

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

WALTER DE PAULA PINTO NETO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO RECICLO DE LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DE
CERVEJA DE TRIGO:**

caracterização e ajustes do perfil metabólico e organoléptico

Recife
2019

WALTER DE PAULA PINTO NETO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO RECICLO DE LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DE
CERVEJA DE TRIGO:**

caracterização e ajustes do perfil metabólico e organoléptico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia, bioprocessos e bioprodutos

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Barros de Souza

RECIFE

2019

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Pinto Neto, Walter de Paula

Avaliação da eficiência do reciclo de leveduras na produção da cerveja de trigo :
caracterização e ajustes do perfil metabólico e organoléptico / Walter de Paula Pinto
Neto. - 2020.

106 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Barros de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Recife,
2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Cerveja - Industria. 2. Leveduras (Fungos). 3. Fermentação. I. Moraes
Júnior, Marcos Antonio de (orientador). II. Souza, Rafael Barros de
(coorientador). III. Título.

663.42

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020 -145

WALTER DE PAULA PINTO NETO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO RECICLO DE LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DE
CERVEJA DE TRIGO:**

caracterização e ajustes do perfil metabólico e organoléptico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 26/09/2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Júnior
Departamento de Genética (CB/UFPE) (Orientador)



Prof.ª Dr.ª Márcia Vanusa da Silva
Departamento de Bioquímica (CB/UFPE) (Examinadora interna)



Prof.ª Dr.ª Ana Paula Silveira Paim
Departamento de Química Fundamental (CCEN/UFPE) (Examinadora externa)

Dedico esta dissertação à população
brasileira, que fomenta a educação, ciência
e tecnologia nacional.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor e apoio incondicionais durante os meus anos de vida;

Ao meu orientador e co-orientador, pelas contribuições realizadas para a minha ascensão profissional;

Aos meus verdadeiros amigos, pela amizade;

Aos meus professores, pelos bons e maus exemplos;

Aos meus alunos, por despertarem o melhor profissional que existe em mim;

Aos meus colegas de laboratório, pela troca de conhecimentos durante a pesquisa;

À cervejaria parceira do projeto, pelo apoio oferecido durante a pesquisa;

Ao CETENE, pela disponibilização de equipamentos e profissionais qualificados;

À UFPE e UPE, pela disponibilização do espaço físico, equipamentos e profissionais que contribuíram com a pesquisa;

CAPES e população brasileira, pelo suporte financeiro;

À banca examinadora, pelo aceite do convite e considerações.

Uma cerveja antes do almoço é muito bom
pra ficar pensando melhor.

Chico Science & Nação Zumbi

JOÃO HIGINO FILHO, 1994

RESUMO

A cerveja é a bebida mais consumida no mundo, perdendo apenas para a água e o chá. O Brasil é um grande produtor e consumidor de cerveja. Segundo a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja, o setor cervejeiro é um dos mais relevantes da economia brasileira, respondendo por 1,6% do PIB brasileiro e faturando R\$ 107 bilhões ao ano. Pernambuco nos últimos cinco anos tem investido mais no setor cervejeiro, com a implantação de novas cervejarias, sobretudo no que diz respeito à produção de cervejas artesanais com características do processamento industrial. De frente a esses benefícios relacionados ao mercado cervejeiro, é considerável estimular o apoio à pesquisa nesse setor. Nesse sentido, é importante ressaltar que a fermentação é a etapa mais importante no processo de obtenção da cerveja, fortalecendo a importância na compreensão e melhoria desta etapa, que é realizada pelas leveduras e responsável pela existência da cerveja. As leveduras, que durante o processo fermentativo liberam etanol, CO₂ e uma miríade de compostos aromáticos são as responsáveis pela identidade da cerveja e podem diminuir a qualidade do produto quando não são reaproveitadas adequadamente durante os ciclos de fermentação. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar seis ciclos fermentativos de três leveduras comerciais (WB-06, JP1 e YLB4000) para avaliar o processamento de uma cerveja de trigo durante os ciclos de aproveitamento de biomassa e, assim, propor ajustes no processamento sem afetar as características da bebida. Após estabelecer os perfis metabólicos e organolépticos da produção de uma cerveja de trigo estilo Weizen em uma microcervejaria foi possível sugerir, a partir dos resultados obtidos que, a linhagem de levedura WB-06 apresentou melhor perfil quantitativo de compostos aromáticos ativos e maior produção de álcool isoamílico, que essa mesma linhagem foi a única capaz de produzir acetato de feniletila durante todos os ciclos de fermentação industrial analisados e que o tempo de fermentação pode ser reduzido de sete para três dias (> 50%) com pouca variação de concentração na produção dos analitos investigados. Além disso, essa redução no tempo de fermentação pode implicar em uma redução do custo do processamento da cerveja.

Palavras-chave: Cerveja. Fermentação. Aroma.

ABSTRACT

Beer is the most consumed alcoholic beverage in the world. Considering the consumption of all drinks, beer loses only for water and tea. Brazil is a great producer and consumer of beer. According to the Brazilian Beer Industry Association (CERVBRASIL, 2019), the brewing sector is one of the most relevant in the Brazilian economy. The sector accounts for 1.6% of Brazilian GDP, and it revenues of \$ 107 billion per year. Pernambuco in the last five years has invested more in the brewing sector by the implementation of new breweries, especially with regard to the production of craft beers with characteristics of industrial processing. Given these benefits related to the beer market, it is considerable to stimulate support for research in this sector. In this sense, it is important to highlight that fermentation is the most important step in the brewing process, strengthening the importance in understanding and improving this step, which is performed by yeast, and it is responsible for the existence of beer. Yeasts, which during the fermentation process release ethanol, CO₂ and a myriad of aromatic compounds are responsible for the identity of the beer and can decrease the quality of the product when they are not reused properly during the fermentation cycles. Thus, the aim of this work was to study fermentative cycles of three commercial yeasts (WB-06, JP1 and YLB4000) to evaluate the processing of a wheat beer during the biomass harvesting cycles and, therefore, to propose processing adjustments without affecting the characteristics of the drink. After the analytical methods for metabolic and organoleptic profiles of the production of a Weizen style wheat beer in a microbrewery, it was possible to suggest, from the results obtained that the yeast strain WB-06 presented a better quantitative profile of active aromatic compounds and higher yield of isoamyl alcohol. In addition, this same strain was the only one capable of producing phenylethyl acetate during all the industrial fermentation cycles. The fermentation time can be reduced from seven to three days (> 50%) with little concentration variation in analytes investigated. In addition, this reduction in fermentation time may lead to a reduction in the cost of beer processing.

Key words: Beer. Fermentation. Aroma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema geral do fluxo do processo industrial de produção de cervejas.....	27
Figura 2 -	Destinos catabólicos do piruvato na glicólise. A imagem mostra a alternativa metabólica da fermentação etanólica ou alcoólica em levedura, onde ocorre a produção de etanol e CO ₂	31
Figura 3 -	Metabolismo Central do Nitrogênio. Em itálico estão os genes para cada etapa enzimática em <i>S. cerevisiae</i>	33
Figura 4 -	Esquema geral das principais rotas metabólicas em leveduras cervejeiras para a formação de substâncias organolépticas a partir dos nutrientes disponíveis no mosto de cerveja.....	35
Figura 5 -	Catabolismo dos aminoácidos pela Via de Ehrlich.....	36
Figura 6 -	Microscopia óptica (1000x) das linhagens comerciais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas para a fermentação de cerveja de trigo estilo Weizen neste trabalho. (a) WB-06; (b) JP1 e (c) YLB4000 em meio YPD por 24 horas a 30 °C e 140 rpm.	40
Figura 7 -	Tanque de fermentação industrial em aço inoxidável da microcervejaria parceira deste trabalho.....	41
Figura 8 -	Proveta de vidro de 250 mL adaptada para mimetizar tanques de fermentação industrial de cerveja.....	44
Figura 9 -	Sistema para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Agilent Technologies 1200 Series do Laboratório de Processos e Produtos Biotecnológicas (ICB – UPE).	46
Figura 10 -	Sistema para Cromatografia Gasosa (CG) da Agilent Technology 7890 do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do grão de cevada e do malte.	23
Tabela 2 -	Composição de carboidratos de mostos cervejeiros com diferentes maltes (g.L ⁻¹).....	29
Tabela 3 -	Média da massa úmida da levedura WB-06 para a fermentação de cerveja de trigo.....	42
Tabela 4 -	Substâncias organolépticas analisadas no mosto e fermentados cervejeiros.....	45
Tabela 5 -	Variáveis estudadas aos ensaios de fermentação para a etapa de ajustes dos níveis de álcoois superiores e ésteres durante o processamento da cerveja e os possíveis resultados.	47
Tabela 6 -	Concentração de etanol e glicerol durante a fermentação na microcervejaria pela linhagem WB-06.....	50
Tabela 7 -	Concentração dos compostos organolépticos durante a fermentação na microcervejaria pela linhagem WB-06.....	53
Tabela 8 -	Concentração de etanol e glicerol durante as fermentações das linhagens WB-06, JP1 e YLB4000 em laboratório.	58
Tabela 9 -	Comparação de produção das substâncias organolépticas no terceiro dia de fermentação para cada linhagem de levedura durante os ciclos de biomassa.....	60
Tabela 10 -	Concentração de etanol e glicerol durante os ensaios de ajustes das fermentações da linhagem WB-06.	61
Tabela 11 -	Rendimentos de etanol e glicerol no terceiro dia de fermentação para todos os experimentos realizados.....	62
Tabela 12 -	Comparação das concentrações dos principais açúcares encontrados em mosto cerveiro.....	64
Tabela 13 -	Comparação das concentrações das substâncias organolépticas deste trabalho com dados disponíveis na literatura.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AATase	Acetiltransferase
a.C.	antes de Cristo
AE	Acetato de etila
ATP	Trifosfato de adenosina
BJCP	Beer Judge Certification Program
CB	Centro de Biociências
CERVBRASIL	Associação Brasileira da Indústria da Cerveja
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CoA	Coenzima A
d.C.	Depois de Cristo
DIC	Detector por Ionização de Chamas
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina e adenina
GDP	Gross Domestic Product (PIB em português)
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
Inc.	Incorporation
IR	Índice de Refração
L	Litro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mM	Milimolar
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

PIB	Produto Interno Bruto
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPE	Universidade de Pernambuco
v/v	volume / volume
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
1B	Álcool butílico
2FE	Álcool feniletílico
2FEA	Acetato de feniletila
2MB	Álcool amílico ativo
2MBA	Acetato de 2-metibutila
2MP	Álcool isobutílico
3MB	Álcool isoamílico
3MBA	Acetato de isoamila
°P	Graus Plato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS.....	18
1.1.1	Objetivo geral	18
1.1.2	Objetivos específicos	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	CERVEJA.....	19
2.1.1	Breve histórico e evolução da cerveja	19
2.1.1.1	Cerveja no mundo	19
2.1.1.2	Cerveja no Brasil	20
2.1.2	Matérias-primas do processamento da cerveja	21
2.1.2.1	Água.....	22
2.1.2.2	Malte	22
2.1.2.3	Lúpulo	23
2.1.2.4	Levedura.....	24
2.1.2.5	Adjuntos.....	24
2.1.3	Classificação da cerveja	25
2.1.3.1	Cerveja de trigo.....	25
2.1.4	Processamento da cerveja	26
2.2	METABOLISMO DE LEVEDURAS NO PROCESSAMENTO DE CERVEJA	28
2.2.1	Anabolismo e catabolismo	28
2.2.2	Fermentação alcoólica	28
2.2.2.1	Composição do mosto cervejeiro.....	28
2.2.2.2	Metabolismo fermentativo.....	30
2.2.3	Metabolismo do Nitrogênio	32
2.2.3.1	Aspectos gerais	32
2.2.3.2	Influência do nitrogênio na formação de compostos organolépticos	33

2.2.4	Substâncias organolépticas.....	34
2.2.4.1	Aspectos gerais	34
2.2.4.2	Álcoois superiores	35
2.2.4.3	Ésteres.....	37
2.2.4.4	Complexidade na formação de substâncias organolépticas.....	37
2.3	REUTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS NO PROCESSO FERMENTATIVO	38
2.4	CONSIDERAÇÕES.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1	ORIGEM E IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	40
3.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO E ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO.....	41
3.2.1	Condições de cultivo e ensaios de fermentação na microcervejaria	41
3.2.2	Condições de cultivo e ensaios de fermentação em laboratório	42
3.3	CARACTERIZAÇÃO DO MOSTO E FERMENTADOS CERVEJEIROS	43
3.3.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	43
3.3.2	Cromatografia Gasosa (CG).....	44
3.4	AJUSTES DO PROCESSO FERMENTATIVO DA CERVEJA DE TRIGO ...	47
3.4.1	Condições de cultivo e ensaios de fermentação para ajustes industriais	47
3.5	PARÂMETROS FERMENTATIVOS.....	48
3.6	AMPLIAÇÃO PARA ESCALA INDUSTRIAL	49
4	RESULTADOS	50
4.1	PERFIL METABÓLICO E ORGANOLÉPTICO DA LINHAGEM WB-06 NA MICROCERVEJARIA.....	50
4.1.1	Perfil metabólico da linhagem WB-06 na microcervejaria	50
4.1.2	Perfil organoléptico da linhagem WB-06 na microcervejaria	51
4.2	PERFIL METABÓLICO E ORGANOLÉPTICO DAS LINHAGENS ESTUDADAS EM LABORATÓRIO	55
4.2.1	Perfil metabólico das linhagens estudadas em laboratório	55

4.2.2	Perfil organoléptico das linhagens estudadas em laboratório	56
4.3	AJUSTES DO PERFIL METABÓLICO E ORGANOLÉPTICO DA LINHAGEM WB-06	57
4.3.1	Ajustes do perfil metabólico da linhagem WB-06.....	61
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE A – GRÁFICOS DA CLAE (WB-06 INDUSTRIAL)	79
	APÊNDICE B – GRÁFICOS DA CG (WB-06 INDUSTRIAL).....	80
	APÊNDICE C – GRÁFICOS DA CLAE (LABORATÓRIO).....	83
	APÊNDICE D – PERFIL ORGANOLÉPTICO (WB-06 LABORATÓRIO).....	86
	APÊNDICE E – PERFIL ORGANOLÉPTICO (JP1 LABORATÓRIO).....	91
	APÊNDICE F – PERFIL ORGANOLÉPTICO (YLB4000 LABORATÓRIO)	97
	APÊNDICE G – GRÁFICOS DA CLAE (WB-06 AJUSTES)	100
	APÊNDICE H – CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS	101
	APÊNDICE I – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES EXTERNOS	102
	ANEXO A – DESCRIÇÃO DA LINHAGEM WB-06	103
	ANEXO B – DESCRIÇÃO DA LINHAGEM YLB4000	104
	ANEXO C – ÁLCOOIS SUPERIORES E ÉSTERES	105
	ANEXO D – CROMATOGRAMA DA CG.....	106

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida bem versátil e permite diferentes possibilidades com os seus ingredientes, além da utilização de alguns adjuntos permitidos por lei, a exemplo do trigo. Os grãos, principalmente a cevada maltada, fornecem carboidratos, aminoácidos e corpo à cerveja, mas também pode atribuir sabor. O lúpulo traz amargor, bem como notas de frutas. Os minerais dissolvidos na água influenciam os sabores que vêm dos grãos e do lúpulo. A levedura produz etanol, CO₂ e centenas de compostos aromáticos, como os álcoois superiores e ésteres que influenciam na qualidade sensorial da bebida (AQUARONE et al., 2001; MORADO, 2009; CALLAWAY, 2016).

Segundo as diretrizes de estilos de cervejas de 2015 do Beer Judge Certification Program Inc. (BJCP), uma respeitada organização cervejeira fundada em 1985 no Colorado (EUA), existem 121 estilos de cervejas, reunidos em 35 grupos. Um desses estilos é a Weizen (ou Weissbier), uma cerveja de trigo (BJCP, 2015; MORADO, 2017). As características relacionadas ao sabor e aroma da cerveja são conferidas principalmente pela linhagem de levedura e condições de fermentação (BJCP, 2015; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

As leveduras utilizam carboidratos e aminoácidos do mosto cervejeiro para produção de álcoois superiores, como acontece, por exemplo, no catabolismo do aminoácido leucina para a produção de álcool isoamílico (3-metil-1-butanol). Inicialmente, na via catabólica, o aminoácido leucina é transaminado para 2-cetoisocaproato que, por sua vez, é descarboxilado para um aldeído (3-metilbutanal) que, quando reduzido, forma o álcool isoamílico (HAZELWOOD et al., 2008). Além dos álcoois superiores, outros intermediários das vias metabólicas são fundamentais nas características organolépticas da cerveja. Dentre esses intermediários estão os ésteres, que são compostos voláteis formados a partir de um ácido orgânico e um álcool (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). O acetato de isoamila, que é característico de cervejas estilo Weizen, por exemplo, é produzido pela condensação do acetil-CoA com o álcool isoamílico pela ação da enzima álcool acetil transferase, mas também é hidrolisado pelas esterases (FUJII et al., 1996; ESPINOSA VIDAL et al., 2012).

Nesse sentido, a manutenção das atividades enzimáticas é fundamental para a concentração final das substâncias organolépticas, já que a instabilidade nas concentrações dos precursores químicos e enzimas podem resultar na deficiência de produção dessas substâncias e, conseqüentemente, interferir na qualidade da bebida (VERSTREPEN et al., 2003).

Desde as últimas décadas até os dias atuais fatores tecnológicos vêm sendo direcionados para a melhoria das linhagens de leveduras cervejeiras e de processos de fermentação (KURTZMAN; FELL, 2011). Sendo assim, profissionais da área procuram linhagens de leveduras com perfis metabólicos diferentes, assim como aperfeiçoar a reutilização das biomassas para, além de diminuir os custos de produção e economizar tempo, criar bebidas alcoólicas com características desejáveis e diferenciadas para o mercado (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Diante deste cenário de aprimoramento do mercado, uma proposta foi realizada por uma microcervejaria artesanal do estado de Pernambuco para caracterizar e ajustar o reuso de leveduras para o rótulo Weizen do seu catálogo, que segundo a microcervejaria, apresentava decaimento de qualidade sensorial durante os ciclos. O estudo foi realizado pelo aproveitamento da biomassa de levedura utilizada pela microcervejaria e mais duas outras disponíveis no mercado, com meta de 6 (seis) ciclos fermentativos para diminuir custo de produção pela reutilização de matéria-prima do processo e pela verificação da manutenção do perfil de formação de substâncias organolépticas, visto que a qualidade da bebida pode diminuir quando a biomassa de leveduras não são reaproveitadas adequadamente durante os ciclos de fermentação.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

- Compreender o perfil metabólico e organoléptico da fermentação de uma cerveja de trigo em reposta ao reuso de células de três linhagens comerciais de leveduras.

1.1.2 Objetivos específicos

- Conhecer o perfil metabólico de três linhagens comerciais de leveduras durante seis ciclos de fermentação de cerveja de trigo;
- Entender o perfil organoléptico destas linhagens comerciais de leveduras durante os seis ciclos de fermentação de cerveja de trigo;
- Avaliar, de acordo com o perfil metabólico e organoléptico, a linhagem de levedura que obteve o melhor desempenho geral em reposta aos ajustes do processo fermentativo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerveja

2.1.1 Breve histórico e evolução da cerveja

2.1.1.1 Cerveja no mundo

Aproximadamente há 9000 anos a.C. acredita-se que surgira os primeiros campos de cultivo no oeste da Ásia. Esses campos provavelmente eram de plantações de cereais como a cevada e o trigo. Arelado ao surgimento desta agricultura primitiva estava a necessidade do ser humano pré-histórico afastar-se da vida nômade de caçador-coletor para se estabelecer como indivíduos sedentários passíveis de administrar os campos. Com isso, posteriormente tornou-se possível o processamento das colheitas em produtos como o pão e a cerveja, ambos utilizados para a alimentação (MORADO, 2009; MORADO, 2017).

Os pesquisadores sugerem que o surgimento da cerveja tenha ocorrido por acaso, devido à facilidade de obtenção deste produto de forma espontânea. Supõe-se que os agricultores da época armazenaram grãos provenientes da colheita em vasos abertos em ambientes abertos e, porventura, esqueceram-se destes grãos e acabaram sendo umedecidos pela água da chuva. Os grãos germinaram e, com isso, deixaram disponíveis carboidratos passíveis de serem fermentados. Os grãos secaram e permaneceram esquecidos. Outra chuva deve ter ocorrido, formando um tipo de caldo que foi fermentado por micro-organismo do ambiente e originando o que seria a primeira cerveja do mundo (MORADO, 2009; MORADO, 2017).

As evidências mais antigas acerca do surgimento da cerveja datam de aproximadamente 5000 anos a.C. e foram descobertas por arqueólogos na vila neolítica de Jiahu, no norte da China e na Mesopotâmia, onde hoje é o Iraque. Todavia, outros indícios sugerem que por volta de 6000 anos a.C. a produção de cerveja já era uma atividade bem estabelecida tanto na China quanto no Oriente Médio, quando o ser humano pré-histórico introduziu a construção de cidades. A partir de então, há registros sobre a cerveja na Antiguidade pelos

povos da Suméria, Babilônia e Egito e na Idade Média (AQUARONE et al, 2001; MORADO, 2009; MORADO, 2017).

No início da Idade Moderna, em 23 de abril de 1516, foi promulgada a Lei da Pureza alemã da cerveja ou *Reinheitsgebot* em toda a região da Baviera, pelos duques Guilherme IV e Luís X. Dentre outras determinações, esta lei estabelecia quais os ingredientes que deveriam ser utilizados durante o processamento da cerveja (água, malte de cevada e lúpulo), tornando-se o maior modelo de padronização da cerveja no mundo. Na época não se tinha conhecimento da existência das leveduras. Esta lei permaneceu em vigor por mais de quatrocentos anos e ainda hoje é considerada um marco na história da cerveja (MEUSSDOERFFER, 2009; POELMANS, 2011).

Um pouco mais de duas décadas, em 1542, após a promulgação da Lei da Pureza da Alemanha e de séculos do estabelecimento já firmado da cerveja em diversas regiões do mundo, surge a primeira cervejaria das Américas, por Alfonso Herrera, no México. A partir de então, foi questão de quase um século para a instalação da primeira cervejaria no recém-descoberto Brasil (MORADO, 2017).

2.1.1.2 Cerveja no Brasil

Foi no Recife, período holandês (1630-1654), que os lábios da brasilidade estabeleceram o primeiro contato com o líquido fermentado, de feitiço não indígena, produzido no Brasil, apresentando fórmula muito próxima do que hoje conhecemos como cerveja (MARCENA, 2016, p. 63).

A companhia das Índias Orientais, ao embarcar no nordeste brasileiro, trouxe consigo os primeiros registros de fabricação de cerveja no Brasil. Foi no ano de 1637 que o conde alemão Johann Moritz Zu Nassau-Siegen, ou apenas Maurício de Nassau, chegou a território brasileiro na condição de governador das terras holandesas no Brasil. Juntamente com Nassau vieram diversos estudiosos, entre eles o mestre cervejeiro Dirck Dicx, que chegara ao Recife em 1640 para compor a comitiva de Nassau. A sua presença foi fundamental para a abertura da primeira fábrica de cerveja do Novo Mundo, no bairro das Graças, em Recife (MARCENA, 2016).

Com a expulsão dos holandeses em 1654 a cerveja caiu no esquecimento por quase 150 anos, reaparecendo apenas com a chegada da família real ao Brasil em 1808. A cerveja era inicialmente importada de países europeus para o Brasil a mando de D. João VI. Mais adiante, a partir de 1888 as grandes cervejarias começaram a surgir no país e, junto com elas, a capacidade de produção em grande escala. Atualmente, assim como ocorre em diversas regiões do mundo onde a cerveja possui uma história mais antiga, começam a surgir as microcervejarias (AQUARONE et al., 2001; MORADO, 2017).

Atualmente, a indústria da cerveja está diretamente relacionada com o desenvolvimento do país e é um dos setores que mais empregam no Brasil. O Brasil é um grande produtor de cerveja. O setor cervejeiro responde por 0,5% do PIB na União Européia, 1,5% nos Estados Unidos e 1,6% do PIB nacional. Além disso, o setor emprega 2,7 milhões de pessoas a cada ano e corresponde a um faturamento de R\$ 107 bilhões (CERVBRASIL, 2018). Diante da dimensão do setor cervejeiro e do seu impacto na economia nacional, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é o órgão responsável no Brasil pela gestão do setor (AQUARONE et al., 2001). Segundo esse ministério e a legislação brasileira, inicialmente pela Lei nº 8,918 de 14 de julho de 1994 e regulamentada pelo Decreto nº 6,871 de 04 de junho de 2009, a cerveja é “a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo de malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição do lúpulo” (BRASIL, 2009).

2.1.2 Matérias-primas do processamento da cerveja

Ainda sobre a legislação brasileira, é referido no decreto nº 6,871 de junho de 2009 que os quatro ingredientes da cerveja (água, malte de cevada, lúpulo e levedura) são processados de forma a obtenção do mosto cervejeiro, que é “a solução, em água potável, de carboidratos, proteínas, glicídeos e sais minerais, resultantes da degradação enzimática dos componentes da matéria-prima que compõe o mosto”. Além disso, a legislação também permite a utilização de adjuntos como o arroz, o trigo, o centeio, o milho, a aveia e sorgo para a formulação do mosto (BRASIL, 2009). Para melhor compreensão acerca

do processamento da cerveja, será realizada uma breve apresentação sobre as características gerais e importância de cada um dos seus ingredientes.

2.1.2.1 Água

A água é a matéria-prima que se encontra em maior quantidade na cerveja (> 90%). Nesse sentido, as cervejarias costumam localizar-se em áreas próximas de fontes de água, sendo essencial que essa água possua algumas características quanto às suas propriedades físicas e composição química e microbiológica. É aconselhável que seja uma fonte de água relativamente uniforme, limpa, inodora, incolor e com dureza adequada para cada estilo de cerveja. Além disso, é de extrema importância compreender que os sais minerais dissolvidos, matéria orgânica e compostos gasosos influenciam os processos químicos e enzimáticos que ocorrem durante a fermentação da cerveja e, por conseguinte, a qualidade da bebida (VENTURINI FILHO et al., 2005). Também é importante ressaltar a necessidade do pH e padrões microbiológicos adequados (AQUARONE et al., 2001; ROSA; AFONSO, 2015).

2.1.2.2 Malte

Malte é o termo utilizado para se referir a quaisquer cereais que foram sujeitos a uma germinação inicial sob condições controladas de temperatura, umidade e aeração. Esses cereais, a priori, podem ser cevada, trigo, milho, aveia, arroz e outros, sendo o malte de cevada a principal matéria-prima para a cerveja. Esse processo de transformação dos grãos (sementes) dos cereais em malte deixa disponíveis carboidratos de menor cadeia molecular que o amido, um carboidrato abundante na cevada e, portanto, mais facilmente metabolizados. Além disso, torna o grão menos rígido, mais solúvel e capaz de fornecer enzimas que serão fundamentais durante o processamento da cerveja (VENTURINI FILHO et al., 2005; VENTURINI FILHO et al., 2010). A tabela abaixo mostra a comparação da composição média dos grãos de cevada com o cereal já maltado (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Composição do grão de cevada e do malte.

Características	Cevada	Malte
Massa do grão (mg)	32-36	29-33
Umidade (%)	10-14	4-6
Amido (%)	55-60	50-55
Açúcares (%)	0,5-1,0	8-10
Nitrogênio total (%)	1,8-2,3	1,8-2,3
Nitrogênio solúvel (% de N total)	10-12	35-50
Poder diastático, °Lintner	50-60	100-250
α-amilase, unidades de dextrina	traços	30-60
Atividade proteolítica	traços	15-30

Fonte: Cereda (1985).

Alguns cereais são melhores que outros durante o processo de malteação. É necessário conferir aspectos como o teor de gordura, a taxa de gordura, o rendimento da extração e a capacidade de germinação como critérios de avaliação. Nesse sentido, o grão de cevada é o que apresenta melhores características, apesar ser muito parecido com o trigo (MORADO, 2017).

2.1.2.3 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta perene trepadeira pertencente à família Cannabaceae, na qual as plantas femininas possuem inflorescências contendo substâncias de interesse industrial para o processamento da cerveja. Essas inflorescências são ricas em resinas (α -ácidos e β -ácidos), polifenóis e óleos essenciais que são fundamentais para o amargor, aroma e propriedades antioxidantes da cerveja (BAMFORTH, 2003).

Não se sabe precisamente quando o lúpulo foi utilizado pela primeira vez na fabricação de cerveja (MOIR, 2000). A evidência mais antiga sobre o cultivo desta planta data de meados 859 d.C na Baviera (BEHRE, 1999). Entretanto, sabe-se que o lúpulo já havia sido inserido na fabricação de cerveja desde 822 d.C. Contudo, a primeira evidência científica de seu uso está no livro *Physica*, de 1150 d.C. O lúpulo emergiu na produção da cerveja como uma

alternativa menos onerosa aos aditivos da época e eficaz na conservação e equilíbrio do sabor e aroma da bebida (MORADO, 2017).

2.1.2.4 Levedura

As leveduras são fungos unicelulares caracterizados por possuírem crescimento assexuado predominantemente por brotamento ou fissão e por não apresentarem corpo de frutificação. Existem centenas de linhagens de leveduras, mas a maioria delas não é apropriada para a fabricação de cervejas. As leveduras utilizadas para a produção de cerveja pertencem ao gênero *Saccharomyces*, sendo as principais *S. cerevisiae* para as cervejas de alta fermentação e *S. pastorianus* para as cervejas de baixa fermentação. Essas leveduras utilizam o mosto cervejeiro durante a fermentação para consumir açúcares fermentescíveis e produzir etanol, dióxido de carbono e substâncias organolépticas (KURTZMAN et al., 2011; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Inicialmente na Lei da Pureza alemã da cerveja ou *Reinheitsgebot* de 1516 a levedura não estava incluída como matéria-prima da cerveja. Nesta época a sociedade não havia conhecimentos sobre microbiologia. Com o advento da microscopia, em 1680, Anton van Leeuwenhoek foi o primeiro a observar esses micro-organismos. Entretanto, Leeuwenhoek não associou as leveduras como seres vivos e agentes responsáveis pelo processo fermentativo, que na época era considerado um fenômeno espontâneo. Mais tarde, em 1789, Antoine-Laurent Lavoisier associou a conversão dos açúcares do mosto cervejeiro em etanol e dióxido de carbono. Porém, a presença das leveduras continuava dissociada com a conversão dos açúcares em etanol. Apenas em meados da segunda metade dos anos 1800 que Louis Pasteur estabeleceu as leveduras como seres vivos e, finalmente, em 1879, afirmou a relação entre fermentação alcoólica e leveduras (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

2.1.2.5 Adjuntos

Para ser considerada cerveja, a bebida alcoólica precisa ser processada a partir de açúcares de grãos que contenham pelo menos 20% de malte de cevada (MORADO, 2009; MORADO, 2017). Quaisquer outros insumos

utilizados como fonte de carboidratos não maltados como complemento ou suplemento do malte de cevada e que possua açúcares fermentescíveis são considerados adjuntos. Nesse sentido, adjuntos cereais mais comuns são o milho, o arroz, o trigo e entre outros. Além disso, adjuntos na forma de açúcares cristalizados e xaropes podem ser utilizados durante a fabricação de cerveja (VENTURINI FILHO, 2010).

Os adjuntos são utilizados principalmente por uma necessidade econômica durante o processamento da cerveja. Os adjuntos são menos onerosos para a produção do mosto e podem contribuir para a qualidade e tempo de prateleira da bebida. No Brasil, segundo a legislação, o nível de substituição do malte por adjuntos pode chegar a 80% e as perspectivas de uso aumentou em todo o mundo (AQUARONE et al., 2001).

2.1.3 Classificação da cerveja

Classificar cervejas não é um trabalho fácil. Muitos são os parâmetros que podem ser levados em consideração quando se classifica cervejas. As cervejas podem ser classificadas quanto ao extrato primitivo, cor, teor alcoólico, fermentação e entre outros. Além disso, classificar cervejas é um processo dinâmico e contínuo visto que muitos dos parâmetros se alteram ao longo do tempo a depender, por exemplo, da utilização de novas tecnologias para o processo de produção e mudanças no paladar do consumidor. A primeira classificação de cervejas publicada no mundo data de 1977 no livro *The World Guide to Beer*. Atualmente, uma das classificações mais utilizadas no mundo é a do Beer Judge Certification Program Inc. (BJCP), uma organização sem fins lucrativos fundada em 1985 no Colorado, Estados Unidos, durante a American Homebrewers Association Annual Conference. O guia de estilos cervejeiros do BJCP em sua edição de 2015 compreende 121 estilos reunidos em 35 grupos (MORADO, 2017).

2.1.3.1 Cerveja de trigo

O grupo 10 do guia de estilos do BJCP é referente às cervejas de trigo alemãs, também conhecidas como Weizenbier ou Weissbier. Em alemão

“weizen” significa trigo e “weiss” branco. Este grupo contém aquelas cervejas que possuem, no mínimo, 50% de malte de trigo. Dentro desse grupo tem-se a Weissbier (10A), uma cerveja com ésteres frutados (geralmente com notas de banana) e fenóis (geralmente com notas de cravo) (BJCP, 2015).

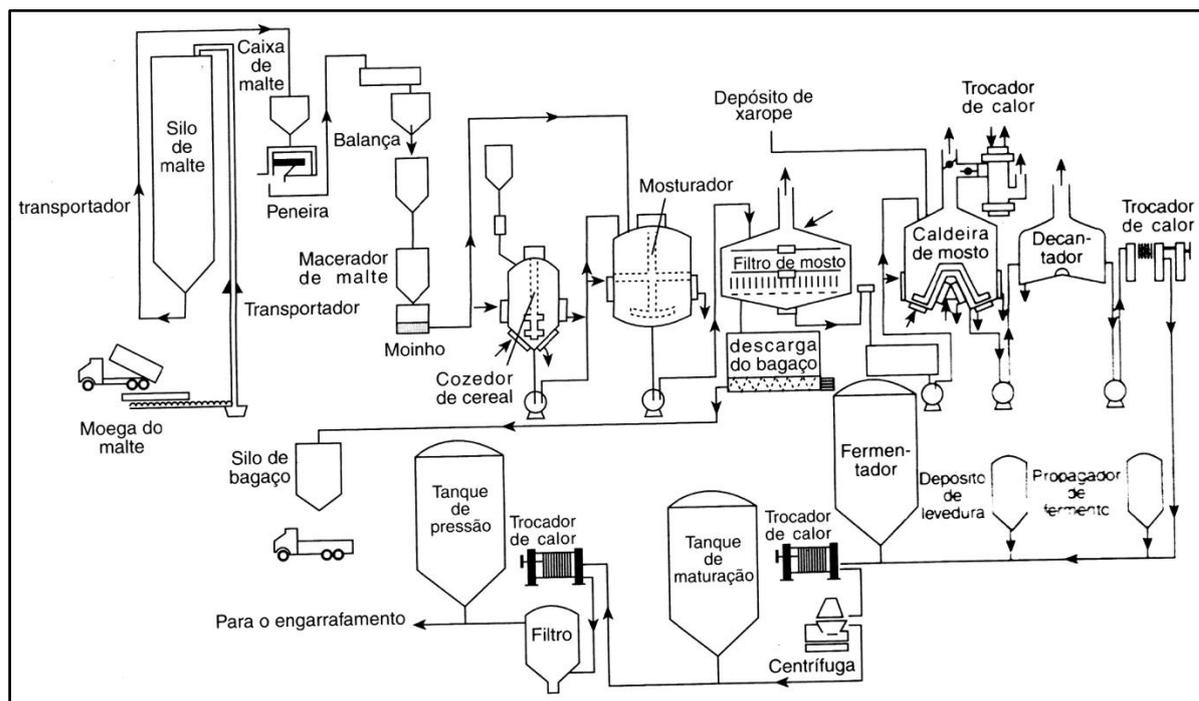
O trigo, adjunto principal desta cerveja, apresenta constituição de 80% de carboidratos, sendo a maioria deles na forma de polissacarídeos, com predominância do amido. Além do amido, quantidades menores de celulose e hemicelulose são encontradas. Outros carboidratos mono, di, tri e oligossacarídeos são encontrados em pequenas quantidades. Componentes não carboidratos, como lipídeos, proteínas e fósforo também são encontrados no amido do trigo, mas em concentrações muito pequenas (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2008). Geralmente, o trigo e cervejas de trigo apresentam baixa concentração de nitrogênio livre (79-139 mg/100g) quando comparados com a cevada (120-150 mg/100g) e isso pode ocasionar alguns problemas na fermentação, como menores concentrações de etanol e compostos organolépticos (FALTERMAIER et al., 2014).

A cerveja, independente do seu adjunto, possui mais de 450 substâncias diferentes que podem influenciar as características do produto final. Nesse contexto, dos dados analíticos disponíveis na literatura, uma pequena e recente parte é destinada às cervejas de trigo, sendo a maioria dos dados sobre a cevada e usados com base na fabricação de cervejas de trigo (FALTERMAIER et al., 2014).

2.1.4 Processamento da cerveja

O processo de produção industrial da cerveja pode ser dividido em três grandes etapas: (1) produção de mosto, onde acontece a moagem do malte, mosturação, filtração, fervura e clarificação; (2) processo fermentativo, que envolve a fermentação e maturação e, por fim, (3) o pós-tratamento da cerveja, que pode envolver filtração, carbonatação, alteração de aroma e sabor, uniformização da cor e pasteurização (**Figura 1**) (AQUARONE et al., 2001).

Figura 1 - Esquema geral do fluxo do processo industrial de produção de cervejas.



Fonte: Hough (1985).

Quaisquer modificações nos ingredientes e/ou no processo de produção implicarão em um produto final com características diferentes (PEREIRA, 2007). Todavia, é durante a fermentação que as principais características organolépticas da cerveja são originadas. Nessa fase, além da conversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono, outras substâncias produzidas em concentrações mais baixas são responsáveis pelo sabor e aroma da bebida (POTTER et al., 1999). Nesse sentido, intervenções podem ser realizadas nessa fase para favorecer a produção e manutenção de sabores e aromas desejáveis.

Diferente das grandes cervejarias, as microcervejarias brasileiras enfrentam o desafio de aumentar a escala de produção para diminuir os custos do processamento e obter um espaço no mercado. O que uma microcervejaria brasileira produz em um ano pode ser equivalente ao que uma grande cervejaria produz em dez minutos do seu dia. Entretanto, essas microcervejarias vêm aumentando a participação de mercado (MORADO, 2017).

2.2 Metabolismo de leveduras no processamento de cerveja

2.2.1 Anabolismo e catabolismo

Por metabolismo entende-se o conjunto de todas as transformações químicas que ocorrem no organismo por meio da ação enzimática durante as vias metabólicas. O metabolismo celular é uma atividade altamente coordenada por vias metabólicas que proporcionam à célula a obtenção de energia a partir da utilização dos nutrientes do meio. Nesse sentido, proporciona a conversão dos nutrientes em uma miríade de precursores de macromoléculas como os polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos que irão compor a biomassa celular. Além de sintetizar biomoléculas, essas vias realizam a degradação de outras biomoléculas para as diversas funções celulares e acabam por gerar metabólitos que serão liberados pela célula para o meio. Para tratar o metabolismo de síntese e degradação de biomoléculas no metabolismo são utilizados os termos anabolismo e catabolismo. Por catabolismo entende-se a degradação de moléculas grandes e complexas em moléculas de menor peso molecular e simples, enquanto que o anabolismo é a biossíntese de moléculas de alto peso molecular e complexas a partir de precursores pequenos e simples. Por um lado, as reações catabólicas conservam energia na forma de ATP e de transportadores de elétrons reduzidos como NADH, NADPH e FADH₂ e parte é liberada na forma de calor. Por outro lado, as reações anabólicas necessitam de energia (geralmente na forma de ATP) e do poder redutor de NADH, NADPH e FADH₂. Essas reações anabólicas são responsáveis tanto pela produção de biomassa como dos produtos do crescimento celular. (NELSON; COX, 2014).

2.2.2 Fermentação alcoólica

2.2.2.1 Composição do mosto cervejeiro

O mosto cervejeiro não é uma mistura preparada com ingredientes puros. Não se trata de um meio sintético, mas de um meio contendo insumos de origem vegetal e, portanto, relativamente variável quanto a sua composição (SMART et al., 2003). De modo geral, o mosto de cerveja é composto por

carboidratos, compostos nitrogenados, lipídeos, vitaminas e íons inorgânicos que serão utilizados no metabolismo das leveduras (HE et al., 2014). Os carboidratos correspondem a 90-92% do extrato total do mosto, sendo os principais representantes a sacarose, frutose, glicose, maltose e maltotriose, juntamente com as dextrinas. Destes, a maltose e a maltotriose são os que se encontram em maior abundância (**Tabela 2**) (GJERTSEN, 1953; HE et al., 2014).

Tabela 2 - Composição de carboidratos de mostos cervejeiros com diferentes maltes (g.L^{-1}).

Carboidratos	Malte 1	Malte 2	Malte 3	Malte 4	Malte 5
Glicose	10,2	9,8	9,5	7,4	8,5
Frutose	1,5	2,0	2,7	1,9	2,3
Sacarose	2,2	3,0	2,5	2,5	1,7
Maltose	54,2	50	52,2	50,7	54,6
Trissacarídeos (maltotriose)	13,6	11,8	13,0	12,3	13,1
Total	91,2	90,0	91,1	91,1	92,2
(% do extrato)					
Carboidratos fermentescíveis	78,7	73,6	76,9	71,8	77,2
Carboidratos fermentescíveis (% do extrato)	70,0	66,0	69,4	64,9	68,4

Fonte: GJERTSEN, 1953 (Adaptado).

Mais recentemente, outros valores foram encontrados para a composição do mosto de cerveja: maltose ($\sim 59 \text{ g.L}^{-1}$), maltotriose ($\sim 10 \text{ g.L}^{-1}$), glicose ($\sim 20 \text{ g.L}^{-1}$), frutose ($\sim 2,5 \text{ g.L}^{-1}$) e sacarose ($\sim 2,5 \text{ g.L}^{-1}$) (HE et al., 2014).

Os compostos nitrogenados disponíveis no mosto de cerveja que devem ser metabolizados pelas leveduras são os nitrogênios aminados livres (FAN), que são os aminoácidos, principalmente, íons de amônio e pequenos peptídeos (PUGH et al., 1997). Tanto a quantidade quanto a qualidade das fontes de carbono e de nitrogênio disponíveis no mosto de cerveja para serem metabolizadas pelas leveduras são fundamentais para a qualidade do produto final, sobretudo no que diz respeito ao sabor e aroma da cerveja. Além disso,

as vitaminas e os íons inorgânicos são relevantes para o crescimento e multiplicação das células, como também para o desempenho do processo fermentativo (HE et al., 2014; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

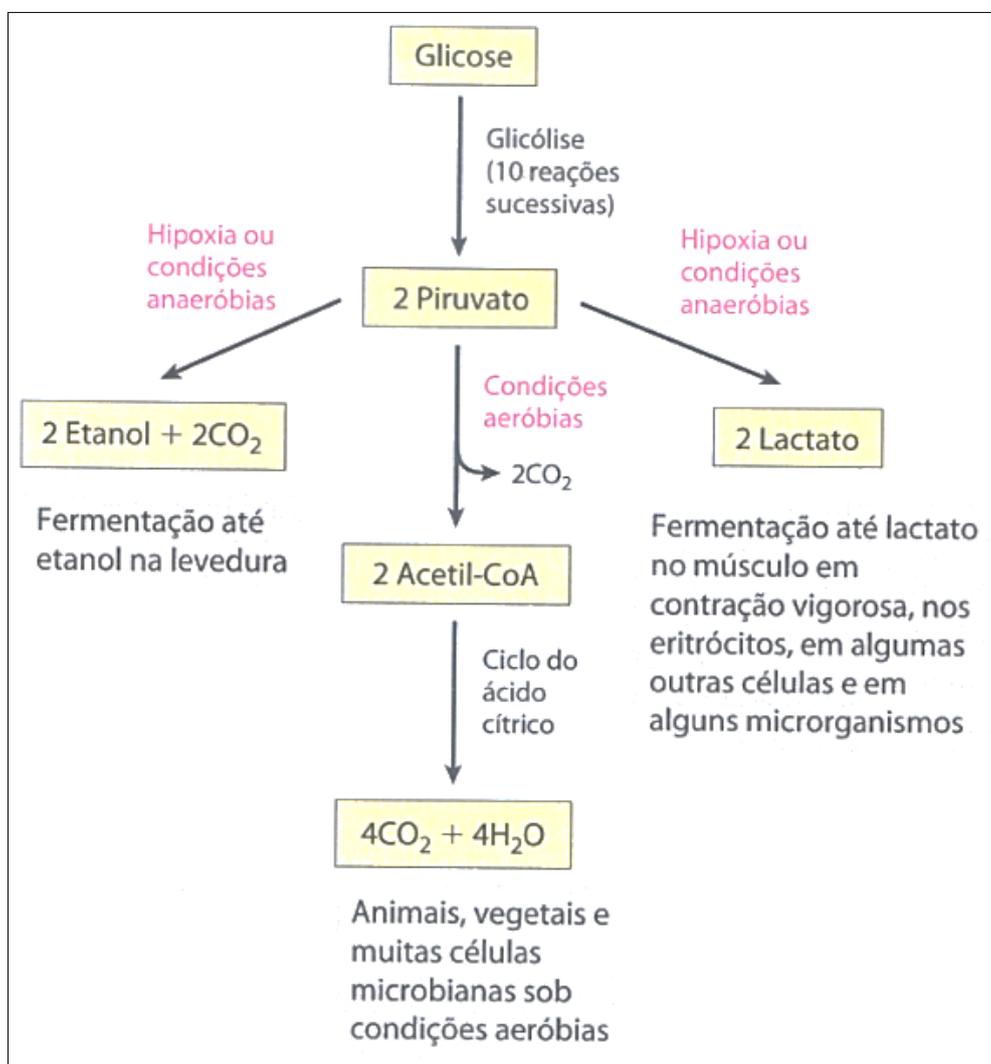
2.2.2.2 Metabolismo fermentativo

No processo fermentativo ocorre a degradação de carboidratos, principalmente hexoses e, geralmente em condições de anaerobiose. Durante esse processo via glicólise, o piruvato pode ser metabolizado por três vias catabólicas, sendo uma delas a fermentação etanólica ou alcoólica (**Figura 2**). Nessa via, fundamental para a fabricação de cervejas, a fonte de carbono é convertida, principalmente, em etanol e CO_2 (NELSON; COX, 2014).

A levedura *S. cerevisiae* é a mais utilizada devido a sua maior eficiência fermentativa quando comparada aos outros micro-organismos. Essa levedura possui um metabolismo classificado como *Crabtree* positivo, no qual a presença de glicose ou outros açúcares fermentescíveis acima de determinada concentração induz o metabolismo fermentativo mesmo na presença de oxigênio (POSTMAN et al., 1989).

A equação da fermentação desenvolvida por Gay-Lussac propõe que para cada 1 mol de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ – 180 g) serão produzidos 2 moles de etanol ($2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ – 92 g), 2 moles de dióxido de carbono (2CO_2 – 88g) e 57 Kcal de energia (KOLB, 2002; NELSON; COX, 2014). Esses valores correspondem ao rendimento teórico máximo ($Y_{P/S}$) de 0,511 g de etanol por grama de glicose consumida (LIMA et al., 2001). Na prática, o máximo teórico não é alcançado, pois parte do esqueleto de carbono é convertido em biomassa e outros subprodutos como o glicerol e uma variedade de substâncias organolépticas fundamentais se transformam em produtos fermentados (ESPINOSA VIDAL, 2012; WHEALS et al., 1999).

Figura 2 - Destinos catabólicos do piruvato na glicólise. A imagem mostra a alternativa metabólica da fermentação etanólica ou alcoólica em levedura, onde ocorre a produção de etanol e CO_2 .



Fonte: NELSON; COX, 2014.

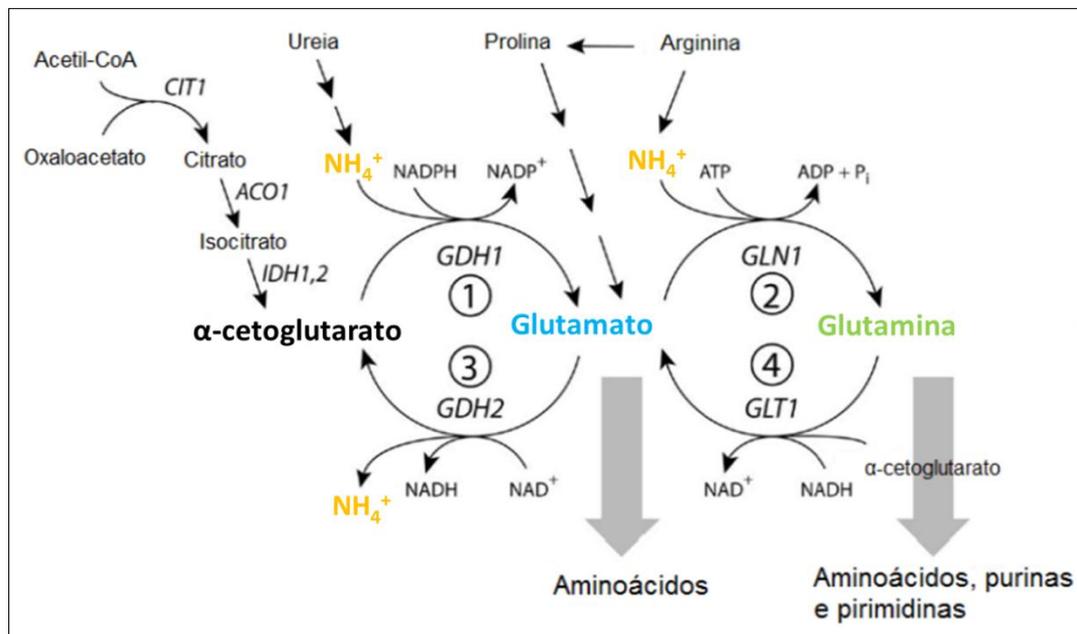
2.2.3 Metabolismo do Nitrogênio

2.2.3.1 Aspectos gerais

Os organismos eucarióticos, como as leveduras, controlam o seu metabolismo em resposta a nutrientes orgânicos e inorgânicos presentes no ambiente. Além dos carboidratos como compostos orgânicos, as fontes de nitrogênio também são essenciais para esses seres vivos (COOPER, 1982). Essas moléculas nitrogenadas entram nas células através de permeases e são utilizadas como unidades de construção em reações de biossíntese ou catalisadas para liberação de nitrogênio na forma de amônio (via desaminação), glutamato (via transaminação) ou ambas. Além dessas duas possibilidades, é possível a condensação do glutamato com o amônio para formar a glutamina, que juntamente com o glutamato são os principais doadores de nitrogênio nas reações de biossíntese celular. Para esse conjunto de reações enzimáticas do amônio, glutamato e glutamina dá-se o nome de Metabolismo Central do Nitrogênio (**Figura 3**) (COOPER, 1982; MAGASANIK, 1992).

Na Figura 3, os compostos celulares nitrogenados são sintetizados a partir do conjunto de reações enzimáticas do amônio, glutamato e glutamina. O glutamato é formado pela combinação de amônia com α -cetoglutarato, enquanto a glutamina é sintetizada pela combinação da amônia com o glutamato (COOPER, 1982; MAGASANIK, 1992).

Figura 3 - Metabolismo Central do Nitrogênio. Em itálico estão os genes para cada etapa enzimática em *S. cerevisiae*.



Fonte: MAGASANIK; KAISER, 2002 (Adaptado).

2.2.3.2 Influência do nitrogênio na formação de compostos organolépticos

A quantidade e a qualidade das fontes de nitrogênio no mosto que seguirá para a fermentação afetam o crescimento e o perfil de fermentação das leveduras (BISSON, 1991). As fontes de nitrogênio totais assimiláveis ofertadas às células de leveduras na fermentação para produção de aromas podem ser de natureza diversa. Contudo, os aminoácidos e seus diferentes tipos podem gerar respostas metabólicas diferentes na levedura e que serão fundamentais para o perfil organoléptico da cerveja (LIE, 1973). A deficiência de nitrogênio ofertado pode resultar em algumas situações indesejáveis no produto da fermentação, como os “*off flavours*”. Outras situações podem ser o aumento do tempo da fermentação e maiores concentrações de açúcares residuais por causa de alterações na atividade celular (MENDES FERREIRA et al., 2004).

A concentração de nitrogênio presente no mosto durante a fermentação vai depender de diversos parâmetros como, por exemplo, a linhagem de

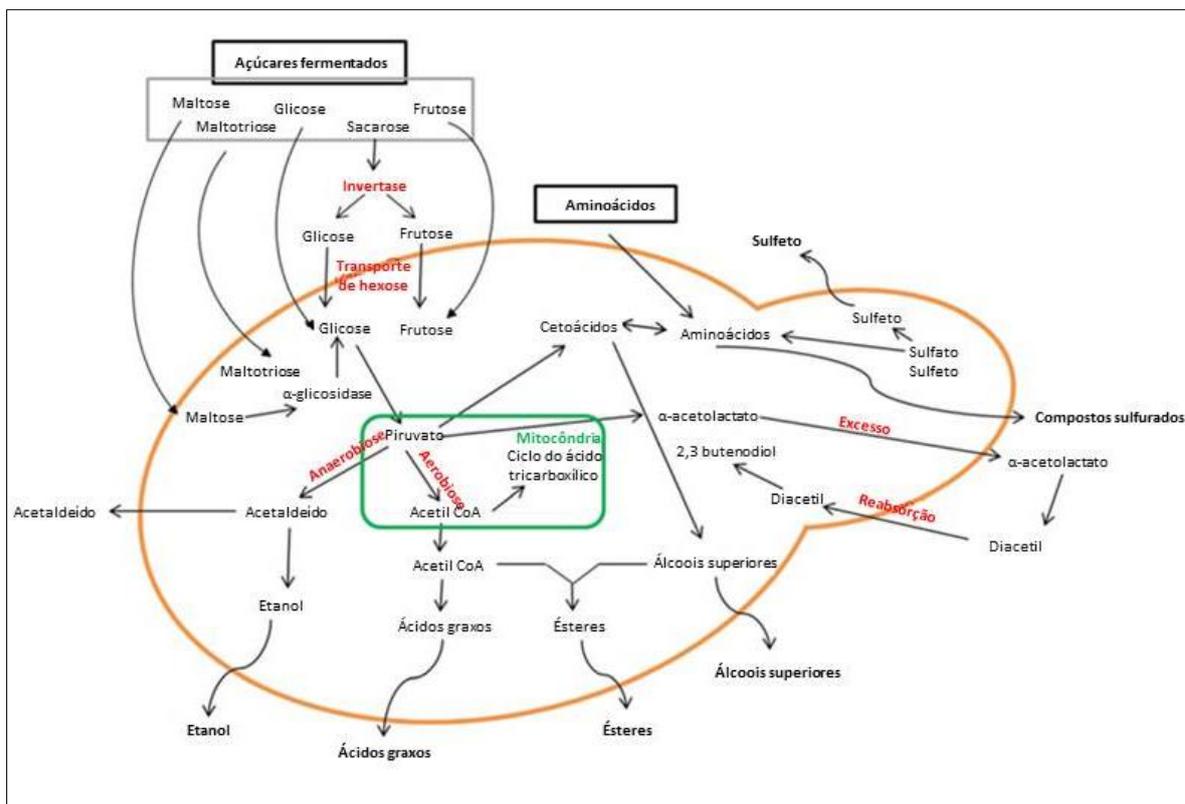
levedura utilizada, o tamanho do inóculo e condições do processo fermentativo, como a concentração de açúcares e temperatura (ESPINOSA VIDAL, 2012).

2.2.4 Substâncias organolépticas

2.2.4.1 Aspectos gerais

Uma variedade de substâncias é responsável pelo aroma nas bebidas alcoólicas, nas quais muitas podem ser percebidas sensorialmente pelo ser humano. Apesar dos produtos majoritários da fermentação ser o etanol e o dióxido de carbono, são as substâncias organolépticas produzidas pela levedura que determinam as características sensoriais da bebida (BOULTON; QUAIN, 2001). As leveduras utilizam o conteúdo inicial de carboidratos e aminoácidos dos meios de fermentação para produção desses metabólitos secundários. Dentre essas substâncias, as leveduras produzem, principalmente, álcoois superiores e ésteres como importantes colaboradores para as características sensoriais das bebidas, além de ácidos orgânicos, compostos carbonílicos e glicerol como evidenciado na figura seguinte (**Figura 4**) (HAZELWOOD et al., 2008; VERSTREPEN et al., 2003; VILA NOVA et al., 2009). O grau de disponibilidade desses compostos no produto final depende de muitos fatores, sobretudo daqueles relacionados às condições de fermentação, da natureza da fonte de carboidratos e nitrogênio e da linhagem de levedura utilizada (PISARNITSKII, 2001; CARRAU et al., 2008).

Figura 4 - Esquema geral das principais rotas metabólicas em leveduras cervejeiras para a formação de substâncias organolépticas a partir dos nutrientes disponíveis no mosto de cerveja.



Fonte: HE et al., 2014 (Adaptado).

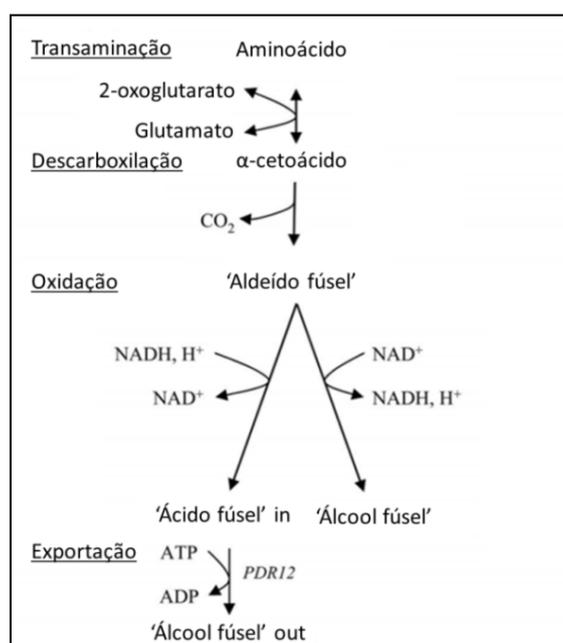
2.2.4.2 Álcoois superiores

Os álcoois superiores são metabólitos secundários produzidos pelas leveduras durante a fermentação, sendo formados por álcoois de cadeia simples ou ramificadas, com número de carbono maior que dois e peso molecular e ponto de ebulição superior ao do etanol (BIDAN, 1975). De modo geral, a cerveja pode conter várias combinações de aproximadamente quarenta álcoois superiores (MEILGAARD, 1975). A levedura começa a formar esses álcoois a partir do piruvato e acetil-CoA provenientes do metabolismo dos carboidratos ou durante o catabolismo dos aminoácidos aromáticos e de cadeia ramificada pela via de Ehrlich (**Figura 5**) (HAZELWOOD et al., 2008; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Altas concentrações de álcoois superiores podem resultar em um produto com sabor desagradável. Entretanto, baixas concentrações são

importantes para compor o sabor e aroma das bebidas alcoólicas (HAZELWOOD et al., 2008). Dentre os álcoois superiores têm-se os que possuem caráter alifático e os aromáticos (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1977). Os álcoois superiores alifáticos incluem o isopropanol (2-propanol), o álcool isoamílico (3-metil, 1-butanol), o álcool amílico (1-pentanol), o álcool feniletílico (2-feniletanol), o álcool amílico ativo (2-metil-butanol) e o álcool isobutílico (2-metil propanol) que intensificam o teor alcoólico nas bebidas e conferem um caráter cáldo (BOULTON; QUAIN, 2001). Além desses, o 2-feniletanol é um álcool superior aromático que confere aroma floral às bebidas (MEILGAARD, 2001). De todos esses álcoois superiores o álcool isoamílico, o álcool amílico ativo e o isobutanol são conhecidos como álcoois de cadeia ramificada por ser resultado do catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada: leucina, isoleucina e valina. A partir de L-leucina se produz o álcool isoamílico, de L-isoleucina, o álcool amílico ativo e é formado, por fim, a partir da L-valina o isobutanol, que são compostos não utilizados como fonte de carbono auxiliar e excretados pela levedura (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000; ESPINOSA VIDAL, 2012).

Figura 5 - Catabolismo dos aminoácidos pela Via de Ehrlich.



Fonte: HAZELWOOD et al., 2008 (Adaptado).

2.2.4.3 Ésteres

Ésteres são compostos voláteis formados a partir de um ácido orgânico, como o acetil-CoA e um álcool em uma reação de esterificação. As enzimas álcool acetiltransferases I e II (AATase) catalisam a formação desses ésteres a partir do ácido orgânico e do álcool. (FUGII, 1997) Esses compostos são extremamente importantes para a característica da cerveja, atribuindo aromas frutados. As cervejas podem possuir vários desses ésteres, até mais que cinquenta tipos diferentes (MEILGAARD, 1975). Os ésteres podem ser mensurados por cromatografia gasosa e são bastante úteis para diferenciar os estilos de cervejas. Os exemplos mais comuns desses ésteres são o acetato de etila, caproato de etila, acetato de feniletila e o acetato de isoamila (característico de cervejas estilo Weizen) (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). A formação de um éster leva um tempo para a levedura, pois é necessário a formação dos álcoois superiores primeiramente. Contudo, é importante investir na formação desses para a cerveja, pois os ésteres são mais impactantes no aroma do que os álcoois e ácidos separadamente (BAMFORTH, 2001).

Muitos fatores afetam a produção dos ésteres, aqueles que promovem o crescimento das leveduras e desviam o acetil-CoA diminuirão a síntese desses compostos. São três fatores principais para controlar a produção dos ésteres: concentração de acetil-CoA, concentração de álcoois superiores e a atividade enzimática das enzimas envolvidas (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). A relação carbono-nitrogênio (C/N) (PALMER; RENNIE, 1974), a síntese de lipídios (BOULTON; QUAIN, 2001), a composição do mosto e a aeração (VERSTREPEN et al., 2003) também influenciam na concentração dos ésteres no mosto.

2.2.4.4 Complexidade na formação de substâncias organolépticas

As cervejarias podem controlar a produção das substâncias organolépticas de formas variadas. De modo geral, o balanço entre sabor e aroma é conferido pela composição do mosto atrelado à linhagem de levedura utilizada (HE et al., 2014). Além disso, o ajuste de temperatura durante o processo fermentativo, geometria e design do fermentador, pH e clareza do

mosto, capacidade de tamponamento do meio, gravidade do mosto e entre outros fatores também afetam a formação dessas substâncias (STEWART, 2017). A síntese de substâncias organolépticas envolve a regulação de vários genes na levedura e a conexão entre diferentes vias metabólicas. Nesse sentido, muitos estudos genéticos e proteômicos estão trazendo informações para agregar os estudos fisiológicos. Contudo, muito ainda tem que ser descoberto nesse campo (HE et al., 2014).

2.3 Reutilização de leveduras no processo fermentativo

Desde sempre as leveduras têm sido reutilizadas no processo fermentativo da cerveja, mesmo antes de se ter o conhecimento de que elas eram as responsáveis pela produção da bebida. Atualmente, as leveduras continuam a ser reutilizadas como uma forma de induzir variedades genéticas de linhagens de leveduras cervejeiras e melhorar o seu desempenho durante o processo de fabricação. Além disso, a reutilização de leveduras está intimamente relacionada à diminuição do custo do processamento da cerveja pela reutilização da matéria-prima e diminuição de tempo de fermentação pela redução da fase lag da biomassa aproveitada (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

O número de reutilizações de leveduras está relacionado à sanitização do processo, de modo a evitar contaminação. No entanto, observa-se que a capacidade fermentativa das células pode diminuir a medida que as condições do processo induzem estresse celular. Além disso, cada linhagem de levedura pode apresentar um comportamento intrínseco diferente, bem como de viabilidade celular frente às condições adversas encontradas durante a fabricação e estocagem (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Durante o processo de fermentação industrial as células de leveduras enfrentam estresses oxidativo, osmótico, etanólico, baixas temperaturas, alta pressão e limitações ou excessos de nutrientes. Todos esses estresses que as células de leveduras se deparam também podem influenciar no desempenho fermentativo (WALKER, 2003).

2.4 Considerações

São vários os trabalhos que vêm abordando o metabolismo de linhagens de leveduras quanto à produção de substâncias organolépticas para diferentes fermentações industriais, sobretudo para bebidas alcoólicas que são fermentadas como a cerveja e o vinho ou fermento-destiladas como a aguardente de cana (caninha) ou de melaço (cachaça) (ESPINOSA VIDAL et al., 2013; ESPINOSA VIDAL et al., 2015; PARENTE et al., 2018, HAZELWOOD, 2008 et al.; MENDES FERREIRA et al., 2004; HE et al., 2014). Em concordância com esses trabalhos, é importante conhecer as diferentes características e mecanismos envolvidos no perfil metabólico e organoléptico das diferentes linhagens de leveduras sobre a qualidade sensorial do produto da fermentação.

No que se refere à cerveja, há uma quantidade moderada de trabalhos que apontam a importância da composição do mosto cervejeiro e condições de fermentação para a produção de metabólitos secundários com características sensoriais desejáveis para a produção da bebida. Contudo, apesar da prática de reciclagem de leveduras para a produção de cervejas, não são encontrados até o momento artigos de cunho científico que retratem as características metabólicas e organolépticas para a produção de cerveja pelo aproveitamento de biomassa, sobretudo para uma cerveja de trigo estilo Weizen. Por conseguinte, não há uma abordagem experimental sobre ajustes de processo fermentativo pela indicação e gerenciamento de linhagens de leveduras que visem manter a qualidade do produto e redução de custo e tempo de produção para uma cerveja de trigo estilo Weizen.

Diante deste cenário, uma microcervejaria do estado de Pernambuco lançou a proposta de caracterizar a produção do rótulo Weizen do seu catálogo para compreender porque a qualidade da bebida diminui ao longo dos ciclos de aproveitamento de biomassa e, assim, realizar ajustes do processo fermentativo para reduzir o custo e tempo de produção, com base nas experimentações científicas realizadas neste trabalho e mantendo a qualidade sensorial da bebida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e identificação das leveduras

Foram utilizadas três linhagens comerciais de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*: (a) *S. cerevisiae* var. diastaticus WB-06, que é comercializada internacionalmente para cervejarias e indicada para fermentação de cerveja de trigo, denominada SAFALE™ WB-06 (Fermentis Lesaffre for Beverages) e utilizada pela microcervejaria parceira deste trabalho (**Anexo A**); (b) *S. cerevisiae* JP1 (SILVA FILHO et al., 2005; REIS et al., 2012), que é comercializada para destilarias de bioetanol e cachaça no Brasil e denominada Fermol Distiller® (AEB Biochemistry Latin America); e (c) *S. cerevisiae* YLB4000, que é comercializada nacionalmente para cervejarias e indicada para fermentação de cerveja de trigo, denominada YeastLab YLB4000 – German Weizen 01 (YeastLab Biotecnologia) (**Anexo B**) (**Figura 6**).

Figura 6 - Microscopia óptica (1000x) das linhagens comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas para a fermentação de cerveja de trigo estilo Weizen neste trabalho. (a) WB-06; (b) JP1 e (c) YLB4000 em meio YPD por 24 horas a 30 °C e 140 rpm.



Fonte: O Autor.

3.2 Condições de cultivo e ensaios de fermentação

3.2.1 Condições de cultivo e ensaios de fermentação na microcervejaria

As células liofilizadas da levedura WB-06 foram hidratadas em um volume de água mineral equivalente a 10 (dez) vezes seu próprio peso e temperatura de $25\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Em seguida, as células permaneceram 20 minutos em repouso e foram depositadas no fermentador para seguir ao tanque de fermentação, onde entrou em contato com o mosto cervejeiro (**Figura 7**).

Figura 7 - Tanque de fermentação industrial em aço inoxidável da microcervejaria parceira deste trabalho.



Fonte: O autor.

concentração inicial de massa seca adicionada foi de $0,75\text{ g.L}^{-1}$. Esse processo se repetiu 3 (três) vezes pela reutilização da mesma biomassa, com intervalos que variaram de acordo com a demanda da microcervejaria (1º ciclo – 30.11.2017; 2º ciclo – 09-01.2018; 3º ciclo – 31-01.2018). Cada ciclo teve como duração de 5 (cinco) a 7 (sete) dias de fermentação. No primeiro ciclo de

fermentação o mosto foi fermentado a 18 °C, enquanto que no segundo e terceiro ciclos as temperaturas foram de 20 °C e 22°C, respectivamente. Durante o período entre ciclos de fermentação a biomassa ativa permaneceu estocada juntamente com o “Trub” (sedimento que decanta no fermentador durante o processo fermentativo e que consiste de material insolúvel do lúpulo e leveduras inativas) a 4 °C. Para cada novo ciclo de fermentação toda a biomassa estocada foi adicionada ao tanque de fermentação.

3.2.2 Condições de cultivo e ensaios de fermentação em laboratório

As células liofilizadas da levedura WB-06 foram hidratadas em um volume de água destilada e esterilizada equivalente a 10 (dez) vezes seu próprio peso e a uma temperatura de 25 °C ± 3 °C em tubo Falcon de 15 mL por 20 (vinte) minutos e em repouso no laboratório. A concentração inicial de massa seca adicionada na microcervejaria é de 0,75 g.L⁻¹. Nesse sentido, a massa seca equivalente para o volume final de 200 mL é de 0,15 g. Após hidratação, testes em triplicata mostraram a obtenção média de 0,4690 g.L⁻¹ de massa úmida a partir desta massa seca e sob as condições de hidratação descritas acima (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Média da massa úmida da levedura WB-06 para a fermentação de cerveja de trigo.

Massa seca (g.L ⁻¹)	Massa úmida 1 (g.L ⁻¹)	Massa úmida 2 (g.L ⁻¹)	Massa úmida 3 (g.L ⁻¹)	Média (g.L ⁻¹)	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de variação % (CV)
0,15	0,4898	0,4460	0,4712	0,4690	0,0220	4,69

Fonte: O autor

Após esse procedimento, provetas de vidro com capacidade de 250 mL foram adaptadas para mimetizar tanques industriais de fermentação de cerveja (**Figura 8**) e foram completadas para o volume final de trabalho de 200 mL de mosto industrial de cerveja de trigo estilo Weizen da cervejaria parceira, para os testes realizados em laboratório. Os ensaios de fermentação para as demais linhagens foram realizados a partir do modelo obtido por WB-06 e em concordância com as recomendações dos fabricantes. Os ensaios de fermentação das três linhagens comerciais foram realizados, em triplicata

biológica, para seis ciclos de reutilização da biomassa, sendo de até 7 (sete) dias cada ciclo de fermentação e com períodos de estocagem em água destilada esterilizada a 4 °C, com tempo mínimo de estocagem de 48 horas. As células de levedura foram crescidas em meio de cultura YPD (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona bacteriológica) por 24h, centrifugadas até a obtenção de 0,4690g de massa úmida (5 min, 5000 rpm, 25 °C ± 3 °C), inoculadas no mosto de cerveja a 4 °C e os 6 (seis) ciclos de fermentação foram realizados nas temperaturas de 18 °C (1º ciclo), 20 °C (2º ciclo) e 22 °C para os demais ciclos subsequentes, em concordância com práticas da microcervejaria parceira do projeto e sob o respaldo de dados da literatura que relacionam aumento de temperatura com maior formação de substâncias organolépticas. Para cada novo ciclo de fermentação toda a biomassa estocada foi adicionada à proveta de fermentação em concordância com as práticas realizadas na microcervejaria parceira do projeto. Amostras de 3 mL dos substratos iniciais e de cada fermentado foram coletadas a cada 24 h, centrifugadas (5 min, 5000 rpm, 25 °C ± 3 °C) e armazenadas (-80 °C) até as análises metabólicas e organolépticas.

3.3 Caracterização do mosto e fermentados cervejeiros

3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O mosto e fermentados cervejeiros foram caracterizados quanto à quantificação de açúcares (glicose, frutose e maltose), glicerol, ácido acético e etanol, utilizando-se do sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por índice de refração (IR) do Laboratório de Processos e Produtos Biotecnológicos (ICB – UPE). As análises foram realizadas em triplicatas técnicas para as fermentações na microcervejaria e em triplicatas biológicas para os ensaios realizados em laboratório. O sistema da CLAE estava equipado com uma bomba acoplada a um degaseificador e um forno para controle da temperatura da coluna a 35 °C (Agilent Technologies 1200 Series) (**Figura 9**). Foi utilizada uma coluna de troca iônica HPX-87H+ (Aminex® HPX-87H+, Bio-Rad, USA). Uma solução de H₂SO₄ a 5 mM foi

utilizada como fase móvel, com um fluxo de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ de amostras que foram diluídas 10 (dez) (1:10) vezes em água ultrapura e filtrada em filtros com porosidade de $0,22 \mu\text{m}$ foi de $20\mu\text{L}$. Além da caracterização do mosto e fermentados cervejeiros deste estudo, foram realizadas análises em cervejas engarrafadas e disponíveis para os consumidores, também se utilizando do sistema da CLAE (ESPINOSA VIDAL et al., 2014).

Figura 8 - Proveta de vidro de 250 mL adaptada para mimetizar tanques de fermentação industrial de cerveja.



Fonte: O autor.

3.3.2 Cromatografia Gasosa (CG)

O mosto e fermentados cervejeiros foram caracterizados quanto à quantificação de álcoois superiores e ésteres (**Tabela 4 e anexo C**) utilizando-se o sistema de Cromatografia Gasosa (CG) com Detector por Ionização de Chamas (DIC) (Agilent Technology 7890) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) (**Figura 10**). O sistema da CG-DIC estava equipado com uma coluna HP-5 (30 m de comprimento \times $320 \mu\text{m}$ de diâmetro \times $0,25 \mu\text{m}$) e as seguintes condições: vazão He de $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura inicial do forno de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos com uma rampa de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ por minuto até alcançar $100 \text{ }^\circ\text{C}$ e, em seguida, uma segunda rampa de $34,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por minuto até alcançar $250 \text{ }^\circ\text{C}$ que foram mantidos por 1 minuto. Além disso, as temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para $250 \text{ }^\circ\text{C}$, a razão de divisão da amostra foi de 10:1 e o volume injetado foi de $1 \mu\text{L}$ (ESPINOSA VIDAL et al., 2014). O mosto e fermentados cervejeiros foram caracterizados quanto à

quantificação das substâncias organolépticas em triplicatas técnicas para as fermentações na microcervejaria e em triplicata biológica para os ensaios realizados em laboratório.

Tabela 4 - Substâncias organolépticas analisadas no mosto e fermentados cervejeiros.

Substâncias organolépticas		
Álcoois superiores	Ésteres	Aldeídos
Álcool butílico – 1B	Acetato de etila – AE	Acetaldeído
Álcool isoamílico – 3MB	Acetato de isoamila – 3MBA	
Álcool feniletílico – 2FE	Acetato de feniletila – 2FEA	
Álcool amílico ativo – 2MB	Acetato de 2-metilbutila – 2MBA	
Álcool isobutílico – 2MP		

Fonte: O autor.

Para a quantificação dessas substâncias organolépticas foi necessária a preparação das amostras para seguir ao cromatógrafo gasoso. Para a determinação desses compostos foi realizada uma extração líquido/líquido a - 20 °C com éter dietílico (50 %) usando o octanol ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) como padrão interno. A fase orgânica do mosto e fermentados cervejeiro foi extraída por agitação mecânica em agitador do tipo Vortex durante 1 minuto e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos para a separação das fases. Após isso, apenas o sobrenadante contendo os compostos extraídos foram injetados no cromatógrafo.

Figura 9 - Sistema para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Agilent Technologies 1200 Series do Laboratório de Processos e Produtos Biotecnológicos (ICB – UPE).



Fonte: O autor.

Figura 10 - Sistema para Cromatografia Gasosa (CG) da Agilent Technology 7890 do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).



Fonte: Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

3.4 Ajustes do processo fermentativo da cerveja de trigo

Os ajustes do perfil metabólico e organoléptico da cerveja de trigo estilo Weizen ocorreram durante o processo fermentativo da linhagem de levedura indicada por apresentar os melhores resultados frente aos ensaios de caracterização realizados em microcervejaria e no laboratório. O ensaio de fermentação para ajustes industriais está baseado em informações contidas na literatura ou nos resultados obtidos na etapa de caracterização e que não acarretará custos adicionais, que estão fora da realidade de muitas microcervejarias (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Variáveis estudadas nos ensaios de fermentação para a etapa de ajustes dos níveis de álcoois superiores e ésteres durante o processamento da cerveja e os possíveis resultados.

Variáveis adicionadas	Resultados teóricos
Mesma temperatura de fermentação desde o primeiro ciclo de fermentação (18 °C);	Álcoois e ésteres aumentados. Padronização do perfil metabólico das leveduras durante os ciclos de aproveitamento de biomassa.
Utilização da mesma massa inicial de células úmidas de levedura (inóculo) para todos os ciclos de fermentação;	Padronização do perfil metabólico das leveduras durante os ciclos de aproveitamento de biomassa.
Redução do tempo de exposição das células de leveduras às condições adversas do fermentado cervejeiro.	Maior viabilidade celular para realizar os processos metabólicos.

Fonte: STEWART, 2017 (Modificado).

3.4.1 Condições de cultivo e ensaios de fermentação para ajustes industriais

As células da linhagem de levedura com os melhores resultados frente aos ensaios de caracterização realizados em microcervejaria e laboratório foram crescidas em meio YPD e inoculadas ao mosto cervejeiro para ensaios em triplicatas biológicas (0,4690 g.L⁻¹ de massa úmida).

Após esse procedimento, provetas adaptadas para mimetizar tanques industriais de fermentação de cerveja serão completadas para o volume final

de trabalho de 200 mL de mosto industrial de cerveja de trigo estilo Weizen da cervejaria parceira deste trabalho. Os ensaios aconteceram para seis ciclos de reutilização da biomassa, sendo de 3 (três) dias cada ciclo de fermentação e com períodos de estocagem em água destilada esterilizada a 4 °C. Ao final de cada processo fermentativo as células serão centrifugadas (5 min, 5000 rpm, 25 °C ± 3 °C) e 0,4690 g.L⁻¹ de massa úmida será separada do restante da biomassa. Em seguida, as células de levedura serão estocadas em água destilada esterilizada a 4 °C. Todos os 6 (seis) ciclos de fermentação serão realizados na temperatura de 20 °C. Amostras de 3 mL dos substratos iniciais e de cada fermentado serão coletadas a cada 24 h, centrifugadas (5 min, 5000 rpm, 25 °C ± 3 °C) e armazenadas (-80 °C) até as análises metabólicas.

3.5 Parâmetros fermentativos

A partir dos resultados obtidos nos métodos analíticos (concentração de maltose, frutose, glicose, carboidratos totais, glicerol e etanol) no mosto e fermentados cervejeiros, foram calculados os seguintes parâmetros de fermentação:

- Açúcar consumido (S)

$$S = -(S_f - S_i)$$

Onde:

S = carboidrato consumido (g.L⁻¹ ou mg.L⁻¹)

S_f = Concentração final do carboidrato (g.L⁻¹ ou mg.L⁻¹)

S_i = Concentração inicial do carboidrato (g.L⁻¹ ou mg.L⁻¹)

- Metabólito produzido (P)

$$P = P_f - P_i$$

Onde:

P = metabólito produzido (g.L⁻¹ ou mg.L⁻¹)

P_f = concentração final do metabólito (g.L⁻¹ ou mg.L⁻¹)

P_i = concentração inicial do metabólito (g.L^{-1} ou mg.L^{-1}) = 0

- Rendimento ($Y_{P/S}$)

$$Y = \frac{P}{S}$$

Onde:

$Y_{P/S}$ = fator de conversão do substrato em metabólito (g/g)

P = metabólito produzido (g.L^{-1})

S = carboidrato consumido (g.L^{-1})

3.6 Ampliação para escala industrial

Os dados obtidos pelo trabalho foram repassados para a microcervejaria parceira do projeto para que as informações geradas sejam testadas e, possivelmente, incorporadas ao processamento da cerveja em escala de produção industrial.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil metabólico e organoléptico da linhagem WB-06 na microcervejaria

4.1.1 Perfil metabólico da linhagem WB-06 na microcervejaria

Os resultados abaixo (**Tabela 6**) mostram a concentração de etanol e glicerol a partir dos mostos cervejeiros (12 °P) fermentados na microcervejaria durante os ciclos de aproveitamento de biomassa.

Tabela 6 - Concentração de maltose, frutose, glicose, etanol e glicerol durante a fermentação na microcervejaria pela linhagem WB-06. Em vermelho estão destacados os valores obtidos no terceiro dia.

Dia	Maltose (g.L ⁻¹)	Frutose (g.L ⁻¹)	Glicose (g.L ⁻¹)	Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)
1° ciclo						
0	86,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	0,50 ± 0,00	89,50	0,00 ± 0,00	00,00 ± 0,00
1	53,33 ± 2,01	1,79 ± 0,06	0,28 ± 0,02	55,40	1,67 ± 0,08	23,70 ± 1,43
2	12,95 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,95	2,60 ± 0,13	38,42 ± 1,25
3	02,76 ± 0,16	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	02,76	2,91 ± 0,22	42,39 ± 1,46
5	01,21 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	01,21	2,78 ± 0,09	42,20 ± 0,79
6	01,14 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	01,14	2,84 ± 0,04	45,33 ± 0,94
2° ciclo						
0	51,00 ± 0,00	1,25 ± 0,00	1,50 ± 0,00	53,75	0,00 ± 0,00	00,00 ± 0,00
1	29,95 ± 1,46	0,67 ± 0,06	0,89 ± 0,11	31,51	1,33 ± 0,10	19,80 ± 1,73
2	09,61 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	09,61	2,03 ± 0,26	32,26 ± 1,04
3	01,84 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	01,84	2,29 ± 0,15	38,92 ± 1,36
4	01,04 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	01,04	2,39 ± 0,03	40,61 ± 0,90
5	00,93 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	00,93	2,45 ± 0,04	44,35 ± 1,34
3° ciclo						
0	39,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	39,00	0,00 ± 0,00	00,00 ± 0,00
1	19,07 ± 1,21	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	19,07	1,13 ± 0,06	18,67 ± 2,23
2	04,77 ± 0,16	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	04,77	1,94 ± 0,08	32,03 ± 1,70
3	01,40 ± 0,16	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	01,40	2,43 ± 0,02	42,22 ± 2,19
4	00,91 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	00,91	2,44 ± 0,13	42,34 ± 2,40
6	00,91 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	00,91	2,37 ± 0,11	41,71 ± 1,96
7	00,87 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	00,87	2,32 ± 0,16	40,33 ± 2,40

Fonte: O autor.

A partir das fermentações realizadas na microcervejaria foram determinados os principais parâmetros fermentativos relacionados com o consumo das fontes de carbono e a produção dos principais produtos de fermentação. Pode-se notar que a concentração de etanol e glicerol a partir do terceiro dia (em vermelho na tabela) e entre os ciclos obtiveram variações pouco significativas de aproximadamente 40-45 g.L⁻¹ (5,07-5,70% v/v) e 2,5-3,0 g.L⁻¹, respectivamente. Além disso, é possível observar as concentrações dos principais carboidratos fermentescíveis quantificados nesta cerveja, bem como determinar a ordem de maior para menor concentração. Nesse sentido, o dissacarídeo maltose apresentou a maior concentração nos mostos cervejeiros (86,00 g.L⁻¹, 51,00 g.L⁻¹ e 39,00 g.L⁻¹), seguido dos monossacarídeos frutose e glicose. Os carboidratos totais encontram-se praticamente exauridos também a partir do terceiro dia de fermentação. Os gráficos das cinéticas de consumo de carboidratos e produção destes metabólitos (etanol e glicerol), mostrando o perfil metabólico da linhagem WB-06 na microcervejaria, podem ser consultados ao final deste trabalho (**Apêndice A**).

4.1.2 Perfil organoléptico da linhagem WB-06 na microcervejaria

Assim como o etanol e o glicerol, os compostos aqui classificados como organolépticos, uma vez que são produzidos e excretados pelas células para o mosto cervejeiro, por não serem mais utilizados como fontes de carbono, podem ser quantificados. A tabela abaixo (**Tabela 7**) mostra a concentração desses compostos a partir das mesmas fermentações do tópico 5.1.

É possível observar que a cada ciclo de aproveitamento de biomassa a concentração final para cada composto permaneceu inalterada ou não variou significativamente. Ao final do primeiro ciclo as concentrações obtidas para os álcoois superiores ramificados (2MP 42 mg.L⁻¹; 3MB 191 mg.L⁻¹; 2MB 88 mg.L⁻¹) foram maiores que as do segundo ciclo (2MP 35 mg.L⁻¹; 3MB 127 mg.L⁻¹; 2MB 68 mg.L⁻¹), que também superaram as do terceiro ciclo (2MP 21 mg.L⁻¹; 3MB 98 mg.L⁻¹; 2MB 62 mg.L⁻¹). Outros compostos analisados foram o álcool fenilético (2FE) e o seu éster correspondente, o acetato de feniletila (2FEA). Ao final do primeiro ciclo as concentrações obtidas (2FE 175 mg.L⁻¹; 2FEA 71 mg.L⁻¹) foram maiores que as do segundo ciclo (2FE 70 mg.L⁻¹; 2FEA 86 mg.L⁻¹).

¹), que se mostraram semelhantes as do terceiro ciclo (2FE 72 mg.L⁻¹; 2FEA 72 mg.L⁻¹) no que se refere ao álcool. Entretanto, para o acetato de feniletina houve uma flutuação de concentração entre os ciclos. Apesar do decréscimo exacerbado na concentração do álcool feniletílico entre o primeiro e segundo ciclo, os níveis do acetato de feniletina permaneceram estáveis. Sendo assim, é importante ressaltar que os ésteres possuem maior influência quanto ao aroma nas bebidas alcoólicas quando comparados aos álcoois superiores e ácidos orgânicos separadamente.

O acetato de etila (AE) é o éster mais comumente produzido pela levedura. As concentrações deste éster durante os ciclos de aproveitamento de biomassa foram de 69 mg.L⁻¹, 61 mg.L⁻¹ e 43 mg.L⁻¹ para o final do primeiro, segundo e terceiro ciclos, respectivamente.

Para as demais substâncias mencionadas em Material e Métodos e que foram levadas em consideração para a identificação e quantificação no mosto e fermentados cervejeiros e não apareceram neste tópico, significa que não foram detectadas na solução. Os gráficos das cinéticas de produção dos metabólitos organolépticos aqui demonstrados, mostrando o perfil organoléptico da linhagem WB-06 na microcervejaria, podem ser consultados ao final deste trabalho (**Apêndice B**).

Tabela 7 - Concentração dos compostos organolépticos durante a fermentação na microcervejaria pela linhagem WB-06.

Dia	Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	AE (mg.L ⁻¹)	2MP (mg.L ⁻¹)	3MB (mg.L ⁻¹)	2MB (mg.L ⁻¹)	2FE (mg.L ⁻¹)	2FEA (mg.L ⁻¹)
1° ciclo							
0	89,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	55,40	8,00 ± 1,41	24,00 ± 0,00	28,00 ± 2,83	0,00 ± 0,00	104,00 ± 2,83	80,50 ± 0,71
2	12,95	63,00 ± 19,00	64,00 ± 4,24	102,67 ± 6,51	60,50 ± 0,71	153,00 ± 1,41	80,00 ± 0,00
3	2,76	68,50 ± 24,75	39,00 ± 0,00	103,00 ± 17,06	61,50 ± 6,36	125,00 ± 16,97	72,00 ± 0,00
5	1,21	40,50 ± 9,19	33,50 ± 3,54	145,33 ± 10,69	73,50 ± 2,12	144,50 ± 10,61	64,00 ± 1,41
6	1,14	69,33 ± 4,51	41,50 ± 0,71	191,00 ± 14,14	87,50 ± 3,54	174,50 ± 7,78	70,50 ± 2,12
2° ciclo							
0	53,75	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	31,51	31,00 ± 0,00	19,50 ± 7,78	37,00 ± 4,24	43,50 ± 0,71	109,00 ± 2,83	65,50 ± 3,54
2	9,61	31,00 ± 2,83	19,50 ± 13,44	84,50 ± 9,19	49,00 ± 0,00	069,00 ± 26,87	93,00 ± 2,83
3	1,84	37,00 ± 2,08	22,00 ± 9,90	105,50 ± 6,36	51,50 ± 9,19	119,00 ± 11,31	74,50 ± 10,61
4	1,04	51,00 ± 7,78	36,00 ± 1,41	117,00 ± 7,07	53,00 ± 12,73	114,50 ± 21,92	76,00 ± 0,00
5	0,93	61,00 ± 9,90	35,00 ± 4,24	126,50 ± 14,85	68,00 ± 0,00	069,50 ± 26,16	85,50 ± 30,41
3° ciclo							
0	39,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	19,07	14,00 ± 4,00	14,33 ± 3,06	28,67 ± 9,07	43,00 ± 2,83	108,00 ± 9,90	70,50 ± 0,71
2	4,77	31,00 ± 3,00	22,33 ± 3,06	83,33 ± 4,04	51,50 ± 0,71	118,00 ± 1,41	69,50 ± 3,54
3	1,40	44,67 ± 4,16	23,67 ± 3,51	93,67 ± 4,73	56,00 ± 1,41	130,50 ± 9,19	89,50 ± 10,61
4	0,91	47,50 ± 0,71	31,00 ± 13,08	93,67 ± 4,73	58,50 ± 0,71	120,00 ± 1,14	70,50 ± 3,54

6	00,91	49,50 ± 2,12	19,00 ± 6,56	102,50 ± 7,78	62,50 ± 2,12	128,50 ± 2,12	74,50 ± 9,19
7	00,87	43,00 ± 0,00	20,67 ± 3,21	97,67 ± 9,61	61,50 ± 3,54	071,50 ± 2,12	71,50 ± 2,12

Fonte: O autor.

4.2 Perfil metabólico e organoléptico das linhagens estudadas em laboratório

4.2.1 Perfil metabólico das linhagens estudadas em laboratório

Foram realizados 6 (seis) ensaios de fermentação com triplicata biológica para cada linhagem de levedura, totalizando 18 ensaios de fermentação ou 54 quando são consideradas as réplicas realizadas. Para cada um destes ensaios a duração foi de 7 (sete) dias. A tabela abaixo (**Tabela 8**) mostra o consumo das fontes de carbono e a produção de etanol e glicerol para as linhagens de levedura WB-06, JP1 e YLB4000 durante os ciclos de aproveitamento de biomassa.

Assim como foi observado para as concentrações de etanol e glicerol durante as fermentações na microcervejaria, pode-se notar variações discretas na concentração de etanol e glicerol a partir do terceiro dia (em vermelho na tabela) e entre os ciclos de aproveitamento de biomassa. Os valores variaram para etanol e glicerol de, aproximadamente, 54 a 60 g.L⁻¹ (6,97-7,61% v/v) e 2,4 a 2,7 g.L⁻¹, respectivamente, para WB-06. Para a linhagem JP1 esses valores foram de aproximadamente 27 a 32 g.L⁻¹ (3,42-4,06% v/v) e 1,8-2,7 g.L⁻¹, respectivamente. Por fim, para a linhagem YLB4000 os valores obtidos foram de aproximadamente 48-50 g.L⁻¹ (6,09-6,34% v/v) e 2,2-2,4 g.L⁻¹, respectivamente.

Os ensaios de fermentação com as leveduras WB-06 e YLB4000 foram realizados a partir de um mesmo mosto cervejeiro com concentração de carboidratos totais fermentescíveis e quantificados de 78,11 g.L⁻¹. Já para o mosto de cerveja utilizado no ensaio da linhagem JP1 o valor correspondente foi de 40,54 g.L⁻¹. A provável menor disponibilidade de carboidratos fermentescíveis disponibilizados para a linhagem JP1 pode estar relacionada com as menores concentrações de etanol e glicerol produzidos por essa levedura. Entretanto, o rendimento desses metabólitos (etanol e glicerol) será mostrado adiante para cada linhagem de levedura nos ensaios na microcervejaria e de laboratório. Aqui também será destacado que ao final de todas as fermentações todos os açúcares totais quantificados foram exauridos já no terceiro dia de fermentação, com exceção do primeiro ciclo da linhagem WB-06. Os gráficos das cinéticas de consumo de carboidratos e produção

destes metabólitos (etanol e glicerol), mostrando o perfil metabólico dessas linhagens no laboratório, podem ser consultados ao final deste trabalho **(Apêndice C)**.

4.2.2 Perfil organoléptico das linhagens estudadas em laboratório

A tabela abaixo **(Tabela 9)** referente às substâncias organolépticas produzidas pelas linhagens de levedura em laboratório mostra a comparação de produção desses metabólitos no terceiro dia de fermentação para cada linhagem durante os ciclos de biomassa. Além dessas substâncias, a tabela também evidencia o etanol e o glicerol.

Assim como nas fermentações realizadas em ambiente industrial, no laboratório foi observada concentrações que não variaram ou que tiveram variações pouco significativas a partir do terceiro dia de fermentação. Os detalhes dos perfis organolépticos das linhagens WB-06 nos ensaios de laboratório, JP1 e YLB4000 podem ser consultados, respectivamente, nos apêndices deste trabalho **(Apêndices D, E e F)**.

Nas fermentações realizadas em ambiente industrial foi observada a produção de acetato de feniletílica (2FEA) durante os ciclos de aproveitamento de biomassa ($72,00 \text{ g.L}^{-1}$, $74,50 \text{ g.L}^{-1}$ e $89,50 \text{ g.L}^{-1}$). No entanto, não foi observada a produção desse metabólito para os ensaios realizados em laboratório, inclusive para a mesma linhagem de levedura. A exceção foi para o primeiro ciclo da linhagem de JP1, que produziu $73,50 \text{ g.L}^{-1}$ no terceiro dia de fermentação. Além disso, é importante ressaltar que para todas as linhagens houve a produção do álcool antecessor deste éster. Porém, as maiores concentrações do álcool feniletílico também foram observadas em ambiente industrial ($125,00 \text{ g.L}^{-1}$, $119,00 \text{ g.L}^{-1}$ e $130,50 \text{ g.L}^{-1}$).

No que se refere aos álcoois de cadeias ramificadas: álcool isobutílico (2MP), álcool isoamílico (3MB) e álcool amílico ativo (2MB) foram observadas as maiores instabilidades de concentração entre os ciclos. De modo geral, o álcool isoamílico foi o analito que apresentou maiores concentrações dentro dos compostos organolépticos quantificados. Essa é uma análise importante visto que esse álcool é precursor do acetato de isoamila, que é um éster de

aroma importante para a cerveja de trigo estilo Weizen, por atribuir aroma de banana característico da bebida. A linhagem de levedura WB-06 foi a que apresentou maiores concentrações para esse álcool, tanto em ambiente industrial quanto nos ensaios realizados em laboratório. Além disso, não foi observada a produção de álcool amílico ativo (2MB) pela linhagem YLB4000 durante os ciclos de fermentação, assim como a linhagem JP1 apresentou baixas concentrações desse álcool quando comparada às demais linhagens analisadas.

Para o acetato de etila (AE) as concentrações ao terceiro dia de fermentação e entre os recícos dos ensaios realizados em laboratório não pareceram diminuir de forma contínua como ocorreram nas fermentações industriais. As linhagens WB-06 e YLB4000 apresentaram um perfil de comportamento mais semelhante que a linhagem JP1.

4.3 Ajustes do perfil metabólico e organoléptico da linhagem WB-06

A linhagem de levedura escolhida para os ensaios de ajustes metabólicos e organolépticos foi a WB-06, por ser, principalmente, a linhagem que apresentou maiores concentrações de álcool isoamílico, importante por atribuir aroma de banana característico da bebida em estudo, por ser a única linhagem em que foi observada a produção de acetato de feniletila, que contribui para uma bebida com características florais e pela maior facilidade de manuseio na microcervejaria, por ser comercializada liofilizada.

Tabela 8 - Concentração de carboidratos totais, etanol e glicerol durante as fermentações das linhagens WB-06, JP1 e YLB4000 em laboratório.

Dia	Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	
		WB-06			JP1			YLB4000		
					1° ciclo					
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
1	76,53	1,09 ± 0,35	16,78 ± 1,16	29,11	1,21 ± 0,24	16,94 ± 1,54	31,22	1,59 ± 0,07	28,51 ± 1,17	
2	40,77	2,31 ± 0,09	35,95 ± 4,20	0,00	1,86 ± 0,22	28,82 ± 1,33	0,00	2,34 ± 0,08	47,73 ± 0,56	
3	14,05	2,44 ± 0,06	43,06 ± 4,09	0,00	1,82 ± 0,11	27,52 ± 1,44	0,00	2,23 ± 0,02	48,94 ± 0,14	
4	-	-	-	-	-	-	0,00	2,37 ± 0,02	46,11 ± 2,32	
5	0,00	2,67 ± 0,25	53,80 ± 2,14	0,00	1,87 ± 0,12	27,61 ± 1,36	-	-	-	
6	0,00	2,62 ± 0,18	55,24 ± 1,31	0,00	1,84 ± 0,19	26,83 ± 0,76	0,00	2,43 ± 0,04	48,88 ± 1,08	
7	0,00	2,51 ± 0,17	54,88 ± 1,30	0,00	1,82 ± 0,20	27,77 ± 0,88	0,00	2,42 ± 0,05	47,99 ± 0,68	
					2° ciclo					
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
1	-	-	-	2,05	1,69 ± 0,08	25,16 ± 3,54	00,00	2,30 ± 0,03	50,01 ± 0,19	
2	7,52	2,43 ± 0,07	50,58 ± 3,48	0,00	1,71 ± 0,21	26,41 ± 3,58	-	-	-	
3	0,00	2,52 ± 0,04	54,08 ± 2,57	0,00	1,81 ± 0,24	31,56 ± 0,63	0,00	2,27 ± 0,04	51,29 ± 0,06	
4	0,00	2,42 ± 0,14	54,98 ± 2,30	-	-	-	0,00	2,47 ± 0,21	49,28 ± 4,88	
5	0,00	2,53 ± 0,12	55,79 ± 1,69	0,00	1,82 ± 0,11	22,66 ± 3,69	0,00	2,38 ± 0,11	31,10 ± 4,03	
6	0,00	2,47 ± 0,15	55,57 ± 3,09	0,00	1,92 ± 0,30	16,64 ± 1,44	0,00	2,46 ± 0,21	53,46 ± 0,97	
7	0,00	2,49 ± 0,11	57,60 ± 2,48	0,00	1,65 ± 0,07	16,99 ± 1,24	0,00	2,28 ± 0,17	51,91 ± 0,84	
					3° ciclo					
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
1	13,76	2,11 ± 0,09	40,43 ± 2,09	0,00	1,89 ± 0,06	26,83 ± 1,18	0,00	2,40 ± 0,40	4,07 ± 4,13	
2	0,00	2,42 ± 0,06	52,94 ± 3,71	0,00	1,83 ± 0,08	30,52 ± 3,13	0,00	2,64 ± 0,00	41,81 ± 3,01	
3	0,00	2,41 ± 0,05	54,62 ± 1,10	0,00	1,94 ± 0,14	26,81 ± 3,62	0,00	2,66 ± 0,07	51,02 ± 0,92	
4	0,00	2,43 ± 0,09	56,62 ± 1,62	0,00	1,93 ± 0,14	21,19 ± 1,52	0,00	2,64 ± 0,02	45,56 ± 4,34	
5	-	-	-	0,00	1,86 ± 0,04	22,89 ± 2,23	0,00	2,40 ± 0,25	49,75 ± 0,95	
6	0,00	2,48 ± 0,04	57,60 ± 2,54	-	-	-	-	-	-	
7	0,00	2,64 ± 0,14	59,90 ± 5,84	0,00	1,72 ± 0,09	28,80 ± 4,52	0,00	2,20 ± 0,01	49,67 ± 1,51	
					4° ciclo					
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
1	25,70	2,46 ± 0,11	38,54 ± 2,91	0,00	1,80 ± 0,19	22,26 ± 1,09	0,00	1,99 ± 0,32	42,71 ± 7,56	

2	0,00	2,74 ± 0,19	57,25 ± 5,68	0,00	1,85 ± 0,23	22,96 ± 3,03	0,00	2,51 ± 0,37	50,03 ± 1,00
3	0,00	2,61 ± 0,10	55,55 ± 2,89	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	0,00	1,75 ± 0,12	15,28 ± 1,76	0,00	2,48 ± 0,37	49,28 ± 1,30
5	0,00	2,60 ± 0,04	56,78 ± 0,26	0,00	1,81 ± 0,14	18,85 ± 0,80	0,00	2,34 ± 0,02	49,32 ± 0,35
6	0,00	2,59 ± 0,10	57,98 ± 2,61	0,00	1,75 ± 0,09	24,36 ± 3,72	0,00	2,27 ± 0,06	49,49 ± 1,01
7	0,00	2,56 ± 0,43	60,70 ± 4,90	0,00	2,03 ± 0,04	18,92 ± 0,87	0,00	2,31 ± 0,04	48,40 ± 1,21
5° ciclo									
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	25,55	2,20 ± 0,11	43,13 ± 1,48	0,00	2,12 ± 0,15	23,27 ± 1,58	0,00	2,04 ± 0,03	48,17 ± 0,78
2	0,00	2,28 ± 0,29	52,78 ± 0,77	0,00	2,57 ± 0,07	31,63 ± 1,27	0,00	2,04 ± 0,08	48,68 ± 0,85
3	0,00	2,54 ± 0,13	54,93 ± 4,36	0,00	2,73 ± 0,15	28,49 ± 2,91	0,00	2,34 ± 0,23	49,28 ± 0,05
4	0,00	2,51 ± 0,13	53,88 ± 0,42	0,00	2,45 ± 0,08	25,26 ± 0,09	-	-	-
5	0,00	2,49 ± 0,10	54,17 ± 1,17	0,00	2,36 ± 0,02	24,59 ± 3,70	0,00	2,38 ± 0,17	50,22 ± 0,34
6	-	-	-	-	-	-	0,00	2,44 ± 0,22	50,70 ± 0,80
7	0,00	2,46 ± 0,18	54,44 ± 2,99	0,00	2,18 ± 0,15	28,00 ± 2,06	0,00	2,42 ± 0,27	50,67 ± 2,80
6° ciclo									
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	25,88	1,96 ± 0,08	38,77 ± 3,03	0,00	2,06 ± 0,03	20,99 ± 1,44	-	-	-
2	-	-	-	0,00	2,16 ± 0,15	23,35 ± 2,45	-	-	-
3	0,00	2,49 ± 0,05	54,17 ± 0,98	0,00	2,21 ± 0,09	27,27 ± 0,15	-	-	-
4	0,00	2,68 ± 0,17	57,84 ± 1,60	0,00	2,02 ± 0,01	23,78 ± 1,07	-	-	-
5	0,00	2,48 ± 0,08	55,71 ± 0,82	0,00	1,93 ± 0,08	22,78 ± 0,23	-	-	-
6	0,00	2,52 ± 0,07	54,10 ± 0,58	0,00	2,08 ± 0,25	26,00 ± 3,29	-	-	-
7	0,00	2,42 ± 0,08	55,22 ± 1,80	-	-	-	-	-	-

(-) Amostra não coletada

Fonte: O autor.

Tabela 9 - Comparação de produção das substâncias organolépticas no terceiro dia de fermentação para cada linhagem de levedura durante os ciclos de biomassa.

Ciclos	Carboidratos residuais (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	AE (mg.L ⁻¹)	2MP (mg.L ⁻¹)	3MB (mg.L ⁻¹)	2MB (mg.L ⁻¹)	2FE (mg.L ⁻¹)	2FEA (mg.L ⁻¹)
WB-06 IND									
1°	02,76	2,91 ± 0,22	42,39 ± 1,46	68,50 ± 24,75	39,00 ± 0,00	103,00 ± 17,06	61,50 ± 6,36	125,00 ± 16,97	72,00 ± 0,00
2°	01,84	2,29 ± 0,15	38,92 ± 1,36	37,00 ± 2,08	22,00 ± 9,90	105,50 ± 6,36	51,50 ± 9,19	119,00 ± 11,31	74,50 ± 10,61
3°	01,40	2,43 ± 0,02	42,22 ± 2,19	44,67 ± 4,16	23,67 ± 3,51	93,67 ± 4,73	56,00 ± 1,41	130,50 ± 9,19	89,50 ± 10,61
W6-06 LAB									
1°	14,05	2,44 ± 0,06	43,06 ± 4,09	51,15 ± 2,37	80,92 ± 6,56	98,66 ± 13,79	1,03 ± 0,00	36,51 ± 8,13	0,00 ± 0,00
2°	0,00	2,52 ± 0,04	54,08 ± 2,57	58,19 ± 4,45	102,31 ± 8,34	140,94 ± 25,24	4,05 ± 1,19	40,75 ± 2,04	0,00 ± 0,00
3°	0,00	2,41 ± 0,05	54,62 ± 1,10	39,93 ± 0,54	42,64 ± 3,46	114,04 ± 10,99	6,67 ± 0,57	41,61 ± 2,19	0,00 ± 0,00
4°	0,00	2,61 ± 0,10	55,55 ± 2,89	42,92 ± 0,48	45,37 ± 1,89	108,12 ± 6,91	5,41 ± 1,46	38,72 ± 3,92	0,00 ± 0,00
5°	0,00	2,54 ± 0,13	54,93 ± 4,36	46,09 ± 4,13	41,86 ± 0,60	92,69 ± 5,81	2,13 ± 0,72	33,60 ± 3,70	0,00 ± 0,00
6°	0,00	2,49 ± 0,05	54,17 ± 0,98	47,02 ± 5,85	49,99 ± 4,07	121,90 ± 10,46	8,64 ± 1,53	46,90 ± 2,76	0,00 ± 0,00
JP1									
1°	0,00	1,82 ± 0,11	27,52 ± 1,44	08,50 ± 20,12	04,33 ± 2,52	63,67 ± 4,51	48,50 ± 0,71	114,50 ± 2,12	73,50 ± 0,71
2°	0,00	1,81 ± 0,24	31,56 ± 0,63	06,19 ± 0,78	03,21 ± 0,64	55,80 ± 0,81	0,00 ± 0,00	21,09 ± 0,63	0,00 ± 0,00
3°	0,00	1,94 ± 0,14	26,81 ± 3,62	12,53 ± 2,05	07,54 ± 3,40	72,92 ± 1,40	0,00 ± 0,00	35,57 ± 0,02	0,00 ± 0,00
4°	0,00	1,75 ± 0,12	15,28 ± 1,76	12,89 ± 1,22	18,87 ± 5,05	92,34 ± 8,92	3,23 ± 0,00	49,15 ± 11,21	0,00 ± 0,00
5°	0,00	2,73 ± 0,15	28,49 ± 2,91	30,32 ± 20,73	50,42 ± 22,69	123,38 ± 0,00	8,48 ± 0,00	60,53 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6°	0,00	2,21 ± 0,09	27,27 ± 0,15	-	-	-	-	-	-
YLB4000									
1°	0,00	2,23 ± 0,02	48,94 ± 0,14	42,43 ± 3,90	47,03 ± 5,47	79,62 ± 2,63	0,00 ± 0,00	33,61 ± 2,04	0,00 ± 0,00
2°	0,00	2,27 ± 0,04	51,29 ± 0,06	40,76 ± 0,99	32,17 ± 1,37	76,15 ± 5,71	0,00 ± 0,00	29,90 ± 1,55	0,00 ± 0,00
3°	0,00	2,66 ± 0,07	51,02 ± 0,92	40,08 ± 0,48	55,31 ± 2,00	67,74 ± 10,73	0,00 ± 0,00	38,96 ± 0,00	0,00 ± 0,00
4°	0,00	2,48 ± 0,37	49,28 ± 1,30	45,50 ± 8,53	51,68 ± 0,00	69,25 ± 0,00	0,00 ± 0,00	48,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00
5°	0,00	2,34 ± 0,23	49,28 ± 0,05	42,16 ± 1,99	39,77 ± 2,36	75,16 ± 3,45	0,00 ± 0,00	29,57 ± 1,85	0,00 ± 0,00
6°	-	-	-	40,85 ± 0,52	35,65 ± 0,44	67,77 ± 1,35	0,00 ± 0,00	23,44 ± 0,53	0,00 ± 0,00

(-): Amostra não coletada; (IND): industrial e (LAB): Laboratório.

Fonte: O autor.

4.3.1 Ajustes do perfil metabólico da linhagem WB-06

A tabela abaixo (**Tabela 10**) mostra as concentrações de etanol e glicerol para os ensaios de ajustes realizados para a linhagem de levedura WB-06, que envolve mesma temperatura entre os ciclos (18 °C), mesma massa de inóculo entre os ciclos e menor tempo de exposição das células às condições de estresse na fermentação (redução para três dias). É possível observar que, a partir dos ajustes realizados, maltose residual ainda é encontrada no terceiro dia (em vermelho na tabela) de fermentação para todos os ciclos de aproveitamento de biomassa. Sendo assim, parte da fonte de carbono ofertada para a levedura não está sendo utilizada para a produção de metabólitos desejáveis para a bebida, como o etanol, glicerol e as substâncias organolépticas quantificadas neste estudo. Além disso, é possível notar que a concentração de etanol e glicerol variaram entre aproximadamente 29-39 g.L⁻¹ (3,68-4,95% v/v) e 1,27-1,90 g.L⁻¹, respectivamente. As concentrações desses compostos foram diminuindo à medida que os ciclos foram acontecendo, até que estabilizaram em concentrações de 29,59-32,76 g.L⁻¹ (3,75-4,16% v/v) e 1,27-1,37 g.L⁻¹, respectivamente. Os gráficos da cinética de produção de etanol e glicerol, bem como do consumo dos açúcares, podem ser consultados mais adiante (**Apêndice G**).

Tabela 10 - Concentração de etanol e glicerol durante os ensaios de ajustes das fermentações da linhagem WB-06. Em vermelho estão destacados os valores obtidos no terceiro dia.

Dia	Maltose (g.L ⁻¹)	Frutose (g.L ⁻¹)	Glicose (g.L ⁻¹)	Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)
1° ciclo						
0	59,21 ± 0,77	0,95 ± 0,06	4,90 ± 0,40	65,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	80,68 ± 2,00	2,18 ± 0,20	1,76 ± 0,20	84,62	0,96 ± 0,08	15,57 ± 1,53
2	42,82 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	42,82	2,58 ± 0,29	30,46 ± 0,18
3	21,41 ± 2,39	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	21,41	1,90 ± 0,09	39,27 ± 1,01
2° ciclo						
0	59,21 ± 0,77	0,95 ± 0,06	4,90 ± 0,40	65,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	60,43 ± 1,94	1,46 ± 0,11	0,48 ± 0,05	62,37	1,09 ± 0,03	16,77 ± 1,17
2	36,77 ± 1,75	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	36,77	1,47 ± 0,04	28,94 ± 1,44
3	19,71 ± 1,81	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	19,71	1,49 ± 0,04	35,70 ± 2,39
3° ciclo						
0	59,21 ± 0,77	0,95 ± 0,06	4,90 ± 0,40	65,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	60,51 ± 1,08	1,58 ± 0,03	0,90 ± 0,07	62,99	0,88 ± 0,04	13,37 ± 0,04
2	39,91 ± 1,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	39,91	1,06 ± 0,10	23,76 ± 0,14
3	28,17 ± 1,31	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	28,17	1,27 ± 0,12	31,09 ± 1,49
4° ciclo						
0	59,21 ± 0,77	0,95 ± 0,06	4,90 ± 0,40	65,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	54,18 ± 0,65	1,37 ± 0,01	0,77 ± 0,09	56,32	0,83 ± 0,06	12,75 ± 0,90
2	39,66 ± 0,44	0,30 ± 0,00	0,00 ± 0,00	39,96	1,50 ± 0,55	22,42 ± 0,28

3	27,14 ± 1,47	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	27,14	1,30 ± 0,08	29,59 ± 1,60
				5° ciclo		
0	59,21 ± 0,77	0,95 ± 0,06	4,90 ± 0,40	65,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	51,57 ± 2,16	1,16 ± 0,07	0,50 ± 0,03	53,23	0,84 ± 0,08	12,66 ± 0,17
2	36,86 ± 3,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	36,86	1,23 ± 0,07	23,36 ± 1,39
3	23,41 ± 2,38	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	23,41	1,30 ± 0,04	30,23 ± 1,06
				6° ciclo		
0	59,21 ± 0,77	0,95 ± 0,06	4,90 ± 0,40	65,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	54,07 ± 2,87	1,23 ± 0,12	0,61 ± 0,01	55,91	0,89 ± 0,04	12,65 ± 1,16
2	35,28 ± 1,81	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	35,28	1,09 ± 0,06	22,72 ± 0,20
3	25,69 ± 2,62	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	25,69	1,37 ± 0,15	32,76 ± 2,55

Fonte: O autor

A tabela seguinte (**Tabela 11**) mostra os rendimentos de etanol e glicerol no terceiro dia de fermentação e em cada ciclo de aproveitamento de biomassa a partir dos mostos (12 °P) utilizados durante os experimentos para cada linhagem de levedura. É possível observar que, a partir desses mostos utilizados, a linhagem de levedura que obteve maiores rendimentos para o etanol e glicerol foi a WB-06 em ensaios realizados em laboratório. Para o etanol os rendimentos encontrados foram 0,41, 0,45, 0,46, 0,46, 0,46, e 0,46 g.g durante os ciclos, já para o glicerol os rendimentos foram 0,023, 0,021, 0,020, 0,022, 0,021 e 0,021 g/g. A linhagem YLB4000 obteve valores para o rendimento de etanol e glicerol próximos ao da WB-06, já a linhagem JP1 apresentou valores de rendimento para mosto com mesmo grau Plato, como observado na tabela. Além disso, é perceptível que os rendimentos de etanol (0,40, 0,36, 0,34, 0,32, 0,31 e 0,35 g/g) e glicerol (0,019, 0,015, 0,014, 0,014, 0,013 e 0,015 g/g) foram menores nos ensaios de ajustes da fermentação para a mesma linhagem de levedura. Assim como não foi notado um decréscimo nos rendimentos durante os ciclos para a mesma linhagem de levedura.

Tabela 11 - Rendimentos de etanol e glicerol no terceiro dia de fermentação para todos os experimentos realizados.

Ciclos	Carboidratos Residuais (g.L ⁻¹) Mosto 12 °P	Y-Glicerol (g/g)	Y-Etanol (g/g)
WB-06 IND			
1°	2,76	0,025	0,36
2°	1,84	0,019	0,33
3°	1,40	0,020	0,36
WB-06 LAB			
1°	14,05	0,023	0,41
2°	0,00	0,021	0,45
3°	0,00	0,020	0,46

4°	0,00	0,022	0,46
5°	0,00	0,021	0,46
6°	0,00	0,021	0,46
JP1			
1°	0,00	0,015	0,23
2°	0,00	0,015	0,26
3°	0,00	0,016	0,22
4°	0,00	0,015	0,19
5°	0,00	0,023	0,24
6°	0,00	0,018	0,23
YLB4000			
1°	0,00	0,019	0,41
2°	0,00	0,019	0,43
3°	0,00	0,022	0,43
4°	0,00	0,021	0,42
5°	0,00	0,020	0,41
6°	0,00	-	-
WB-06 Ajustes			
1°	21,41	0,019	0,40
2°	19,71	0,015	0,36
3°	28,17	0,014	0,34
4°	27,14	0,014	0,32
5°	23,41	0,013	0,31
6°	25,69	0,015	0,35

(-): Amostra não coletada; (IND): industrial e (LAB): Laboratório.

Fonte: O autor.

5 DISCUSSÃO

As concentrações dos principais açúcares fermentescíveis obtidos neste trabalho concordam com os dados disponíveis na literatura. A ordem de maior para menor concentração destes açúcares foi do dissacarídeo maltose para os monossacarídeos frutose e glicose. A tabela abaixo (**Tabela 12**) mostra a comparação entre as concentrações dos principais açúcares quantificados no mosto cervejeiro utilizado neste trabalho com dados disponíveis na literatura.

Tabela 12 - Comparação das concentrações dos principais açúcares encontrados em mosto cervejeiro.

Mosto (°P)	Maltose (g.L ⁻¹)	Sacarose (g.L ⁻¹)	Maltotriose (g.L ⁻¹)	Glicose (g.L ⁻¹)	Frutose (g.L ⁻¹)	Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	Referências
12,00	86,00	-	-	0,50	3,00	89,50	Este trabalho
12,00	51,00	-	-	1,50	1,25	53,75	Este trabalho
12,00	39,00	-	-	0,00	0,00	39,00	Este trabalho
12,00	31,54	-	-	7,72	1,38	40,64	Este trabalho
12,00	59,21	-	-	4,90	0,95	65,06	Este trabalho
12,00	68,14	-	-	8,56	1,41	78,11	Este trabalho
14,00	67,10	-	16,90	12,50	4,40	100,90	Piddocke et al., 2009
-	59,00	3,0	10,00	18,00	2,00	92,00	He et a., 2014
10,70	52,40	2,3	12,80	9,10	2,11	78,71	MacWillian, 1968
12,32	60,40	4,2	17,70	10,30	1,55	94,15	MacWillian, 1968
11,90	55,70	3,5	16,60	8,70	1,30	85,80	MacWillian, 1968
11,55	55,00	1,0	13,00	5,00	1,00	75,00	MacWillian, 1968
12,00	57,80	4,6	14,60	14,70	3,90	95,60	MacWillian, 1968

Fonte: O autor.

Não foi possível realizar a quantificação do trissacarídeo maltotriose neste estudo. Ou seja, o substrato com a segunda maior concentração no mosto cervejeiro. Além disso, foi a banda cromatográfica referente ao substrato que apresentou o maior tempo para ser exaurido durante o processo

fermentativo (**Apêndice H**). Essas interpretações entram em acordo com as descrições referentes ao metabolismo da maltotriose pelas leveduras durante a fermentação de cerveja. Outro aspecto importante a ser notificado é que a maltose e a sacarose apresentaram o mesmo tempo de retenção para as condições cromatográficas adotadas neste trabalho (**Apêndice I**). Sendo assim, não é possível calcular com exatidão a concentração de ambas. Porém, como a concentração de maltose sobre a de sacarose é de aproximadamente 95% superior no mosto de cerveja (GJERTSEN, 1953; HE et al., 2014) e a banda cromatográfica da maltose tem uma área maior do que a banda cromatográfica da sacarose para uma mesma concentração, foi considerada a equação da reta obtida pela curva de calibração da maltose para calcular a concentração referente à maltose a partir da banda contendo os dois açúcares.

As leveduras utilizam o conteúdo inicial do mosto cervejeiro durante a fermentação para consumir açúcares fermentescíveis e acabam por produzir metabólitos primários e secundários importantes para as bebidas alcoólicas. Dentre os metabólitos primários que são formados durante o crescimento celular, está o etanol, o dióxido de carbono e o glicerol (KURTZMAN et al., 2011; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

A composição desses carboidratos no mosto de cerveja e a maneira como são utilizados pelas leveduras têm uma influência direta na eficiência de fermentação e metabolismo das células (BOULTON; QUAIN, 2001). As leveduras utilizam essas fontes variadas para a produção dos metabólitos primários enquanto crescem. Esses metabólitos são fundamentais para as bebidas, apesar de pouco influenciar no aroma (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). O álcool etílico ou etanol produzido a partir da fermentação alcoólica ou etanólica é o composto que define a cerveja e as demais bebidas que o contém como uma bebida alcoólica. Esse composto pode ser produzido pela levedura *S. cerevisiae* em condições anaeróbicas ou em um metabolismo respiro-fermentativo como abordado anteriormente (**Figura 2**). O teor alcoólico das cervejas pode variar a depender do seu estilo e não se destaca em concentrações inferiores a 6% v/v. De modo geral, o teor alcoólico das cervejas de trigo estilo Weizen varia de 4,3 a 5,6 % v/v (MORADO, 2017). Como mostrado anteriormente, as linhagens de levedura aqui estudadas

apresentaram uma concentração v/v dentro ou maior que essa margem de concentração do etanol, com exceção para a linhagem JP1, que apresentou teor que variou de 3,42 a 4,06% v/v. Já o glicerol produzido pelas leveduras sob condição limitante de oxigênio objetiva reoxidar o NADH produzido durante os processos de oxidação (VANDIJKEN; SCHEFFERS, 1986). Entretanto, o NADH também pode ser produzido pela biossíntese de aminoácidos. Além disso, o glicerol é um álcool viscoso que confere corpo à cerveja e que pode influenciar no aroma. Nesse sentido, a sua concentração é também um parâmetro essencial. O glicerol pode variar de 1 a 3 g.L⁻¹ com um limite de 10 g.L⁻¹ em cervejas (PARKER; RICHARDSON, 1970; BRIGGS, 2004). Sendo assim, todas as concentrações de glicerol encontradas neste estudo estão abaixo deste limiar de concentração.

Além disso, os valores de concentrações de etanol e glicerol encontradas para os ensaios de fermentação da cerveja deste trabalho superam, em sua maioria, os valores obtidos de cervejas de trigo artesanais e de grandes cervejarias já com processamento industrial finalizado e que se encontram disponíveis no mercado. Os valores de concentração de etanol obtidos para as seis cervejas comparativas analisadas foram 29,72, 24,64, 29,34, 35,60, 25,43 e 23,75 g.L⁻¹ e para o glicerol foram 3,16, 2,64, 2,75, 2,37, 2,07 e 1,84 g.L⁻¹. Sendo assim, as concentrações obtidas nos ensaios deste trabalho no que se refere à etanol e glicerol parecem ser viáveis para comercialização, sendo necessários estudos mais apurados com o produto finalizado.

Observando as tabelas referentes à cinética de consumo dos açúcares fermentescíveis e de produção dos metabólitos primários durante os ciclos de aproveitamento de biomassa é possível observar que, independente da concentração inicial de substratos do mosto cervejeiro, temperatura de fermentação e concentração do inóculo mais o “trub”, o perfil metabólico mantém-se com pouca variação a partir do terceiro dia de fermentação. Nesse sentido, para os analitos quantificados, a fermentação está encerrada ao terceiro dia. A partir desse tempo, os substratos quantificados estão exauridos, com exceção dos ensaios de ajustes da WB-06, onde os metabólitos primários pouco alteram a sua concentração. O tempo que excede o término da

fermentação ao terceiro dia pode promover redução na viabilidade celular devido aos estresses encontrados pelas leveduras no tanque de fermentação como, por exemplo, altas concentrações de etanol, alta pressão e de metabólitos secundários. Além disso, é possível supor a partir dos resultados encontrados que as leveduras durante os seus ciclos tornaram-se mais adaptadas ao mosto de cerveja de trigo devido ao consumo acelerado dos substratos a cada ciclo subsequente.

O aroma das cervejas é dado pela somatória de uma variedade de compostos produzidos durante diferentes estágios da fermentação. Para o conjunto dessas substâncias de uma bebida alcoólica dá-se o nome de “buquê”. Nesse “buquê” os principais responsáveis pelos aromas são os metabólitos secundários produzidos pela levedura como intermediários de fermentação e subprodutos em um complexo de rotas metabólicas que são reguladas muito especificamente (MEILGAARD, 1975; STEWART, 2017). Os principais responsáveis pelo aroma são os álcoois superiores e os ésteres, que podem ser encontrados na literatura quanto ao seu limiar organoléptico para cervejas da família *Lager* e *Ale* em sua generalidade (STEWART, 2017). Sendo assim, a tabela abaixo (**Tabela 13**) mostra os dados já mencionados anteriormente para as substâncias organolépticas aqui estudadas no terceiro dia de fermentação com a comparação do limiar organoléptico dessas substâncias relatadas por Stewart (2017) e outros valores de concentração mensurados em cervejas e disponíveis na literatura.

Os álcoois superiores de cadeia ramificada (2MP, 3MB e 2MB) são formados a partir da degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina) (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000) e contribuem para as bebidas alcoólicas por intensificar o teor alcoólico e atribuir aromas específicos (BOULTON; QUAIN, 2008). O álcool isobutílico ou isobutanol é relatado na literatura com aroma semelhante ao de um solvente (STEWART, 2017), enquanto que o álcool isoamílico é relacionado com um aroma apenas alcoólico (STEWART, 2017), mas também com o aroma de banana (PARENTE, 2013). Já o álcool amílico ativo é um álcool descrito como possuindo apenas um aroma alcoólico (STEWART, 2017).

Tabela 13 - Comparação das concentrações das substâncias organolépticas deste trabalho com dados disponíveis na literatura.

Ciclos	Referências	AE (mg.L ⁻¹)	2MP (mg.L ⁻¹)	3MB (mg.L ⁻¹)	2MB (mg.L ⁻¹)	2FE (mg.L ⁻¹)	2FEA (mg.L ⁻¹)	Compostos aromáticos ativos (CAA) (mg.L ⁻¹)
WB-06 Ind.								
1°	Este trabalho	68,50 ± 24,75	39,00 ± 0,00	103,00 ± 17,06	61,50 ± 6,36	125,00 ± 16,97	72,00 ± 0,00	469,00
2°	Este trabalho	37,00 ± 2,08	22,00 ± 9,90	105,50 ± 6,36	51,50 ± 9,19	119,00 ± 11,31	74,50 ± 10,61	409,50
3°	Este trabalho	44,67 ± 4,16	23,67 ± 3,51	93,67 ± 4,73	56,00 ± 1,41	130,50 ± 9,19	89,50 ± 10,61	438,01
WB-06 Lab.								
1°	Este trabalho	51,15 ± 2,37	80,92 ± 6,56	98,66 ± 13,79	1,03 ± 0,00	36,51 ± 8,13	0,00 ± 0,00	268,27
2°	Este trabalho	58,19 ± 4,45	102,31 ± 8,34	140,94 ± 25,24	4,05 ± 1,19	40,75 ± 2,04	0,00 ± 0,00	346,24
3°	Este trabalho	39,93 ± 0,54	42,64 ± 3,46	114,04 ± 10,99	6,67 ± 0,57	41,61 ± 2,19	0,00 ± 0,00	245,25
4°	Este trabalho	42,92 ± 0,48	45,37 ± 1,89	108,12 ± 6,91	5,41 ± 1,46	38,72 ± 3,92	0,00 ± 0,00	240,54
5°	Este trabalho	46,09 ± 4,13	41,86 ± 0,60	92,69 ± 5,81	2,13 ± 0,72	33,60 ± 3,70	0,00 ± 0,00	216,37
6°	Este trabalho	47,02 ± 5,85	49,99 ± 4,07	121,90 ± 10,46	8,64 ± 1,53	46,90 ± 2,76	0,00 ± 0,00	274,46
JP1								
1°	Este trabalho	8,50 ± 20,12	4,33 ± 2,52	63,67 ± 4,51	48,50 ± 0,71	114,50 ± 2,12	73,50 ± 0,71	313,00
2°	Este trabalho	6,19 ± 0,78	3,21 ± 0,64	55,80 ± 0,81	0,00 ± 0,00	21,09 ± 0,63	0,00 ± 0,00	086,29
3°	Este trabalho	12,53 ± 2,05	7,54 ± 3,40	72,92 ± 1,40	0,00 ± 0,00	35,57 ± 0,02	0,00 ± 0,00	128,56
4°	Este trabalho	12,89 ± 1,22	18,87 ± 5,05	92,34 ± 8,92	3,23 ± 0,00	49,15 ± 11,21	0,00 ± 0,00	176,48
5°	Este trabalho	30,32 ± 20,73	50,42 ± 22,69	123,38 ± 0,00	8,48 ± 0,00	60,53 ± 0,00	0,00 ± 0,00	273,13
6°	Este trabalho	-	-	-	-	-	-	-
YLB4000								
1°	Este trabalho	42,43 ± 3,90	47,03 ± 5,47	79,62 ± 2,63	0,00 ± 0,00	33,61 ± 2,04	0,00 ± 0,00	202,69
2°	Este trabalho	40,76 ± 0,99	32,17 ± 1,37	76,15 ± 5,71	0,00 ± 0,00	29,90 ± 1,55	0,00 ± 0,00	178,98
3°	Este trabalho	40,08 ± 0,48	55,31 ± 2,00	67,74 ± 10,73	0,00 ± 0,00	38,96 ± 0,00	0,00 ± 0,00	202,09
4°	Este trabalho	45,50 ± 8,53	51,68 ± 0,00	69,25 ± 0,00	0,00 ± 0,00	48,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	214,46
5°	Este trabalho	42,16 ± 1,99	39,77 ± 2,36	75,16 ± 3,45	0,00 ± 0,00	29,57 ± 1,85	0,00 ± 0,00	186,66
6°	Este trabalho	40,85 ± 0,52	35,65 ± 0,44	67,77 ± 1,35	0,00 ± 0,00	23,44 ± 0,53	0,00 ± 0,00	167,71
-	Stewart, 2017	3	70	65	65	125	0,4	328,4
-	Piddocke, 2009	21-30	-	50-70	-	-	-	-
-	Piddocke, 2009	14,5	-	55,7	-	-	-	-

Fonte: O autor.

Entretanto, não foi possível realizar a cinética de consumo de aminoácidos livres durante o processo fermentativo. Contudo, para a biossíntese desses álcoois pode existir a conexão entre as vias metabólicas referentes à fonte de carbono e de nitrogênio. A formação do álcool isobutílico ocorre a partir do catabolismo da valina, enquanto que as dos álcoois isoamílico e amílico ativo ocorrem a partir do catabolismo da leucina e isoleucina, respectivamente. Uma vez que são produzidos, esses compostos são excretados pela célula para o mosto cervejeiro por não serem mais utilizados como fontes de carbono. Sendo assim, foi possível observar que a cada ciclo de aproveitamento de biomassa a concentração final para cada composto permaneceu inalterada ou obteve decréscimo para as fermentações industriais. Já para os ensaios realizados em laboratório essa afirmação não é verdadeira. As concentrações desses álcoois nas fermentações industriais estão acima do limiar organoléptico relatado por Stewart (2017) para o álcool isoamílico, próximas para o álcool amílico ativo e inferiores para o álcool isobutílico. No entanto, é importante abordar que altas concentrações de álcool etílico e de álcoois superiores na cerveja também podem estar relacionadas à maior propensão de obter veisalgia, popularmente conhecida como ressaca.

Alguns outros pontos importantes a serem discutidos é que, em concordância com os dados obtidos no perfil metabólito dessa cerveja, as produções desses compostos também tiveram pouca variação a partir do terceiro dia de fermentação, com exceção do álcool isoamílico durante os ciclos industriais. Entretanto, obter maiores concentrações de álcool isoamílico pode ser importante para o processamento de uma cerveja de trigo estilo Weizen, já que esse álcool é o precursor do acetato de isoamila. O acetato de isoamila é um éster que possui aroma de banana, que é uma das principais características presente nesse estilo de cerveja. Sendo assim, maiores concentrações de álcool isoamílico podem estar relacionadas à maior concentração desse éster de interesse no produto de fermentação. Porém, mesmo para esse álcool, a tendência durante os ciclos é manter-se com concentração com pouca variação ao terceiro dia de fermentação, mesmo para os ensaios em laboratório. Por fim, o decréscimo na concentração desses álcoois durante os ciclos de aproveitamento de biomassa podem estar relacionado à concentração inicial de substratos presentes no mosto cervejeiro de cada ciclo, temperatura de fermentação de cada ciclo e concentração do inóculo

mais o “trub” que aumentam a cada ciclo devido ao metabolismo oxidativo que ocorre no início da fermentação pela presença do oxigênio do mosto de cerveja e no tanque de fermentação. Além disso, o período de estocagem é um momento em que as células permanecem em estresse devido a falta de nutrientes, competição com possíveis micro-organismos contaminantes no recipiente de armazenamento e pelo contato com etanol, metabólitos secundários e o “Trub”, onde provavelmente muitas dessas leveduras perdem a sua viabilidade celular.

Outros compostos analisados foram o álcool feniletílico (2FE) e o seu éster correspondente, o acetato de feniletila (2FEA). O álcool feniletílico ou feniletanol é formado a partir do catabolismo da fenilalanina e confere aroma floral às bebidas, como os aromas das rosas (ESPINOSA VIDAL, 2012) e de jasmim (PARENTE, 2013). Já o éster correspondente a esse álcool confere aroma floral, podendo também conferir aroma de mel (PARENTE, 2013) e de frutas (STEWART, 2017). As concentrações desse álcool estão abaixo do limiar organoléptico relatado por Stewart (2017) para todos os ensaios realizados em laboratório e próximos aos valores de concentração obtidos em ambiente industrial. Além disso, é notável que houve formação de acetato de feniletila apenas nas fermentações industriais e no primeiro ciclo de fermentação da linhagem JP1, onde as concentrações do álcool feniletílico apresentaram concentrações superiores a 100 mg.L^{-1} .

Para os analitos quantificados até este ponto, com exceção do álcool isoamílico em ambiente industrial, o encerramento da fermentação ao final do seu dia (24 h) parece ser uma proposta que reduza o custo e o tempo de manutenção das condições do processamento da cerveja na microcervejaria. Em outras palavras, a redução do período de fermentação poderá favorecer a redução de custos elétricos para manter a refrigeração do sistema e menor tempo de utilização de tanques de fermentação, promovendo maior capacidade quantitativa de produção à microcervejaria.

As concentrações de acetato de etila (AE) deste trabalho estão acima do que foi relatado por Stewart (2017) para cervejas *Lager* e *Ale* em sua generalidade e em todos os ensaios realizados. Além disso, as concentrações também se mostraram superiores às concentrações mencionadas por Piddocke (2009), com exceção da linhagem JP1 que apresentou concentrações iguais ou inferiores. Porém, Stewart (2017) também relata as concentrações deste éster para apenas cervejas da família

A/e, como a cerveja de trigo estilo Weizen. As concentrações mencionadas pelo autor para diferentes linhagens de leveduras em um mosto de cerveja foram 20 mg.L⁻¹, 36,2 mg.L⁻¹ e 25,6 mg.L⁻¹ para um processo fermentativo a 20 °C. Mesmo para esses valores, as concentrações de acetato de etila encontradas no presente trabalho foram superiores. A alta concentração deste éster pode não ser desejável devido ao seu aroma de solvente e, mesmo ao terceiro dia de fermentação, as concentrações permanecem semelhantes.

Para as demais substâncias mencionadas em Material e Métodos e que foram analisadas, não foram mencionadas nessa sessão, porque não foram detectadas na solução. Dentre essas substâncias está o acetato de isoamila, que é característico de cervejas estilo Weizen. Esse éster é formado pela condensação do acetil-CoA com o álcool isoamílico pela ação da enzima álcool acetil transferase, mas também é hidrolisado pelas esterases (FUJII et al., 1996; ESPINOSA VIDAL et al., 2012) e conferem um aroma de banana à bebida. O limiar organoléptico desse composto relatado por Stewart (2017) é de 1,2 mg.L⁻¹ e mencionado por Pidocke (2009) como sendo 1,4 mg.L⁻¹. Stewart (2017) também relatou as concentrações deste éster para apenas cervejas da família *A/e*. As concentrações mencionadas para diferentes linhagens de leveduras em um mosto de cerveja foram 0,6 mg.L⁻¹, 0,8 mg.L⁻¹ e 3,5 mg.L⁻¹ para um processo fermentativo a 20 °C. Sendo assim, para essa escala de concentração, não foi possível realizar a detecção desse éster no presente trabalho. Além disso, a hipótese de que este éster também possa ter evaporado durante o armazenamento e manuseio das amostras para os métodos analíticos é descartada, visto que o acetato de isoamila é menos volátil do que outros compostos que foram detectados e quantificados (**Anexo D**).

Por fim, a partir da análise dos compostos aromáticos ativos (CAA) é possível observar que ocorre a tendência de sua diminuição à medida que os ciclos de aproveitamento de biomassa progridem. Além disso, é possível perceber que apenas os ciclos industriais superam os CAA referentes aos limiares de concentração relatados por Stewart (2017). No entanto, entre os ensaios realizados em laboratório, a linhagem WB-06 foi a que apresentou quantitativamente o melhor cenário para esses compostos e pouco decréscimo dos CAA durante os ciclos. Sendo assim, é necessário aguardar os resultados dos compostos organolépticos

referentes aos ensaios de ajustes da linhagem WB-06 para verificar as concentrações obtidas dos CAA.

6 CONCLUSÕES

- A linhagem de levedura WB-06 foi a que apresentou melhor perfil quantitativo de CAA e maior produção de álcool isoamílico em ambiente industrial e nos ensaios realizados em laboratório;
- Apesar de não ter sido possível detectar e quantificar o acetato de isoamila, a alta concentração do álcool precursor desse éster sugere que a sua produção pode estar sendo realizada;
- A linhagem de levedura WB-06 foi a única capaz de produzir acetato de feniletina (2FEA), exceto pela produção por JP1 em seu primeiro ciclo de fermentação. Entretanto, WB-06 não produziu esse éster nos ensaios em laboratório;
- Os perfis metabólicos e organolépticos obtidos para os analitos investigados sugerem que o período de fermentação pode ser reduzido para três dias (> 50% em um total de sete dias de fermentação) sem grandes variações de concentração na produção da maioria desses compostos. Isto deve diminuir o estresse celular durante os ciclos e, conseqüentemente, aumentar a produtividade industrial;
- O álcool isobutílico ou isobutanol apresentou concentrações abaixo do limiar organoléptico mencionado na literatura para cervejas, em geral, durante os ciclos de fermentação;
- O acetato de etila apresentou concentrações elevadas em todos os ciclos de fermentação, indicando que a cerveja produzida pode conter aroma de solvente;
- A análise organoléptica das amostras do experimento de ajustes se faz necessária para auxiliar na comparação entre as linhagens de leveduras estudadas.

REFERÊNCIAS

- AQUARONE, Eugênio et al (Org.). *Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Blucher, 2001. 523 p. 4 v.
- BAMFORTH, Charles. In: GRIZOTTO, Pamela Aparecida. **Perfil sensorial do aroma de lúpulos (*Humulus lupulus*) brasileiros**. 2017. 67 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Química, Departamento de Química e Física Molecular, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM (Colorado). **2015 Style Guidelines: beer style guidelines**. 2015. Disponível em: <https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2018.
- BEHRE, Karl-ernst. The history of beer additives in Europe — A review. **Vegetation History And Archaeobotany**, [s.l.], v. 8, n. 1-2, p.35-48, jun. 1999. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02042841>.
- BIDAN, P. Relation entre la teneur des vins en alcools superieurs et la teneur des mouts en substances azotees en particulier en acides animes. **Bulletin de L'oiv**, v. 48, 1975.
- BISSON, L.F. 1991. In: VIDAL, Esteban Espinosa. **Influência da Fonte de Nitrogênio no Perfil Fermentativo, Transcriptômico, e na Produção de Álcoois Superiores em *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 87 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.
- BOULTON, Chris; QUAIN, David. **Brewing Yeast and Fermentation**. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001.
- BRASIL. Decreto n. 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm>. Acesso em : 15 dez. 2018.
- BRIGGS, Dennis E. et al. **Brewing: Science and practice**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004. 963 p.
- CALLAWAY, Ewen. **The beer geeks**. 2016. Disponível em: <[https://www.nature.com/polopoly_fs/1.20336!/menu/main/topColumns/topLeftColumn/pdf/535484a%20\(corrected\).pdf](https://www.nature.com/polopoly_fs/1.20336!/menu/main/topColumns/topLeftColumn/pdf/535484a%20(corrected).pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2019.
- CARRAU, Francisco M. et al. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. **Fems Yeast Research**, [s.l.], v. 8, n. 7, p.1196-1207, nov. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x>.

CEREDA, Marney Pascoli. Cervejas. 1985. In: VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni (Org.). **Bebidas Alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. 461 p. 1 v.

CERVBRASIL, 2019. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (Ed.). **Setor Cervejeiro: Dados do setor**. 2018. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/>. Acesso em: 09 dez. 2018.

COOPER, Terrance G.. Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cold Spring Harbor Monograph Archive**, Pittsburgh, v. 11, n. 0, p.39-99,1982.

ESPINOSA VIDAL, Esteban. **Influência da Fonte de Nitrogênio no Perfil Fermentativo, Transcriptômico, e na Produção de Álcoois Superiores em *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 87 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

ESPINOSA VIDAL, Esteban et al. Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, n. 1, p.701-708, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.147>

ESPINOSA VIDAL, Esteban et al. Biosynthesis of higher alcohol flavour compounds by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: impact of oxygen availability and responses to glucose pulse in minimal growth medium with leucine as sole nitrogen source.. **Yeast**, [s.l.], out. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3045>.

FUJII, Toshio et al. Effect of Aeration and Unsaturated Fatty Acids on Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Alcohol Acetyltransferase Gene. **Applied And Environmental Microbiology**, Japan, v. 63, n. 3, p.910-915, mar. 1997.

GJERTSEN, P.. Carbohydrate Composition of Wort and Beer. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s.l.], v. 59, n. 4, p.296-306, 8 jul. 1953. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.1953.tb02720.x>.

HAZELWOOD, L. A. et al. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 74, n. 8, p.2259-2266, 15 fev. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02625-07>.

HE, Yang et al. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer - a review. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s.l.], v. 120, n. 3, p.157-163, jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jib.145>.

HOUGH, James Shanks. **The biotechnology of malting and brewing**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. 159 p.

KURTZMAN, Cletus P. et al. **The Yeast: a taxonomic study**. 5. ed. London: Elsevier, 2011. 539 p.

LAMBRECHTS, M.g.; PRETORIUS, I.s.. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. **South African Journal Of Enology And Viticulture**, South Africa, v. 21, p.97-129, 2000.

LIE, S. The ebc-ninhydrin Method for Determination of Free Alpha Amino Nitrogen. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s.l.], v. 79, n. 1, p.37-41, 2 jan. 1973. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x>.

MACWILLIAM, I. C.. Wort Composition - A Review. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s.l.], v. 74, n. 1, p.38-54, 2 jan. 1968. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.1968.tb03095.x>.

MAGASANIK, Boris. Regulation of Nitrogen Utilization. **Cold Spring Harbor Monograph Archive**. v. 2, p.283-317, 1992.

MAGASANIK, Boris; A KAISER, Chris. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, [s.l.], v. 290, n. 1-2, p.1-18, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119\(02\)00558-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119(02)00558-9).

MARCENA, Adriano. **A Saideira**: Breve história cultural da cerveja da cerveja em Pernambuco. Recife: Funcultura/trempe Produções, 2016.

MORADO, Ronaldo. **Larousse da Cerveja**. São Paulo: Lafonte, 2009. 357 p.

MORADO, Ronaldo. **Larousse da Cerveja**: A história e curiosidades de uma das bebidas mais populares do mundo. São Paulo: Alaúde Editorial, 2017. 440 p. Edição atualizada e ampliada.

MEILGAARD, Morten Christian. Flavor chemistry of beer: part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. **Mbaa Technical Quarterly**, v. 12, p.151-168, 1975.

MEILGAARD, Morten. Effects on Flavour of Innovations in Brewery Equipment and Processing: A Review. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s.l.], v. 107, n. 5, p.271-286, 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.2001.tb00098.x>.

MENDES-FERREIRA, A.; MENDES-FAIA, A.; LEO, C. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 97, n. 3, p.540-545, set. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x>.

MEUSSDOERFFER, Franz G. A Comprehensive History of Beer Brewing. **Handbook Of Brewing**, [s.l.], p.1-42, 6 ago. 2009. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://dx.doi.org/10.1002/9783527623488.ch1>.

MOIR, Michael. Hops - A Millennium Review. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [s.l.], v. 58, n. 4, p.131-146, set. 2000. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1094/asbcj-58-0131>.

NYKÄNEN, Lalli; NYKÄNEN, Irma. Production of Esters by Different Yeast Strains in Sugar Fermentations. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s.l.], v. 83, n. 1, p.30-31, 2 jan. 1977. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.1975.tb03787.x>.

PALMER, A. K.; RENNIE, H. Ester Control in High Gravity Brewing. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s.l.], v. 80, n. 5, p.447-454, 10 set. 1974. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.1974.tb06794.x>.

PARENTE, Denise Castro et al. On the catabolism of amino acids in the yeast *Dekkera bruxellensis* and the implications for industrial fermentation processes. **Yeast**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.299-309, 29 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3290>.

PARKER, W. E.; RICHARDSON, P. J. The Quantitative Determination of Glycerol in Beer by Gas-liquid Chromatography. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s.l.], v. 76, n. 2, p.191-198, 4 mar. 1970. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.1970.tb03282.x>.

PEREIRA, Alexandre Fontes. **Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho**. 2007. 99 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

PIRES, Eduardo J. et al. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 98, n. 5, p.1937-1949, 3 jan. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>.

PISARNITSKII, A. F. Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components (Review). **Applied Biochemistry And Microbiology**, [s.l.], v. 37, n. 6, p.552-560, 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1012390731145>.

POELMANS, Eline; SWINNEN, Johan F. M. A Brief Economic History of Beer. **The Economics Of Beer**, [s.l.], p.3-28, 1 out. 2011. Oxford University Press. <http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199693801.003.0001>

POTTER, Norman N; HOTCHKISS, Joseph H. **Ciencia de los alimentos**. 5. ed. Zaragoza: Editorial Acribia Sa, 1999. 667 p.

PUGH, Tom A. et al. The impact of wort nitrogen limitation on yeast fermentation performance and diacetyl. **Technical Quarterly: Master Brewers Association of the Americas**, ., v. 34, n. 0, p.185-189, 1997.

REIS, Viviane Castelo Branco et al. Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 39, n. 11, p.1673-1683, 15 ago. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-012-1170-5>.

SCANES, K.t.; HOHRNANN, S.; PRIOR, B.a.. Glycerol Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its Relevance to Wine: A Review. **South African Journal Of Enology & Viticulture**, [s.l.], v. 19, n. 1, 1998. Stellenbosch University. <http://dx.doi.org/10.21548/19-1-2239>.

SILVA FILHO, Eurípedes Alves da et al. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 32, n. 10, p.481-486, 21 set. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-005-0027-6>.

SILVA, Denise Castro. **Análise do Perfil Metabólico e Organoléptico da Levedura *Dekkera bruxellensis* Visando à Elaboração de Cachaças Diferenciadas**. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013. Disponível em:

<<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/13305/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Denise%20Silva.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

SMART, Katherine et al (Org.). **Brewing Yeast Fermentation Performance**. 2 ed. Oxford: Blackwell Science, 2003. 308 p.

STEWART, Graham. The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentations. **Fermentation**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.63-91, 27 nov. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation3040063>.

VANDIJKEN, J; SCHEFFERS, W. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 32, n. 3-4, p.199-224, abr. 1986. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097\(86\)90291-0](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097(86)90291-0).

VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni et al (Org.). **Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. 550 p.

VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni (Org.). **Bebidas Alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. 461 p. 1 v.

VILA NOVA, Meiriana Xavier et al. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.460-466, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.005>.

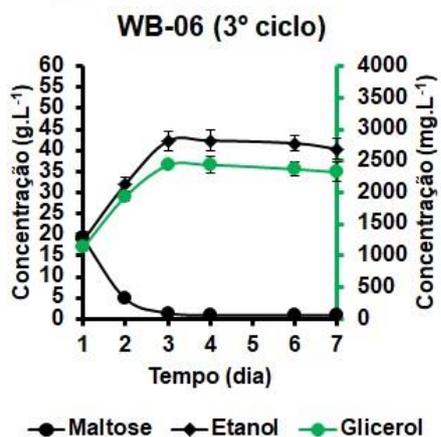
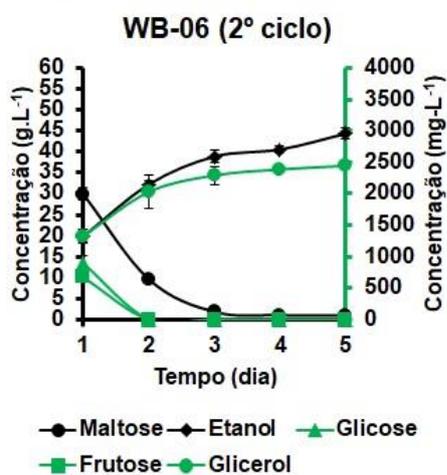
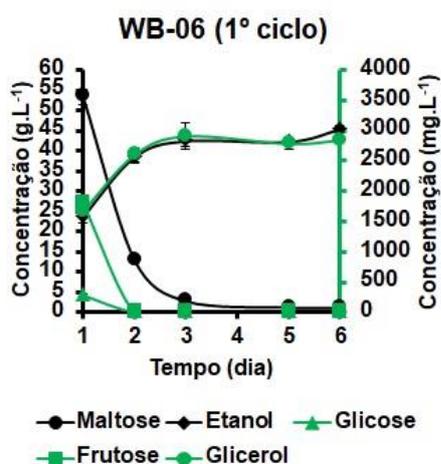
VERSTREPEN, Kevin J. et al. Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 96, n. 2, p.110-118, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723\(03\)90112-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723(03)90112-5).

WHEALS, A. Fuel ethanol after 25 years. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 17, n. 12, p.482-487, 1 dez. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7799\(99\)01384-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7799(99)01384-0).

WHITE, Chris; ZAINASHEFF, Jamil. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Colorado: Brewers Publications, 2010. 304 p.

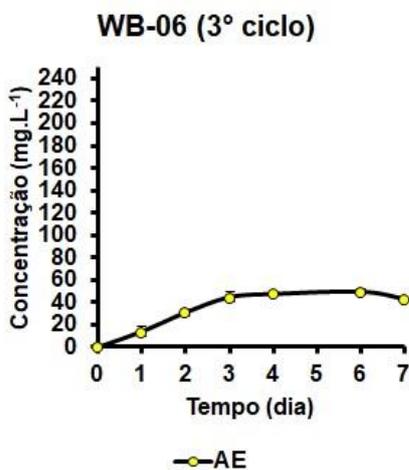
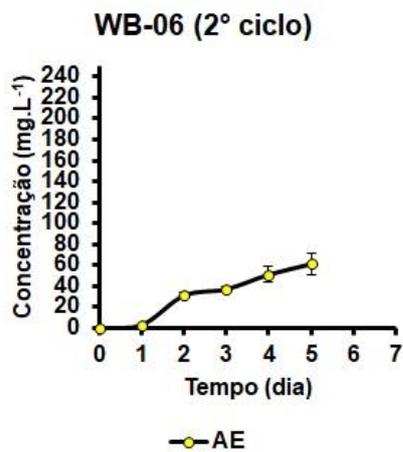
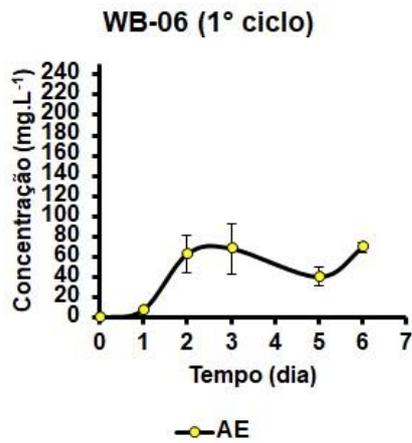
APÊNDICE A – GRÁFICOS DA CLAE (WB-06 INDUSTRIAL)

Perfil metabólico da linhagem de levedura WB-06 na microcervejaria, mostrando o consumo das fontes de carbono e produção de etanol e glicerol.



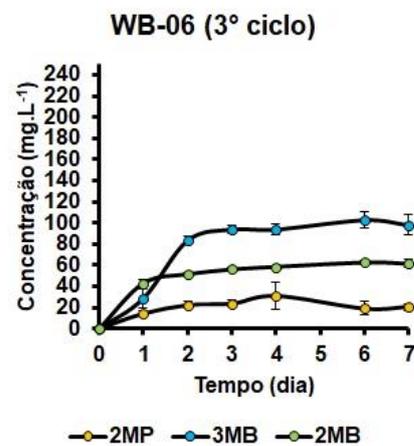
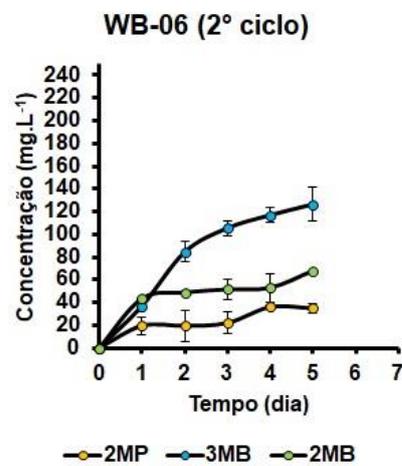
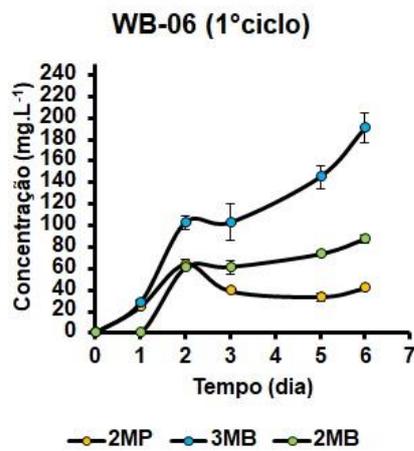
APÊNDICE B – GRÁFICOS DA CG (WB-06 INDUSTRIAL)

Perfil organoléptico (AE) da linhagem de levedura WB-06 na microcervejaria (continua na página seguinte).



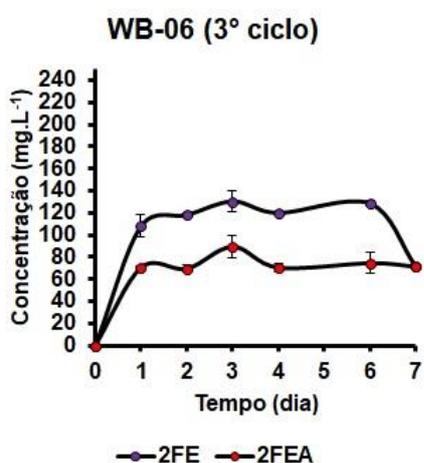
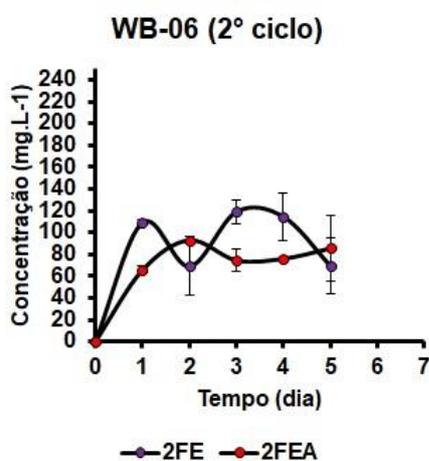
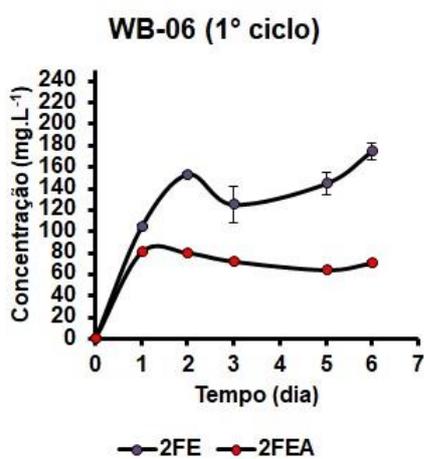
APÊNDICE B – GRÁFICOS DA CG (WB-06 INDUSTRIAL)

Perfil organoléptico (2MP, 3MB e 2MB) da linhagem de levedura WB-06 na microcervejaria (continua na página seguinte).



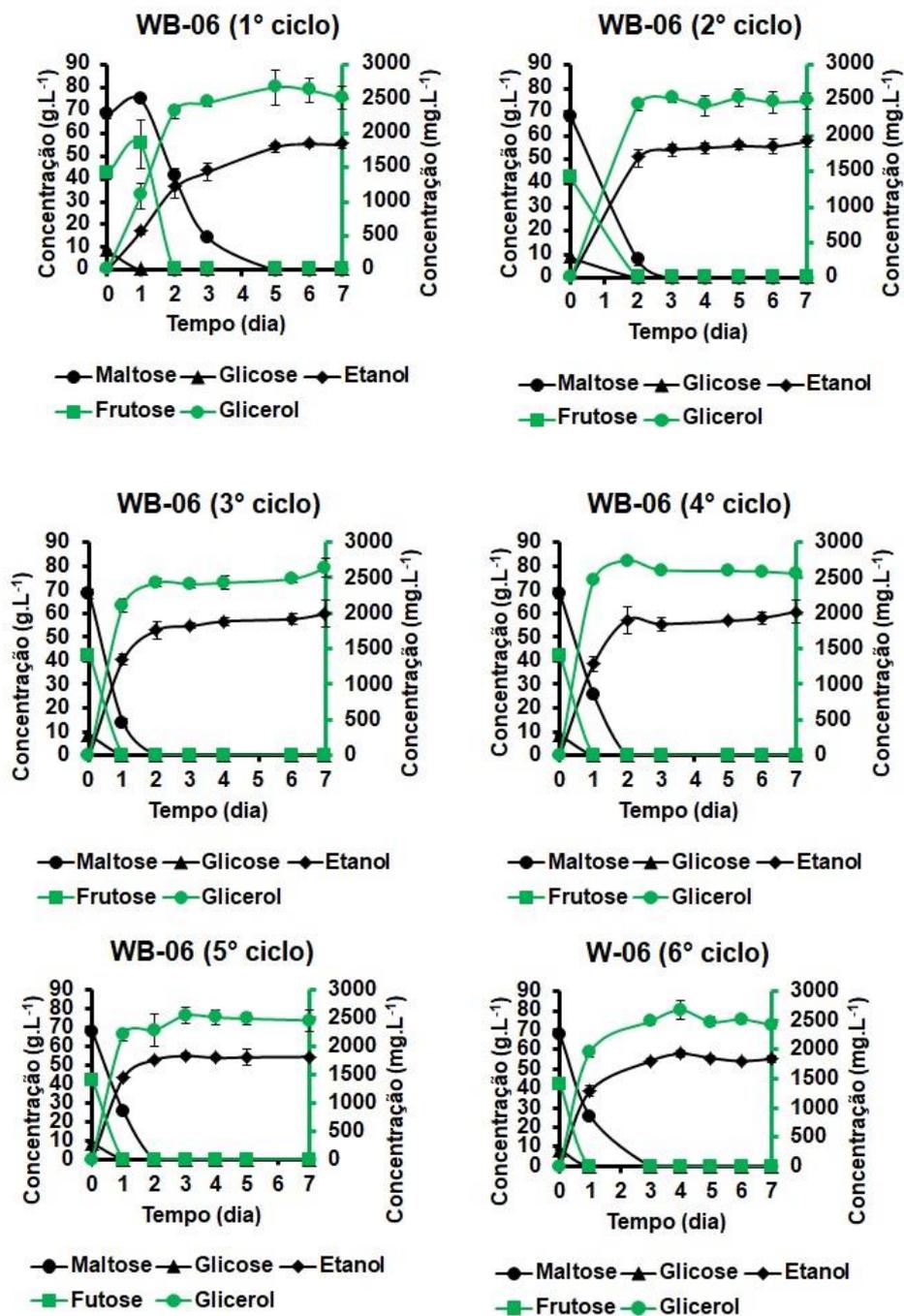
APÊNDICE B – GRÁFICOS DA CG (WB-06 INDUSTRIAL)

Perfil organoléptico (2FE e 2FEA) da linhagem de levedura WB-06 na microcervejaria.



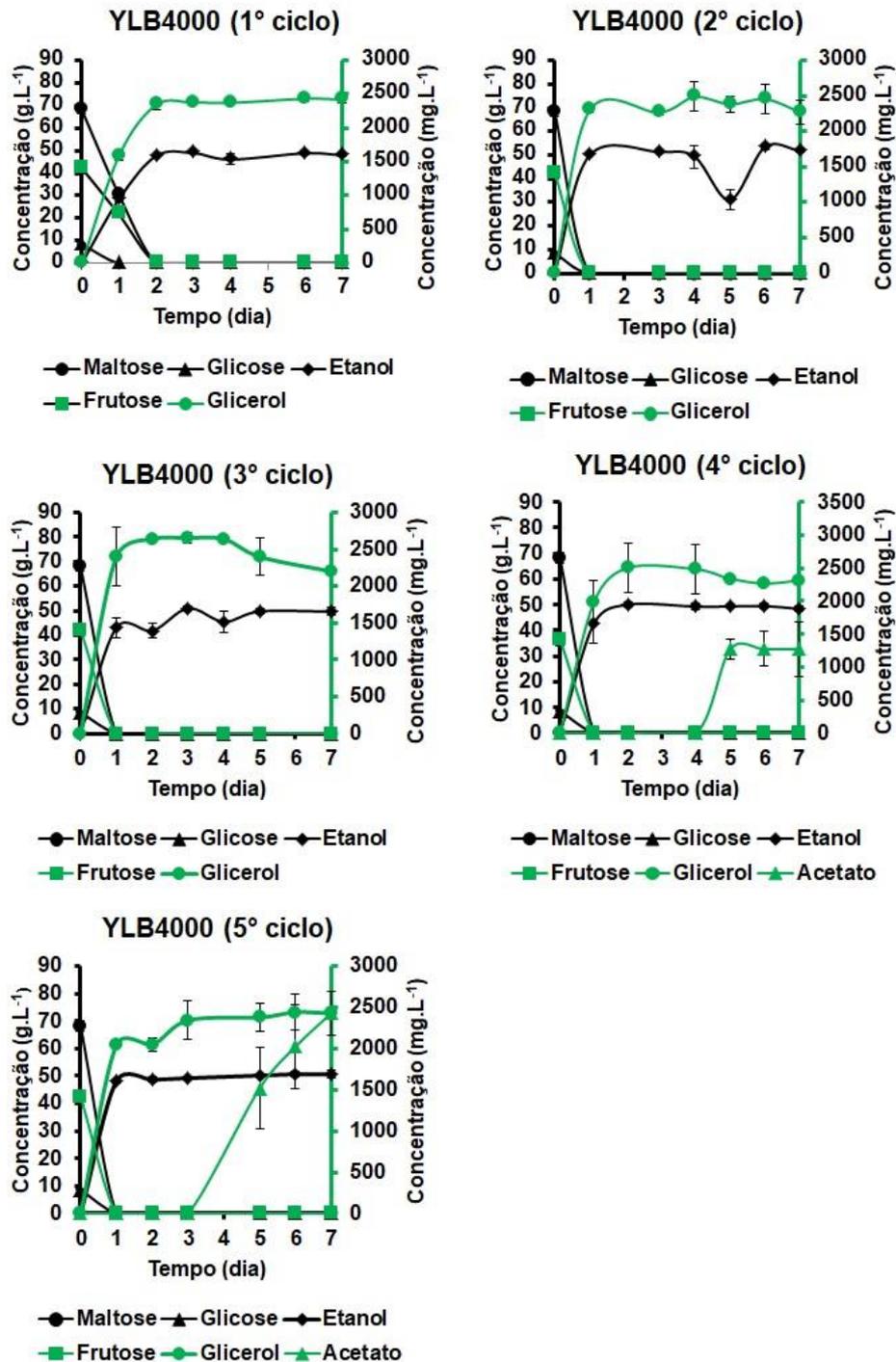
APÊNDICE C – GRÁFICOS DA CLAE (LABORATÓRIO)

Perfil metabólico da linhagem de levedura WB-06 no laboratório, mostrando o consumo das fontes de carbono e produção de etanol e glicerol (continua na página seguinte).



APÊNDICE C – GRÁFICOS DA CLAE (LABORATÓRIO)

Perfil metabólico da linhagem de levedura YLB4000 no laboratório, mostrando o consumo das fontes de carbono e produção de etanol e glicerol.



APÊNDICE D – PERFIL ORGANOLÉPTICO (WB-06 LABORATÓRIO)

Concentração das substâncias organolépticas durante os ciclos de aproveitamento de biomassa para a linhagem de levedura WB-06. Em vermelho os valores de concentração referentes ao terceiro dia de fermentação (continua nas páginas seguintes).

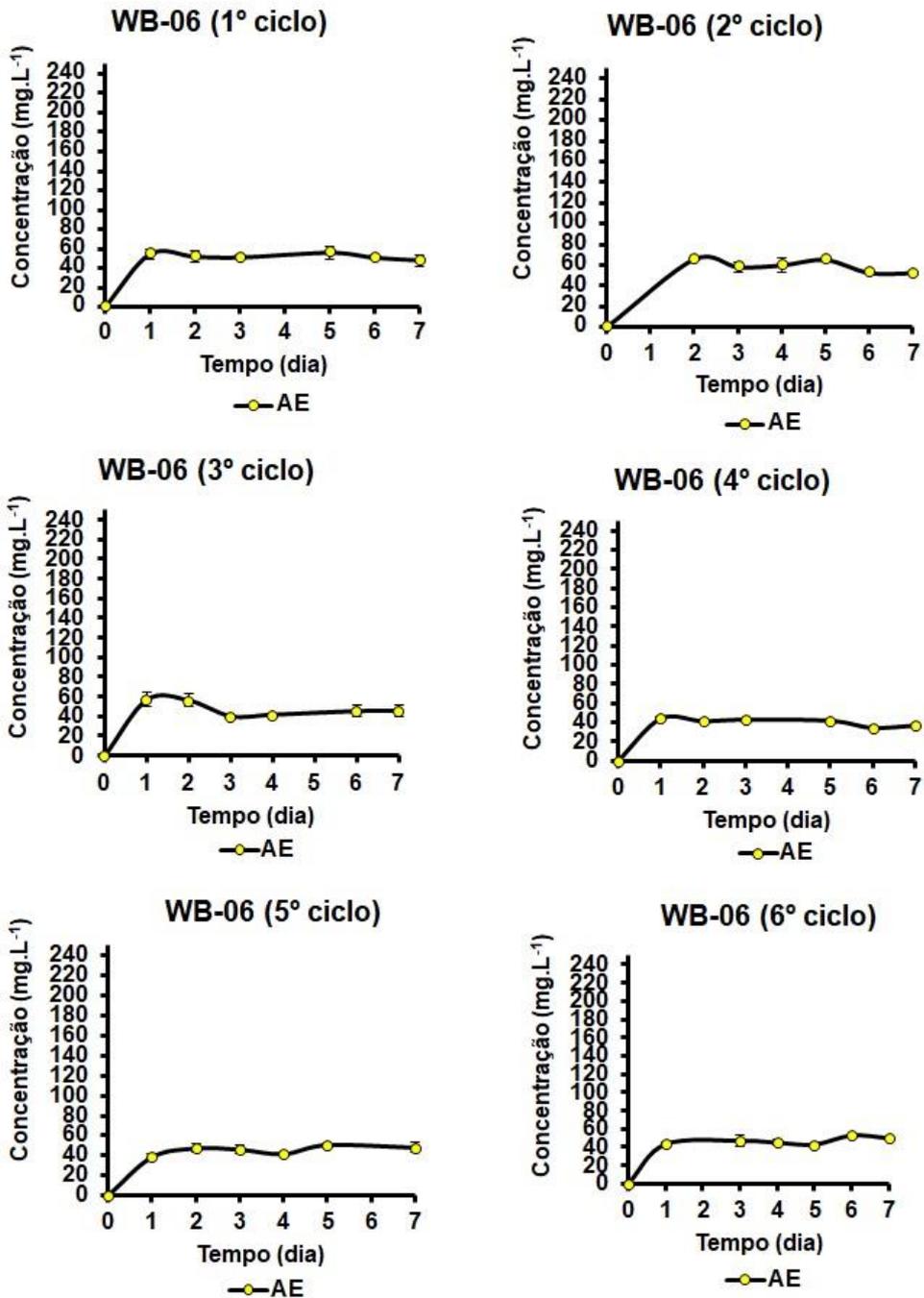
Dia	Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	AE (mg.L ⁻¹)	2MP (mg.L ⁻¹)	3MB (mg.L ⁻¹)	2MB (mg.L ⁻¹)	2FE (mg.L ⁻¹)
1° ciclo						
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	76,53	54,56 ± 5,27	70,92 ± 6,74	45,63 ± 7,95	0,00 ± 0,00	05,71 ± 0,00
2	40,77	51,87 ± 6,25	78,12 ± 11,00	77,75 ± 18,28	0,00 ± 0,00	23,50 ± 5,92
3	14,05	51,15 ± 2,37	80,92 ± 6,56	98,66 ± 13,79	1,03 ± 0,00	36,51 ± 8,13
4	-	-	-	-	-	-
5	0,00	55,92 ± 7,05	89,52 ± 10,42	145,05 ± 22,66	5,18 ± 0,00	56,89 ± 16,61
6	0,00	50,79 ± 2,13	88,15 ± 6,65	125,15 ± 6,57	5,61 ± 0,00	40,87 ± 2,04
7	0,00	48,12 ± 5,83	79,66 ± 12,58	113,93 ± 19,73	5,45 ± 0,00	32,38 ± 9,29
2° ciclo						
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	-	-	-	-	-	-
2	7,52	65,60 ± 0,90	112,45 ± 2,44	125,30 ± 3,02	2,99 ± 0,60	46,74 ± 5,47
3	0,00	58,19 ± 4,45	102,31 ± 8,34	140,94 ± 25,24	4,05 ± 1,19	40,75 ± 2,04
4	0,00	59,74 ± 7,07	110,35 ± 6,27	126,10 ± 4,84	4,74 ± 0,77	40,38 ± 1,98
5	0,00	65,13 ± 0,65	119,92 ± 2,72	160,75 ± 1,86	13,85 ± 0,39	59,21 ± 3,67
6	0,00	52,49 ± 1,25	106,45 ± 2,50	168,24 ± 13,32	15,90 ± 3,22	66,63 ± 9,57
7	0,00	52,22 ± 0,54	096,02 ± 1,76	116,48 ± 4,33	3,10 ± 0,31	36,22 ± 2,22
3° ciclo						
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	13,76	56,93 ± 7,10	83,55 ± 2,38	93,69 ± 16,70	2,02 ± 0,00	29,78 ± 5,94
2	0,00	55,88 ± 6,88	87,88 ± 8,39	114,31 ± 19,67	6,82 ± 0,00	44,86 ± 0,00
3	0,00	39,93 ± 0,54	42,64 ± 3,46	114,04 ± 10,99	6,67 ± 0,57	41,61 ± 2,19
4	0,00	41,55 ± 0,72	45,33 ± 3,04	119,29 ± 10,84	6,86 ± 2,78	38,00 ± 2,50
5	-	-	-	-	-	-
6	0,00	45,20 ± 5,27	47,20 ± 2,85	120,19 ± 8,34	7,41 ± 2,68	41,93 ± 5,04
7	0,00	45,67 ± 5,55	48,61 ± 3,22	111,84 ± 18,42	7,99 ± 0,00	44,92 ± 0,00

				4° ciclo		
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	25,70	43,95 ± 2,51	32,87 ± 3,77	59,39 ± 6,37	0,00 ± 0,00	14,04 ± 4,17
2	0,00	41,41 ± 0,31	37,10 ± 0,49	81,35 ± 1,03	9,06 ± 0,00	20,33 ± 0,30
3	0,00	42,92 ± 0,48	45,37 ± 1,89	108,12 ± 6,91	5,41 ± 1,46	38,72 ± 3,92
4	-	-	-	-	-	-
5	0,00	41,78 ± 0,85	45,48 ± 1,89	101,03 ± 6,56	3,90 ± 2,93	35,19 ± 4,58
6	0,00	34,44 ± 1,86	35,36 ± 0,86	77,25 ± 3,50	7,17 ± 0,00	22,75 ± 0,84
7	0,00	36,79 ± 0,76	36,44 ± 1,34	83,50 ± 6,06	0,74 ± 0,00	25,74 ± 1,39
				5° ciclo		
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	25,55	38,57 ± 3,49	26,28 ± 2,69	56,77 ± 6,42	0,00 ± 0,00	11,67 ± 6,19
2	0,00	47,29 ± 4,27	44,75 ± 3,02	101,19 ± 5,44	3,66 ± 0,56	42,36 ± 2,13
3	0,00	46,09 ± 4,13	41,86 ± 0,60	92,69 ± 5,81	2,13 ± 0,72	33,60 ± 3,70
4	0,00	41,65 ± 0,43	39,65 ± 0,30	91,12 ± 5,07	5,21 ± 2,60	33,09 ± 2,14
5	0,00	50,65 ± 1,40	49,60 ± 1,81	108,13 ± 1,62	7,85 ± 0,03	47,61 ± 3,22
6	-	-	-	-	-	-
7	0,00	48,17 ± 5,36	54,25 ± 9,77	123,97 ± 9,96	12,33 ± 1,99	46,07 ± 9,92
				6° ciclo		
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	25,88	43,25 ± 2,06	45,82 ± 5,32	98,99 ± 3,96	1,22 ± 0,44	34,23 ± 3,30
2	-	-	-	-	-	-
3	0,00	47,02 ± 5,85	49,99 ± 4,07	121,90 ± 10,46	8,64 ± 1,53	46,90 ± 2,76
4	0,00	44,93 ± 2,94	48,54 ± 0,72	120,05 ± 9,58	13,40 ± 2,75	56,70 ± 5,54
5	0,00	42,84 ± 0,04	48,95 ± 3,72	118,21 ± 18,62	15,34 ± 0,00	60,62 ± 0,00
6	0,00	52,78 ± 0,15	65,75 ± 1,70	142,26 ± 6,49	17,04 ± 1,74	60,70 ± 4,14
7	0,00	49,96 ± 0,97	57,05 ± 0,97	121,07 ± 2,80	10,92 ± 1,22	49,88 ± 5,55

(-): Amostra não coletada; (IND): industrial e (LAB): Laboratório.

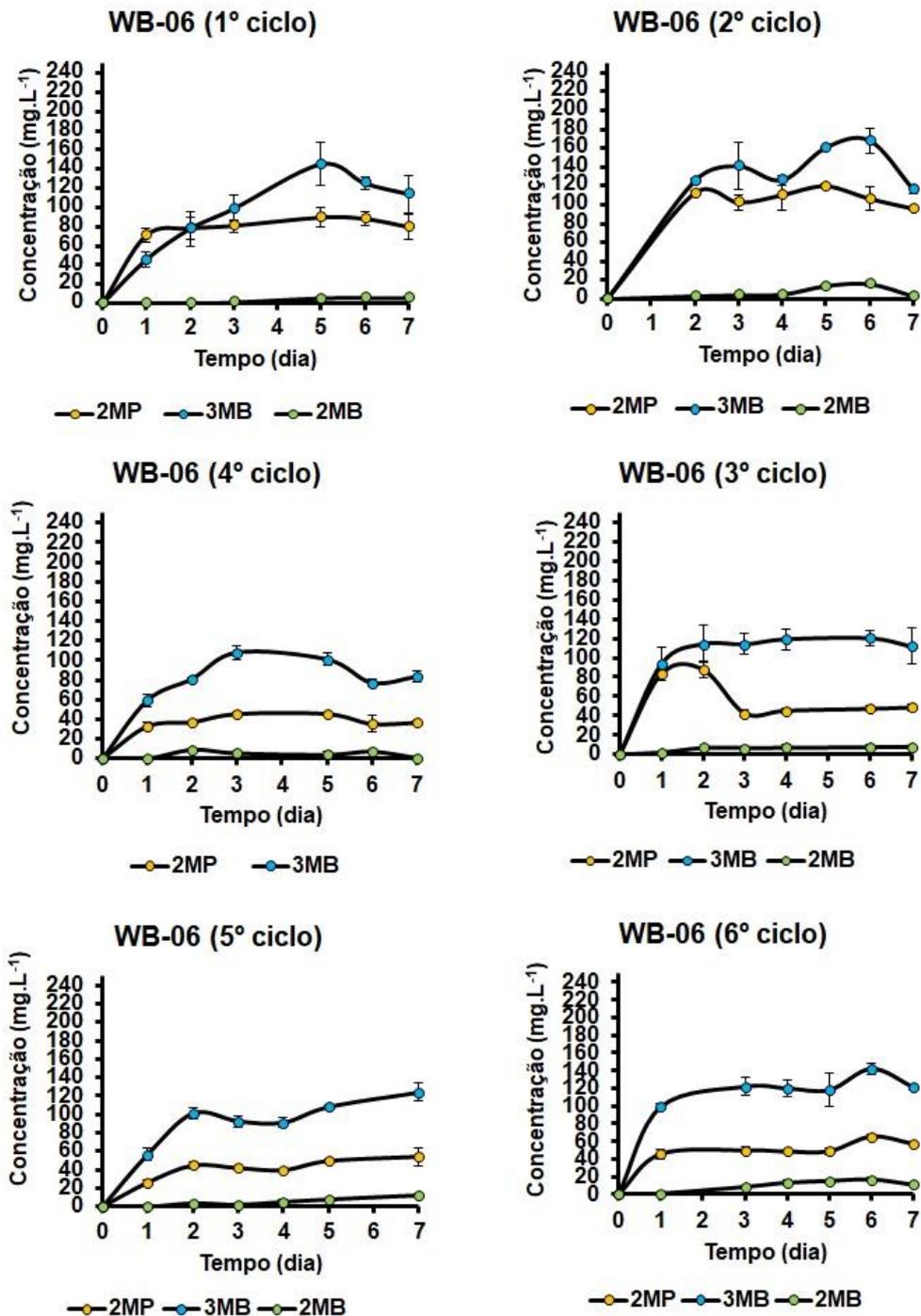
APÊNDICE D – PERFIL ORGANOLÉPTICO (WB-06 LABORATÓRIO)

Perfil organoléptico (AE) da linhagem de levedura WB-06 no laboratório (continua na página seguinte).



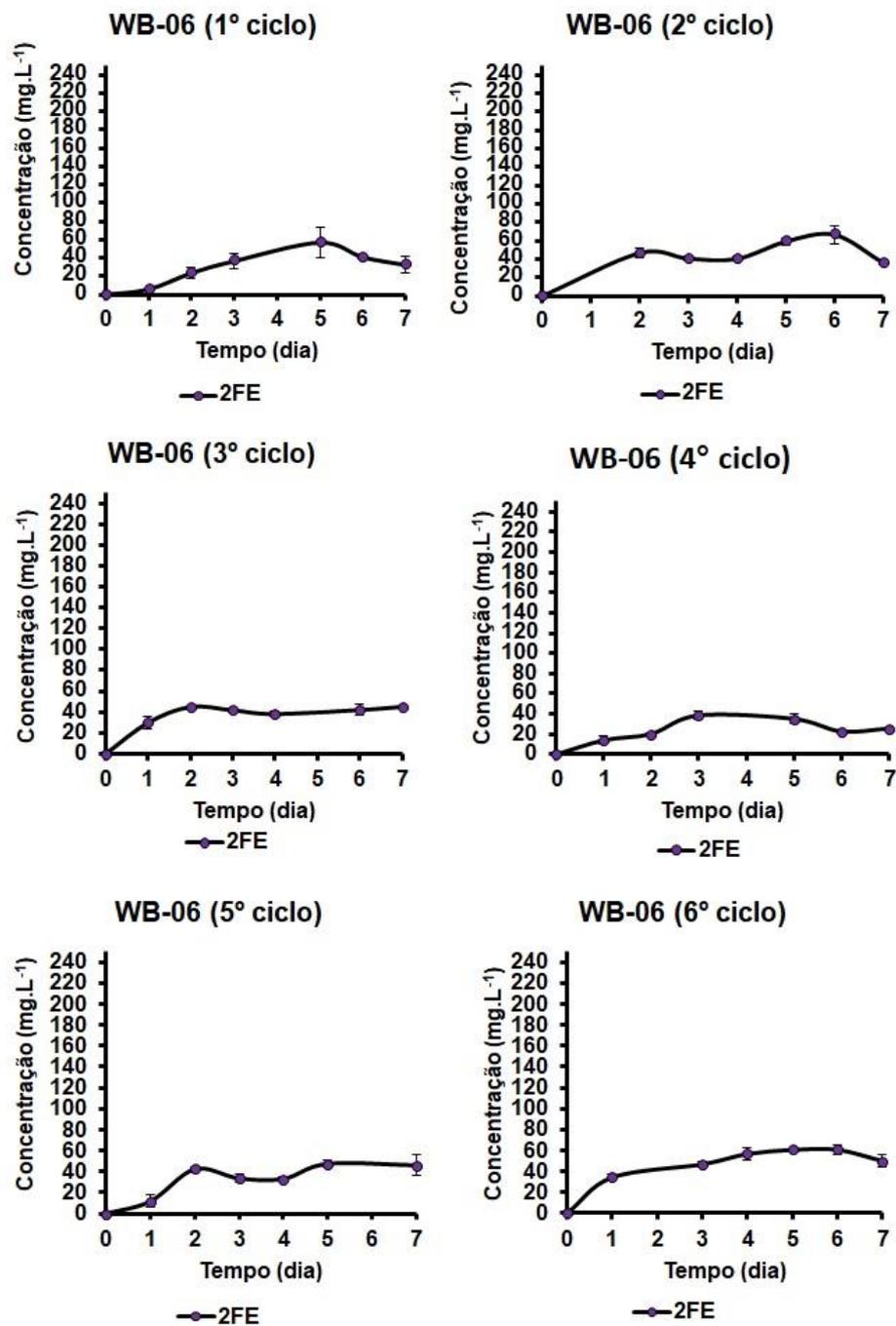
APÊNDICE D – PERFIL ORGANOLÉPTICO (WB-06 LABORATÓRIO)

Perfil organoléptico (2MP, 3MB e 2MB) da linhagem de levedura WB-06 no laboratório (continua na página seguinte).



APÊNDICE D – PERFIL ORGANOLÉPTICO (WB-06 LABORATÓRIO)

Perfil organoléptico (2FE e 2FEA) da linhagem de levedura WB-06 no laboratório.



APÊNDICE E – PERFIL ORGANOLÉPTICO (JP1 LABORATÓRIO)

Concentração das substâncias organolépticas durante os ciclos de aproveitamento de biomassa para a linhagem de levedura JP1. Em vermelho os valores de concentração referentes ao terceiro dia de fermentação (continua nas páginas seguintes).

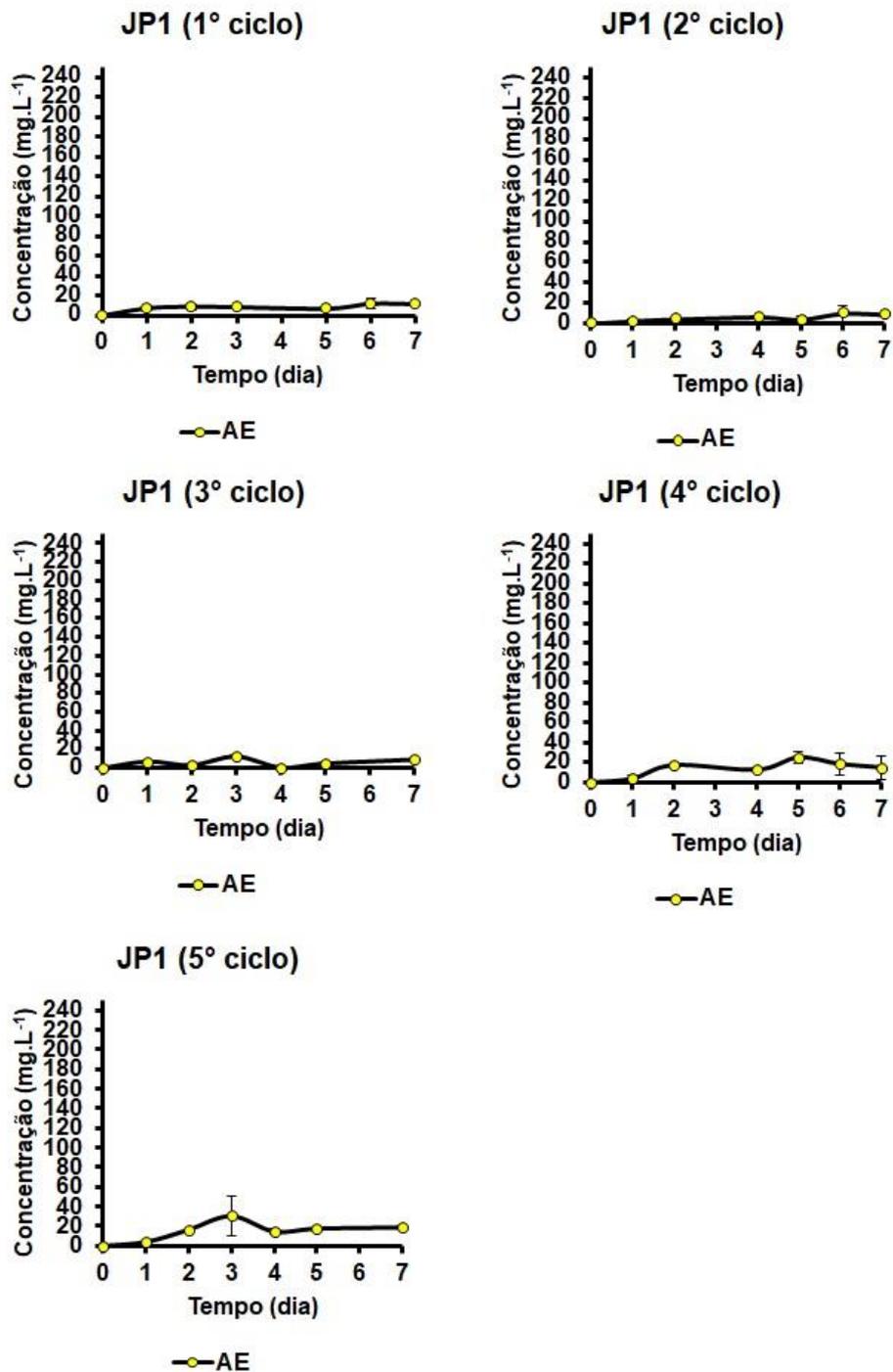
Dia	Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	AE (mg.L ⁻¹)	2MP (mg.L ⁻¹)	3MB (mg.L ⁻¹)	2MB (mg.L ⁻¹)	2FE (mg.L ⁻¹)	2FEA (mg.L ⁻¹)
1º ciclo							
0	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	29,11	7,50 ± 20,12	14,50 ± 0,71	18,50 ± 3,54	0,00 ± 0,00	74,00 ± 7,07	0,00 ± 0,00
2	0,00	9,00 ± 20,83	3,50 ± 2,12	55,67 ± 8,50	47,00 ± 2,83	98,00 ± 7,07	0,00 ± 0,00
3	0,00	8,50 ± 20,12	4,33 ± 2,52	63,67 ± 4,51	48,50 ± 0,71	114,50 ± 2,12	73,50 ± 0,71
4	-	-	-	-	-	-	-
5	0,00	7,00 ± 10,41	2,67 ± 1,53	52,00 ± 3,61	47,50 ± 0,71	100,00 ± 1,41	68,50 ± 0,00
6	0,00	12,00 ± 50,66	3,50 ± 0,00	101,00 ± 12,73	58,50 ± 3,54	134,50 ± 12,02	64,50 ± 0,71
7	0,00	11,50 ± 20,12	3,33 ± 2,52	65,33 ± 11,50	50,00 ± 2,83	122,50 ± 10,61	75,00 ± 2,83
2º ciclo							
0	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	2,05	2,38 ± 10,63	4,75 ± 0,68	43,91 ± 1,52	0,00 ± 0,00	5,51 ± 1,46	0,00 ± 0,00
2	0,00	4,09 ± 0,19	5,40 ± 1,07	56,12 ± 0,69	0,00 ± 0,00	20,21 ± 3,51	0,00 ± 0,00
3	0,00	6,19 ± 0,78	3,21 ± 0,64	55,80 ± 0,81	0,00 ± 0,00	21,09 ± 0,63	0,00 ± 0,00
4	-	-	-	-	-	-	-
5	0,00	3,94 ± 3,94	6,58 ± 2,33	67,18 ± 10,78	0,00 ± 0,00	25,11 ± 4,54	0,00 ± 0,00
6	0,00	14,10 ± 5,17	10,10 ± 1,63	77,27 ± 0,55	0,00 ± 0,00	42,83 ± 0,58	0,00 ± 0,00
7	0,00	8,72 ± 1,03	6,82 ± 2,14	62,31 ± 3,59	0,00 ± 0,00	26,84 ± 2,30	0,00 ± 0,00
3º ciclo							
0	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,00	7,04 ± 1,56	10,02 ± 4,04	69,39 ± 1,60	0,00 ± 0,00	22,70 ± 12,27	0,00 ± 0,00
2	0,00	3,18 ± 0,69	8,36 ± 0,81	57,85 ± 3,31	0,00 ± 0,00	24,51 ± 3,43	0,00 ± 0,00
3	0,00	12,53 ± 2,05	7,54 ± 3,40	72,92 ± 1,40	0,00 ± 0,00	35,57 ± 0,02	0,00 ± 0,00
4	0,00	0,68 ± 0,00	14,24 ± 0,07	87,68 ± 7,45	0,00 ± 0,00	55,87 ± 5,90	0,00 ± 0,00
5	0,00	4,90 ± 1,05	7,12 ± 0,08	62,21 ± 4,81	0,00 ± 0,00	29,11 ± 0,62	0,00 ± 0,00
6	-	-	-	-	-	-	-
7	0,00	9,13 ± 0,66	9,54 ± 0,60	68,54 ± 0,73	0,00 ± 0,00	33,98 ± 0,76	0,00 ± 0,00

4° ciclo							
0	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,00	3,91 ± 0,00	15,17 ± 1,49	79,11 ± 5,33	0,00 ± 0,00	32,38 ± 4,47	0,00 ± 0,00
2	0,00	17,53 ± 0,21	23,39 ± 0,70	102,13 ± 7,22	3,83 ± 2,42	56,58 ± 7,75	0,00 ± 0,00
3	-	-	-	-	-	-	-
4	0,00	12,89 ± 1,22	18,87 ± 5,05	92,34 ± 8,92	3,23 ± 0,00	49,15 ± 11,21	0,00 ± 0,00
5	0,00	25,37 ± 5,67	29,38 ± 10,07	162,79 ± 10,13	22,09 ± 3,61	120,22 ± 3,64	0,00 ± 0,00
6	0,00	18,66 ± 11,66	24,26 ± 16,54	111,57 ± 37,76	15,78 ± 0,00	66,03 ± 35,60	0,00 ± 0,00
7	0,00	15,26 ± 11,80	21,21 ± 1,85	106,71 ± 9,32	6,24 ± 2,89	65,09 ± 8,58	0,00 ± 0,00
5° ciclo							
0	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,00	3,88 ± 0,00	36,16 ± 13,28	114,79 ± 1,48	5,54 ± 0,38	69,51 ± 18,98	0,00 ± 0,00
2	0,00	16,33 ± 0,07	22,95 ± 0,75	107,13 ± 4,52	3,29 ± 1,32	55,52 ± 6,09	0,00 ± 0,00
3	0,00	30,32 ± 20,73	50,42 ± 22,69	123,38 ± 0,00	8,48 ± 0,00	60,53 ± 0,00	0,00 ± 0,00
4	0,00	14,51 ± 2,30	40,37 ± 2,44	107,29 ± 0,00	3,62 ± 0,00	59,76 ± 17,01	0,00 ± 0,00
5	0,00	17,46 ± 0,00	24,31 ± 8,84	118,68 ± 6,69	12,63 ± 0,00	65,14 ± 3,05	0,00 ± 0,00
6	-	-	-	-	-	-	-
7	0,00	18,73 ± 01,87	45,79 ± 19,89	137,54 ± 0,00	12,33 ± 1,99	79,77 ± 5,15	0,00 ± 0,00
6° ciclo							
0	40,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	0,00	-	-	-	-	-	-
3	0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
4	0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
5	0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
7	-	-	-	-	-	-	-

(-): Amostra não coletada; (IND): industrial e (LAB): Laboratório.

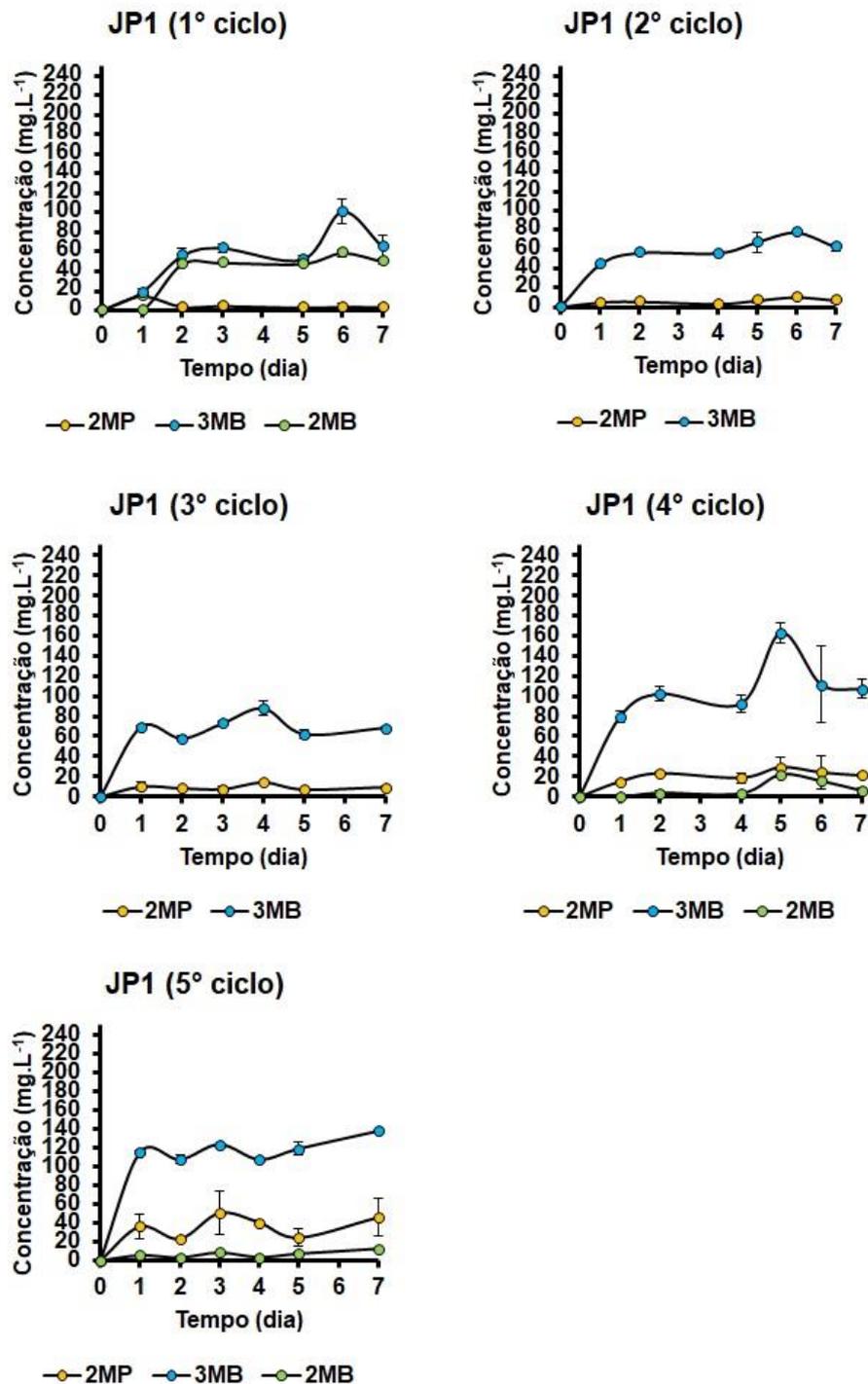
APÊNDICE E – PERFIL ORGANOLÉPTICO (JP1 LABORATÓRIO)

Perfil organoléptico (AE) da linhagem de levedura JP1 no laboratório (continua na página seguinte).



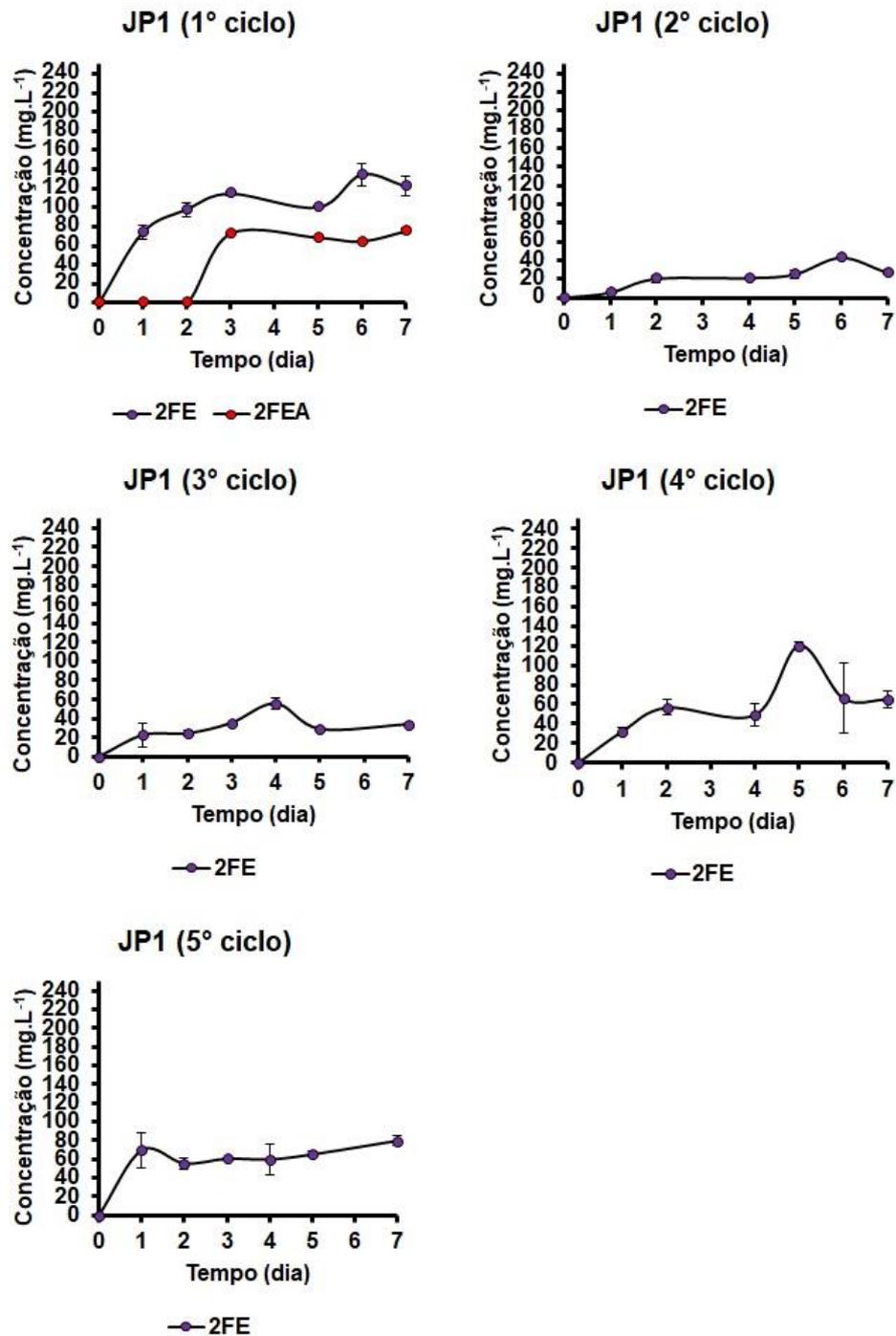
APÊNDICE E – PERFIL ORGANOLÉPTICO (JP1 LABORATÓRIO)

Perfil organoléptico (2MP, 3MB e 2MB) da linhagem de levedura JP1 no laboratório (continua na página seguinte).



APÊNDICE E – PERFIL ORGANOLÉPTICO (JP1 LABORATÓRIO)

Perfil organoléptico (2FE e 2FEA) da linhagem de levedura JP1 no laboratório.



APÊNDICE E – PERFIL ORGANOLÉPTICO (JP1 LABORATÓRIO)

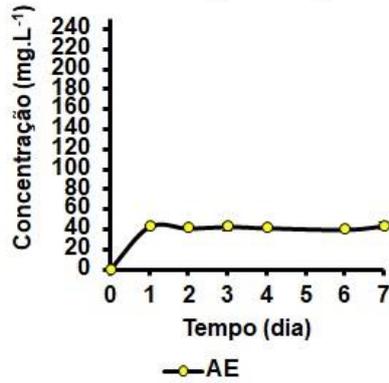
Concentração das substâncias organolépticas durante os ciclos de aproveitamento de biomassa para a linhagem de levedura JP1. Em vermelho os valores de concentração referentes ao terceiro dia de fermentação (continua na página seguinte).

Dia	Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	AE (mg.L ⁻¹)	2MP (mg.L ⁻¹)	3MB (mg.L ⁻¹)	2FE (mg.L ⁻¹)
1° ciclo					
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	31,22	42,42 ± 2,54	21,15 ± 2,37	29,81 ± 2,33	16,15 ± 0,85
2	0,00	40,81 ± 0,69	26,69 ± 0,11	68,72 ± 7,23	16,15 ± 0,85
3	0,00	42,43 ± 3,90	47,03 ± 5,47	79,62 ± 2,63	33,61 ± 2,04
4	0,00	41,10 ± 1,77	29,91 ± 1,13	70,13 ± 2,03	20,14 ± 2,31
5	-	-	-	-	-
6	0,00	39,49 ± 2,13	28,59 ± 0,73	64,41 ± 2,66	14,32 ± 1,68
7	0,00	43,11 ± 3,71	33,56 ± 3,67	70,79 ± 7,42	25,37 ± 4,84
2° ciclo					
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,00	44,36 ± 5,92	26,85 ± 1,06	93,44 ± 8,32	48,30 ± 07,32
2	-	-	-	-	-
3	0,00	40,76 ± 0,99	32,17 ± 1,37	76,15 ± 5,71	29,90 ± 1,55
4	0,00	44,21 ± 5,86	26,91 ± 0,58	72,90 ± 0,75	31,65 ± 1,82
5	0,00	43,67 ± 4,95	29,61 ± 6,13	75,65 ± 3,65	34,11 ± 1,20
6	0,00	40,17 ± 0,59	33,28 ± 0,14	75,41 ± 2,76	36,17 ± 1,47
7	0,00	42,67 ± 4,56	32,38 ± 4,17	74,17 ± 5,82	30,87 ± 2,11
3° ciclo					
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,00	40,65 ± 0,63	31,65 ± 0,00	70,40 ± 4,56	30,94 ± 4,70
2	0,00	40,27 ± 0,02	25,46 ± 0,06	69,47 ± 3,11	31,18 ± 4,07
3	0,00	40,08 ± 0,48	55,31 ± 2,00	67,74 ± 10,73	38,96 ± 0,00
4	0,00	40,27 ± 0,29	38,24 ± 8,32	72,56 ± 1,03	35,83 ± 0,00
5	0,00	46,98 ± 5,96	50,54 ± 4,62	83,50 ± 0,52	43,79 ± 0,90
6	-	-	-	-	-
7	0,00	39,93 ± 1,24	38,27 ± 9,86	75,62 ± 8,51	43,20 ± 0,00
4° ciclo					
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,00	40,68 ± 0,10	53,90 ± 9,96	65,14 ± 2,40	22,09 ± 2,10
2	0,00	42,05 ± 2,72	37,88 ± 5,15	72,49 ± 0,86	29,62 ± 0,50
3	-	-	-	-	-
4	0,00	45,50 ± 8,53	51,68 ± 0,00	69,25 ± 0,00	48,03 ± 0,00
5	0,00	50,21 ± 0,30	59,64 ± 0,00	87,25 ± 2,95	42,77 ± 2,39
6	0,00	40,37 ± 0,58	41,07 ± 6,15	73,12 ± 1,56	31,69 ± 1,32
7	0,00	46,16 ± 8,49	50,94 ± 9,60	71,35 ± 7,56	31,03 ± 6,63
5° ciclo					
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0000	40,58 ± 0,00	37,28 ± 7,76	76,28 ± 7,43	26,06 ± 0,00
2	0,00	40,76 ± 0,89	34,77 ± 1,66	68,88 ± 7,55	28,78 ± 0,00
3	0,00	42,16 ± 1,99	39,77 ± 2,36	75,16 ± 3,45	29,57 ± 1,85
4	-	-	-	-	-
5	0,00	39,76 ± 0,00	39,94 ± 0,00	62,77 ± 0,00	21,80 ± 0,00
6	0,00	43,31 ± 1,45	46,90 ± 3,16	70,83 ± 4,72	28,13 ± 1,65
7	0,00	42,64 ± 0,00	45,99 ± 0,00	66,19 ± 0,00	25,72 ± 0,00
6° ciclo					
0	78,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	-	41,50 ± 1,23	33,48 ± 0,83	66,62 ± 4,26	21,23 ± 01,73
2	-	-	-	-	-
3	-	40,85 ± 0,52	35,65 ± 0,44	67,77 ± 1,35	23,44 ± 0,53
4	-	41,23 ± 1,84	37,59 ± 2,82	66,90 ± 11,03	23,80 ± 9,04
5	-	40,41 ± 0,51	38,58 ± 0,42	64,63 ± 5,34	23,44 ± 4,93
6	-	41,93 ± 0,87	42,41 ± 0,98	64,61 ± 5,75	23,25 ± 3,72
7	-	49,28 ± 6,59	50,43 ± 0,00	60,19 ± 0,00	21,95 ± 0,00

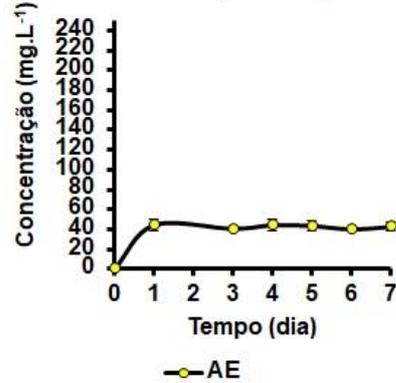
APÊNDICE F – PERFIL ORGANOLÉPTICO (YLB4000 LABORATÓRIO)

Perfil organoléptico (AE) da linhagem de levedura YLB4000 no laboratório (continua na página seguinte).

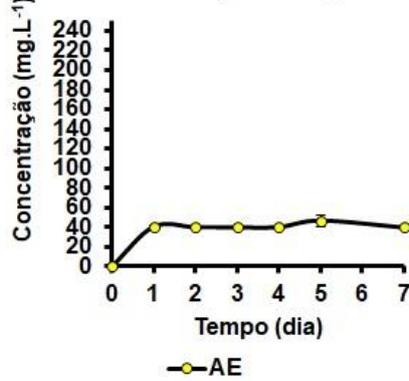
YLB4000 (1º ciclo)



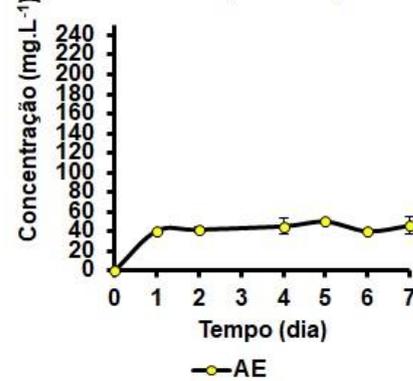
YLB4000 (2º ciclo)



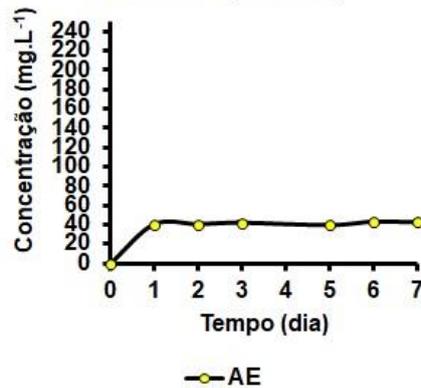
YLB4000 (3º ciclo)



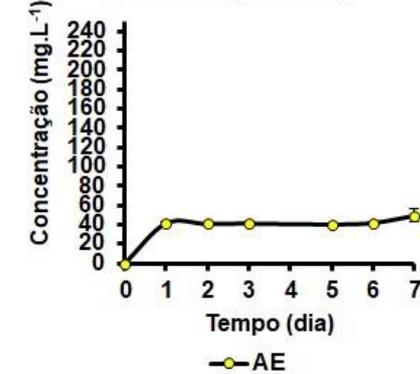
YLB4000 (4º ciclo)



YLB4000 (5º ciclo)

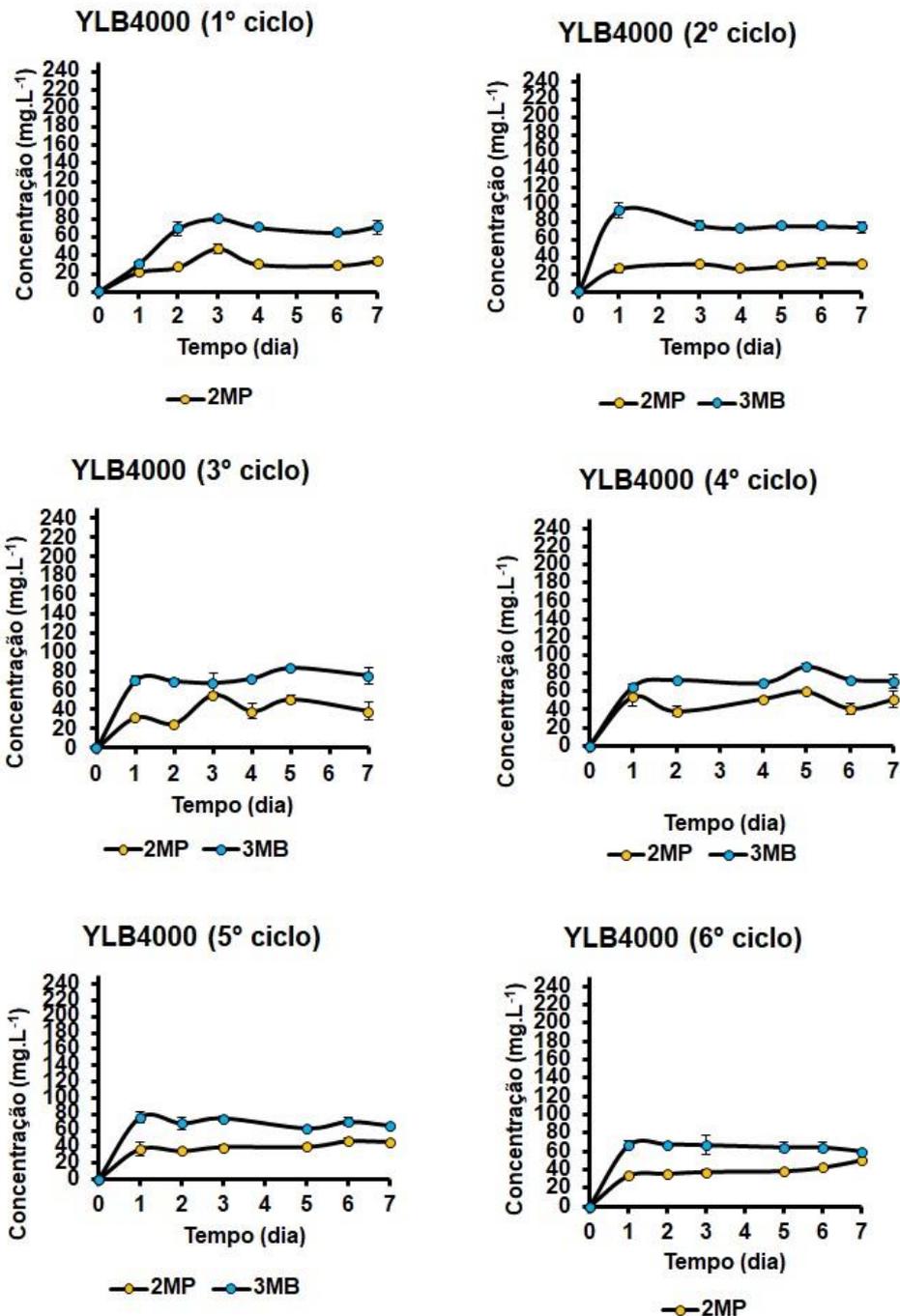


YLB4000 (6º ciclo)



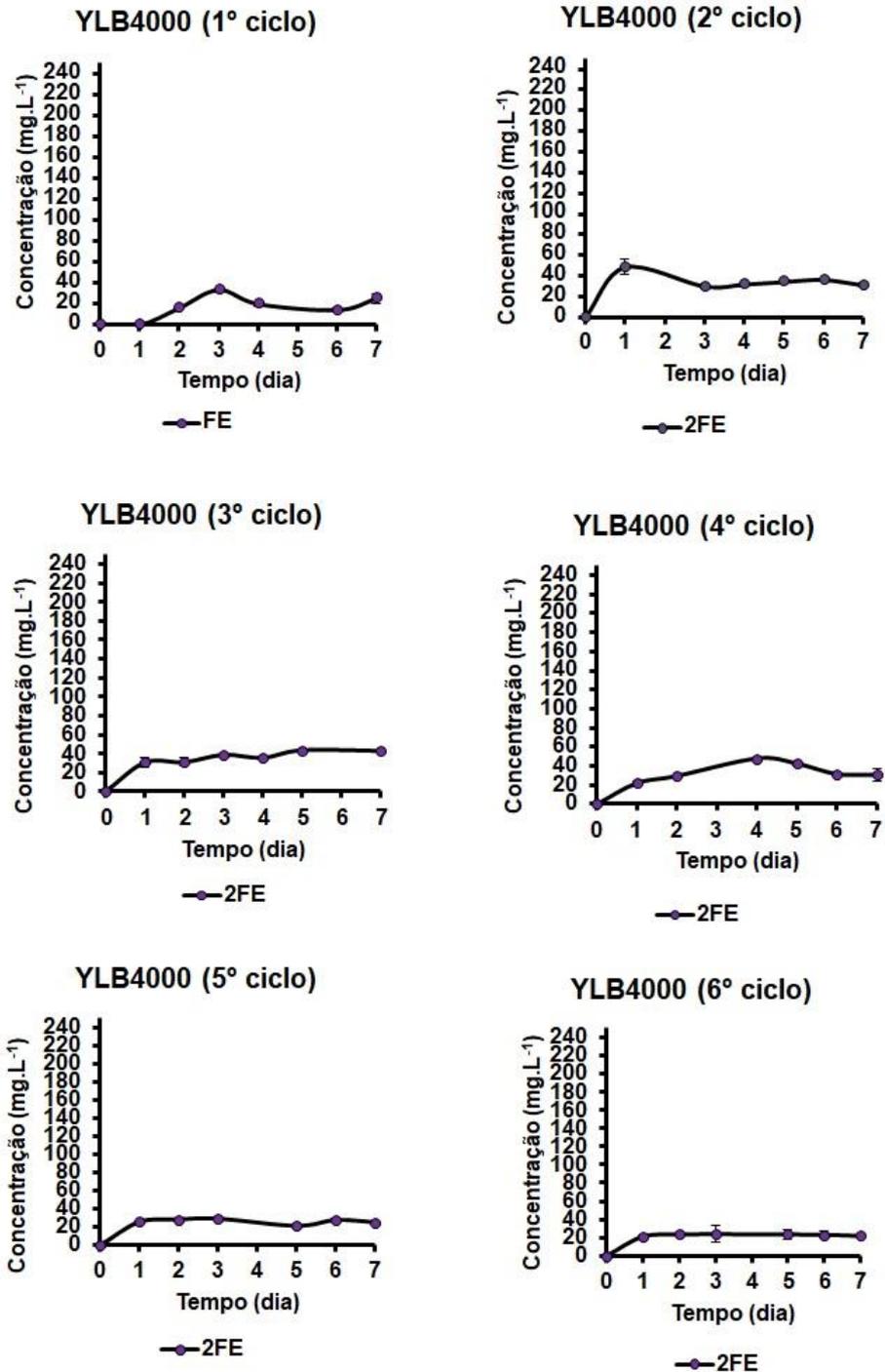
APÊNDICE F – PERFIL ORGANOLÉPTICO (YLB4000 LABORATÓRIO)

Perfil organoléptico (2MP e 3MB) da linhagem de levedura YLB4000 no laboratório (continua na página seguinte).



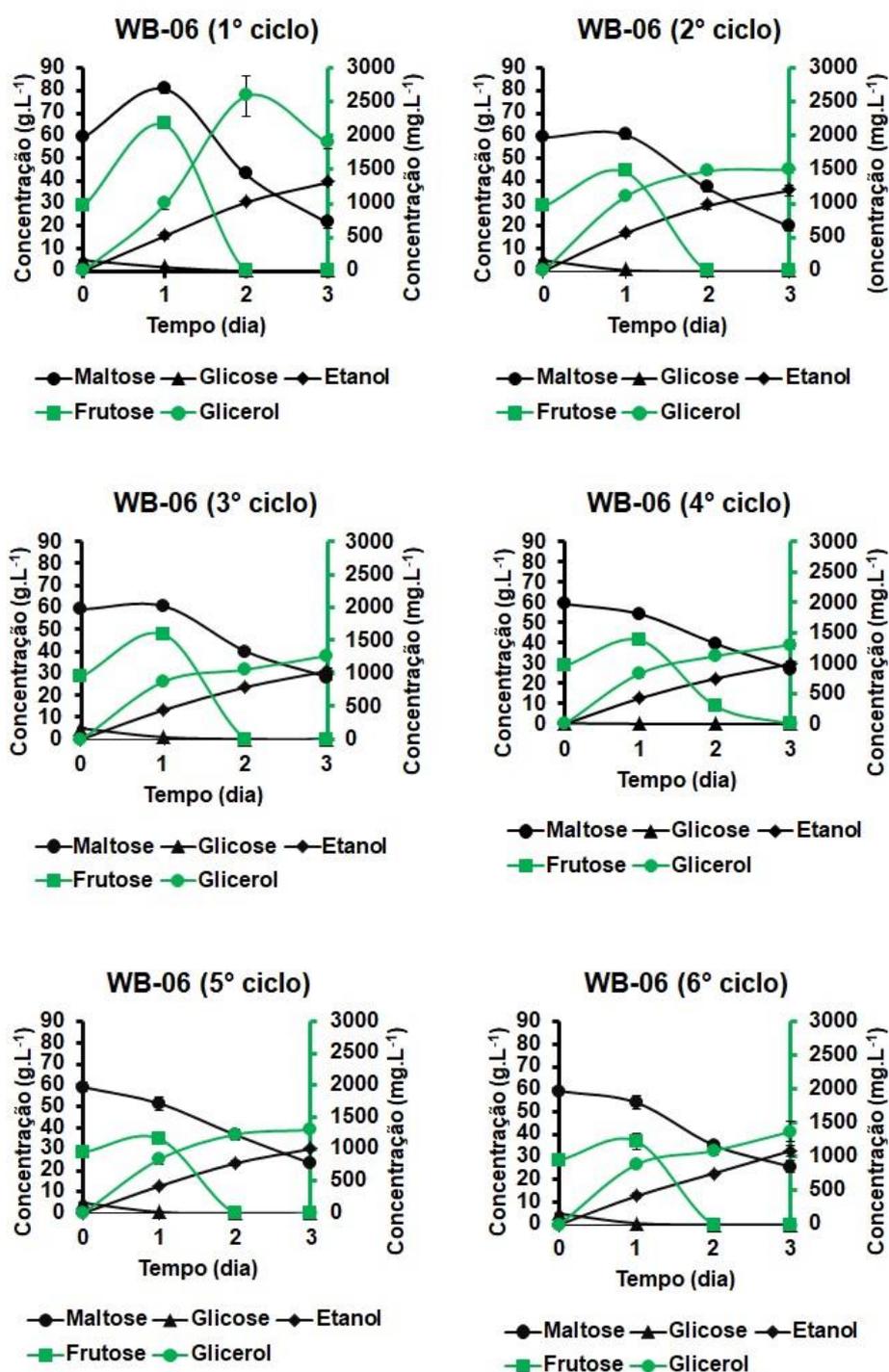
APÊNDICE F – PERFIL ORGANOLÉPTICO (YLB4000 LABORATÓRIO)

Perfil organoléptico (2FE) da linhagem de levedura YLB4000 no laboratório.



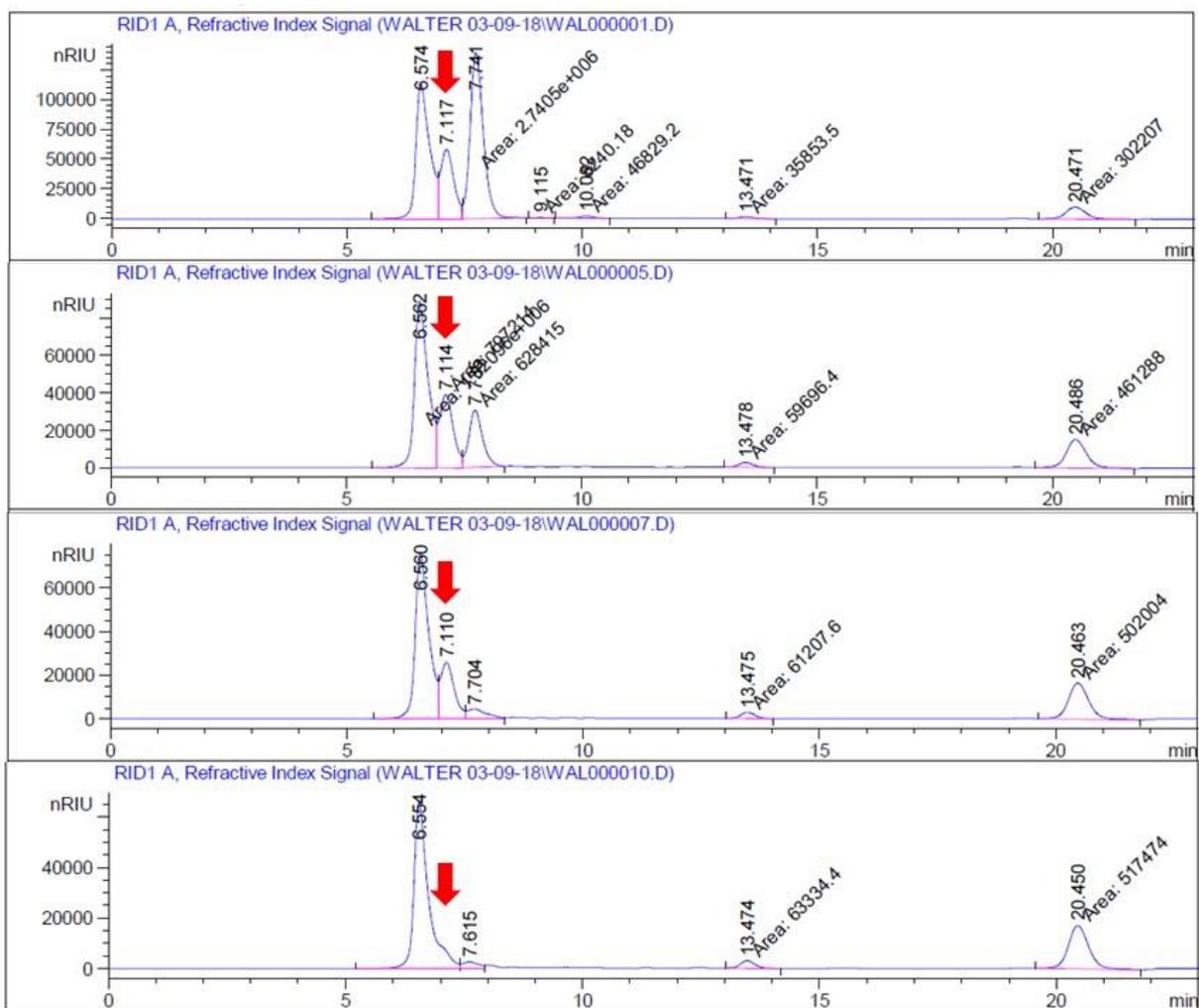
APÊNDICE G – GRÁFICOS DA CLAE (WB-06 AJUSTES)

Perfil metabólico da linhagem de levedura WB-06 nos ensaios de ajustes, mostrando o consumo das fontes de carbono e produção de etanol e glicerol.



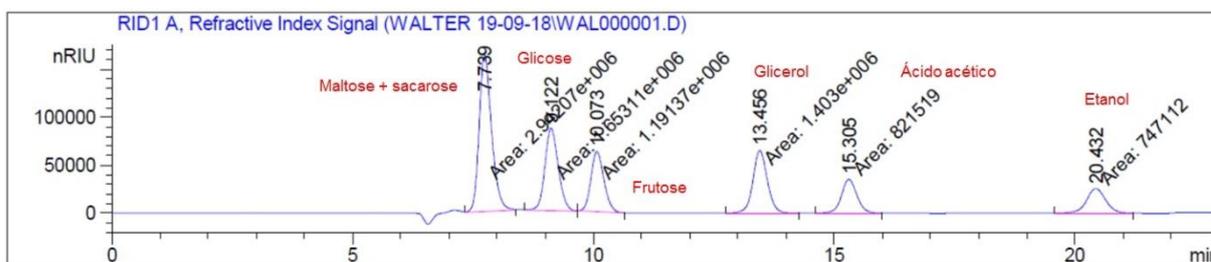
APÊNDICE H – CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS

Cromatogramas mostrando a banda referente ao substrato que apresentou o maior tempo para ser eluído durante os dias de fermentação.



APÊNDICE I – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES EXTERNOS

Cromatograma dos padrões externos mostrando que a maltose e a sacarose apresentaram o mesmo tempo de retenção para as condições cromatográficas adotadas neste trabalho.



ANEXO A – DESCRIÇÃO DA LINHAGEM WB-06

Descrição da linhagem de levedura *S. cerevisiae* var. *diastaticus* WB-06, que é comercializada internacionalmente para cervejarias e indicada para fermentação de cerveja de trigo. Denominada SAFALE™ WB-06 (Fermentis Lesaffre for Beverages). Fonte: Fermentis Lesaffre for Beverages.



Ingredientes: Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), agente emulsificante E491

FERMENTIS

Levedura especial selecionada para fermentações de cervejas de trigo. Produz ésteres e sabores fenólicos em quantidades significativas. Típico das cervejas de trigo. Permite produzir cerveja com um elevado perfil de "drinkability" e tem boa capacidade para ficar em suspensão durante a fermentação.

<p>ÉSTERES TOTAIS</p> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 15px; width: 40px; height: 40px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;">78</div> <p>ppm em mostos com CO de 18°P fermentados em tubos EBC a 20°C</p>	<p>ÁLCOOIS SUPERIORES</p> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 15px; width: 40px; height: 40px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;">404</div> <p>ppm em mostos com CO de 18°P fermentados em tubos EBC a 20°C</p>	<p>açÚCARES RESIDUAIS</p> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 15px; width: 40px; height: 40px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;">0 g/l</div> <p>* corresponde a uma atenuação aparente de 86%</p>	<p>FIOCUAÇÃO</p> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 15px; width: 40px; height: 40px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;">baixa</div>
---	--	---	---

TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO : 12-25°C idealmente 18-24°C
for clover flavors : below 22°C
for banana flavor: above 23°C

DOSAGEM RECOMENDADA: 50 a 80 g/hl

INSTRUÇÕES DE REIDRATAÇÃO
Espalhar a levedura em um volume de água estéril ou mosto equivalente a 10 vezes seu próprio peso, a uma temperatura de 23°C ± 3°C. Deixar repousar entre 15 e 30 minutos. Agitar suavemente por 30 minutos e inocular o creme resultante no fermentador

<p>ANÁLISIS TÍPICO:</p> <p>% peso seco: 940 - 96,5</p> <p>Células viáveis no empacotamento: 19×10^9 /gramas</p> <p>Bactérias totais*: < 5 / ml</p> <p>Bactérias ácido acéticas*: < 1 / ml</p> <p>Lactobacilos*: < 1 / ml</p> <p>Pediacoccus*: < 1 / ml</p> <p>Levedura selvagem tipo não <i>Saccharomyces</i>*: < 1 / ml</p> <p>*Micro organismos patogênicos: Cumprimento da regulação normativa vigente</p> <p>*quando a levedura seca é inoculada a 100 g/hl i.e. > 6×10^6 células viáveis / ml</p>	<p>ARMAZENAMENTO</p> <p>Durante o transporte: O produto pode ser armazenado e transportado a temperatura ambiente por períodos de tempo que não excedam os 4 meses, sem que seja afetado sua performance.</p> <p>No destino final: Armazenar em lugar fresco e seco em lugar fresco (< 10°C) e seco.</p> <p>VALIDADE</p> <p>24 meses após a data de produção. Considerar seu uso anterior a data impressa no sachê. Os sachês abertos devem ser novamente selados, armazenados a 4°C e utilizados dentro dos 7 dias posteriores a sua abertura. Não utilizar sachês moles e estragados.</p>
--	--

Os fermentos secos da Fermentis são bem conhecidos porque com eles podem ser produzidos uma ampla variedade de estilos de cerveja. Para comparar nossas cepas, Fermentis realiza testes de fermentação em condições de laboratório com mostos e temperaturas standards (Safalger: 12°C por 48 h e logo 14°C / Safale e Safbrew : 20°C). Os testes são enfocados para dar seguimento aos seguintes parâmetros: produção de álcool, açúcares residuais, floculação e cinética de fermentação. Devido ao impacto da levedura na qualidade final de cerveja, é recomendado seguir as instruções recomendadas de fermentação. Aconselhamos que testes de fermentação sejam efetuados antes de usar a nossa levedura de cerveja comercialmente.

Fermentis Division of S.Lesaffre
BP 3029 - 137 Rue Gabriel Péri
59703 Marca en Baroeul Cedex France
Tel. +33(0)3 20 81 62 75
e. fermentis@lesaffre.com

A LESAFFRE DIVISION

ANEXO B – DESCRIÇÃO DA LINHAGEM YLB4000

Descrição da linhagem de levedura *S. cerevisiae* YLB4000, que é comercializada nacionalmente para cervejarias e indicada para fermentação de cerveja de trigo. Denominada YeastLab YLB4000 – German Weizen 01 (YeastLab Biotecnologia). Fonte: YeastLab Biotecnologia.



YeastLab YLB4000 – German Weizen 01

Levedura proveniente da Alemanha, é a mais utilizada no mundo todo para cervejas de trigo. Cepa versátil que pode apresentar aroma de banana (ésteres) ou de cravo (fenóis), dependendo da temperatura de fermentação e OG do mosto. Maior temperatura e maior OG geram mais ésteres. Apresenta baixa floculação, mantendo a cerveja turva.

Floculação: **Baixa**

Atenuação: **72% - 76%**

Temperatura: **17°C - 24°C**

Tolerância ao etanol: **10% ABV**

Estilos (BJCP): **Weizen, Weizenbock.**

Armazenamento: **Em geladeira (2°C - 8°C).**

Validade: **4 meses após a data de fabricação (50% de células viáveis).**

Recomendação de uso: **1 frasco (100 mL) inoculado diretamente em até 20L de mosto a 15°P (OG 1.060).**

Atenção: **O frasco pode estar pressurizado, abra com cuidado. A levedura pode ter sedimentado, agite antes de inocular para garantir que as células serão transferidas ao mosto.**

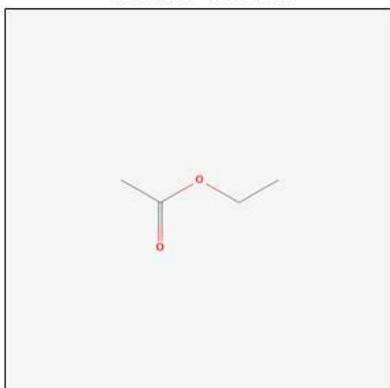


(14) 99201-8242 - (21) 99326-0437 ✉ contato@yeastlab.com.br  www.yeastlab.com.br

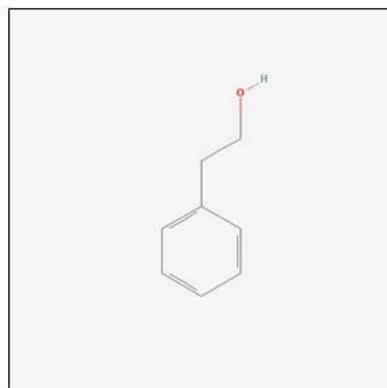
ANEXO C – ÁLCOOIS SUPERIORES E ÉSTERES

Estrutura molecular dos álcoois superiores e ésteres quantificados em mosto e fermentados cervejeiros. Fonte: PubChem: open chemistry database.

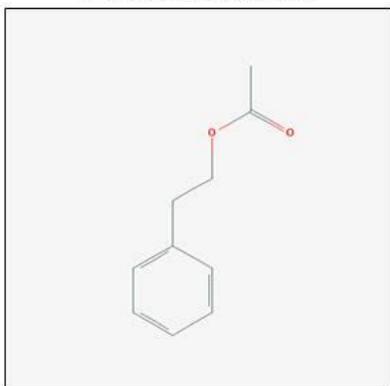
Acetato de etila



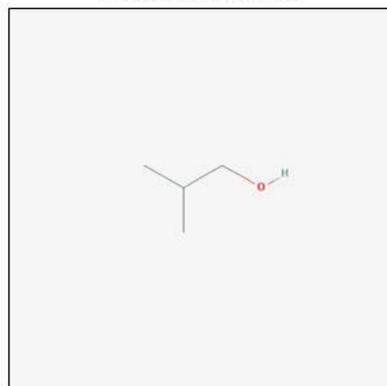
Álcool feniletílico



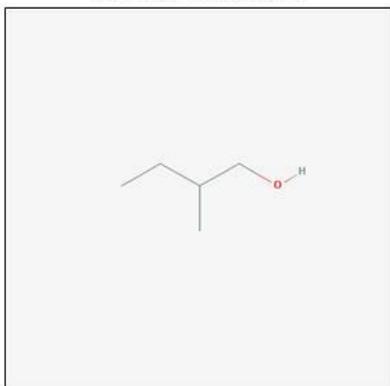
Acetato de feniletila



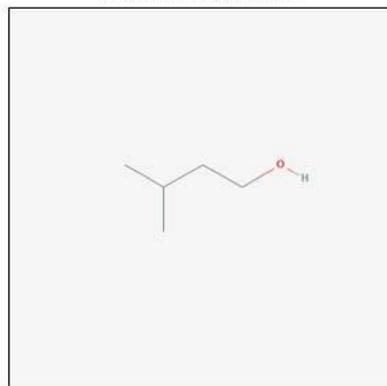
Álcool isobutílico



Álcool amílico ativo



Álcool isoamílico



ANEXO D – CROMATOGRAMA DA CG

Cromatograma dos padrões externos mostrando que o acetato de isoamila possui tempo de retenção menor do que o de outros compostos detectados e quantificados. Fonte: Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

