/Estevan_Bruginski2/publication/277889944_Desenvolvimento_e_avaliacao_dos_parametros_cineticos_na_fermentacao_d_e_cerveja_aromatizada/links/5575c99b08ae75363751a168/Desenvolvimento-e-avaliacao-dos-parametros-cineticos-na-fermentacao-de-cerveja-aromatizada.pdf> Acesso em: 30 out. 2017

ROCHA, J. R. T. **Fermentação Alcoólica na indústria cervejeira**. Trabalho de conclusão de curso – Bacharel em Físico-química, Instituto superior de educação, Praia, 2006

SANTOS, M. **Estudo da competência de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura para a produção de etanol**. Dissertação (mestrado) – Pós-Graduação em engenharia química, Universidade Federal de Goiás, 2017

SANTOS, S. P. **Os Primórdios da Cerveja no Brasil**. São Paulo: Aeliê Editorial, 2003.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de cajú como substrato**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN. 2007.

SINDICERV. Cerveja e saúde. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br/cerveja-saude.php>>. Acesso em 28 set. 2017.

SOUZA, W. et al. **Avaliação físico-química de cervejas tipo pilsen**. 1º Congresso Químico do Brasil, Paraíba, 2010.

SPARRE´S BREWERY. **Plato, SG and Brix conversion formulas**. Disponível em: <<https://biohazardbrewery.wordpress.com/brewing-links/brewery-math/plato-sg-brix-conversion-formulas/>> Acesso em: 12 nov. 2017.

SMITH, B. J. **BeerSmith Home Brewing Software, Recipes, Forum, Blog, Podcast and More**. Disponível em: <<http://beersmith.com/>>. Acesso em: 05 de maio de 2017

THE BEER TIMES. **Louis Pasteur e Emil Christian Hansen, Os médicos da cerveja**. 2016. Disponível em: <<https://www.thebeertimes.com/2016/10/30/louis-pasteur-y-emil-christian-ansen-los-doctores-de-la-cerveza/>> Acesso em: 10 nov. 2017

TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Dissertação (mestrado), 2002.

VASCONCELOS, J. N.,PINTO, V. C., SILVA, R. A. Fermentação alcoólica industrial: **Modelagem e simulação do processo descontínuo alimentado**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Salvador-BA. 1992.

VENTURINI, W. G. F. ; CEREDA, M. P. Cerveja. In AQUARONE W.B., et al. **Biotecnologia industrial: Biotecnologia na produção de alimentos**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. 2001, p. 91- 144.

VIEGAS, M. C. **Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes**. Tese- doutorado em Engenharia Química. Faculdade de Engenharia Química. Universidade estadual de campinas. 2003.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **YEAST: The practical guide to beer fermentation**. Brewers Publication, Colorado, 2010.