

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM BENTO GONÇALVES  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**

**ANUBIA MENDONÇA**

**EMPREGO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VAR. *BOULARDII* NO  
PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE CERVEJAS COM  
POTENCIAL PROBIÓTICO**

**BENTO GONÇALVES**

**2021**

**ANUBIA MENDONÇA**

**EMPREGO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VAR. *BOULARDII* NO  
PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE CERVEJAS COM  
POTENCIAL PROBIÓTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial de obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Francine Fioravanso Tramontina

Co-orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. Gildo Almeida da Silva

**BENTO GONÇALVES  
2021**

Catálogo de publicação na fonte (CIP)

M539e Mendonça, Anubia

Emprego de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* no processo de elaboração de cervejas com potencial probiótico/ Anubia Mendonça. – Bento Gonçalves, 2021.

149 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade em Bento Gonçalves, 2021.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Francine Fioravanso Tramontina

Coorientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. Gildo Almeida da Silva

1. Cerveja Artesanal. 2. Fermentação Alcoólica. 3. Probiótico. 4. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). I. Tramontina, Francine Fioravanso. II. Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade em Bento Gonçalves, 2021. III. Título.

Catálogo elaborado pelo Bibliotecário Marcelo Bresolin CRB – 10/2136

**ANUBIA MENDONÇA**

**EMPREGO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR. BOULARDII NO  
PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE CERVEJAS COM  
POTENCIAL PROBIÓTICO**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Graduada na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Francine Fioravanso Tramontina

Co-orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. Gildo Almeida da Silva

**BANCA EXAMINADORA**

*Ana Carolina Tramontina*

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Carolina Tramontina  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

*Christa Korzenowski*

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Christa Korzenowski  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

*Fábio Luis Maciel*

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Voltaire Sant'Anna  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

*Voltaire Sant'Anna*

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Fábio Luis Maciel  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

**BENTO GONÇALVES  
2021**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me iluminou e me manteve forte e fiel durante toda essa trajetória.

A minha amada mãe, que sempre me amou e apoiou incondicionalmente, permitindo que essa graduação fosse possível. Ao meu querido pai que, mesmo não mais presente, sempre me guia e protege. A minha irmã, meu cunhado, minha madrinha, meu padrinho, e todos da minha família que sempre estiveram envolvidos de alguma maneira em minha formação. Aos meus maravilhosos sobrinhos, por sempre me lembrarem de ser alegre como uma criança.

Ao Fabrício que produziu as cervejas, e sanou cada dúvida surgida.

Ao meu querido primo, exemplo de pessoa e de profissional, por ter sempre me incentivado na formação, e pago os custos desse trabalho, permitindo que ele se tornasse possível.

A Melissa, por sua esclarecedora consultoria.

Especialmente a Leda e a cervejaria Imigração, pela incrível parceria, dirimindo dúvidas e abrindo as portas da empresa para a pesquisa, permitindo que as análises fossem realizadas em seu próprio laboratório, destacando sua fidelidade com o conhecimento e a aprendizagem.

Aos meus professores, a Doutora Francine Fioravanso Tramontina, o Doutor Gildo Almeida da Silva, o Doutor Voltaire Sant'Anna, e a Doutora Lilian Raquel Hickert por terem abraçado a ideia deste projeto, pelos ensinamentos que me transmitiram durante toda essa incrível jornada, e pela brilhante orientação durante a realização de todas as etapas do projeto.

*“Palavras são, na minha não tão humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de ferir e de curar”*

*J.K. Rowling*

## RESUMO

Com a crescente preocupação mundial com a saúde e bem-estar, o aumento do consumo de probióticos se destaca, pois estes auxiliam nas funções gastrointestinais, diminuindo os sintomas de constipação, aumentando a imunidade do hospedeiro e reformulando a microbiota intestinal. Aliado a isto, o consumo de bebidas alcoólicas de qualidade e com benefícios à saúde comprovados também vem crescendo. A ingestão diária de doses controladas de etanol, traz ótimos efeitos cardiovasculares aos consumidores, e as cervejas, por exemplo, são fonte de vitaminas do complexo B, selênio, prenilflavonóis, compostos antioxidantes e anti-inflamatórios. O propósito do presente trabalho foi elaborar três tipos de cerveja de forma artesanal, utilizando a levedura probiótica *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*. Os três estilos de cerveja produzidas com a linhagem *bouardii* e com linhagem convencional, apresentaram características de amargor, cor, calorias e pH similares, com maior discrepância em relação à densidade relativa e graduação alcoólica. A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* não apresentou um potencial fermentativo elevado. Sensorialmente, as duas linhagens conferiram aromas e sabores similares. Sob o ponto de vista microbiológico, as cervejas fermentadas com *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* parecem apresentar algum tipo de resistência à contaminação, com colônias que ainda permanecem viáveis depois de algum tempo de armazenagem. Além disto, na questão legal, a cerveja apresentou a quantidade mínima necessária de leveduras vivas, para que a bebida seja considerada um probiótico. Estes dados indicam que, a linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* pode ser utilizada na produção de cervejas artesanais de qualidade, concedendo a bebida um possível potencial probiótico.

**Palavras-chave:** Cerveja artesanal. *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*. Probiótico. Fermentação alcoólica.

## ABSTRACT

With the growing global concern with health and well-being, the increase in the consumption of probiotics stands out, as they help in gastrointestinal functions, reducing the symptoms of constipation, increasing the host's immunity and reshaping the intestinal microbiota. Allied to this, the consumption of quality alcoholic beverages with proven health benefits is also growing. The daily intake of controlled doses of ethanol brings great cardiovascular effects to consumers, and beers, for example, are a source of B vitamins, selenium, prenylflavonols, antioxidant and anti-inflammatory compounds. The purpose of the present work was to elaborate three types of beer in an artisanal way, using the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. The three styles of beer produced with the *boulardii* strain and with the conventional strain had similar bitterness, color, calories and pH characteristics, with a greater discrepancy in relation to relative density and alcohol content. The *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* did not show a high fermentative potential. Sensorially, the two strains conferred similar aromas and flavors. From a microbiological point of view, beers fermented with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* appear to show some sort of resistance to contamination, with colonies still remaining viable after some time of storage. In addition, on the legal issue, the beer had the minimum amount of live yeasts necessary for the drink to be considered a probiotic. These data indicate that the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* can be used in the production of quality craft beers, giving the beverage a possible probiotic potential.

**Key-words:** Craft beer. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Probiotic. Alcoholic fermentation.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principias espécies de microrganismos probióticos.....	54
Tabela 2 - Comparação físico-química entre cervejas Pilsen produzida por <i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i> e cerveja Pilsen produzida por <i>Sacch. pastorianus</i> .....	67
Tabela 3 - Comparação físico-química entre cervejas IPA produzida por <i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i> e cerveja IPA produzida por <i>Sacch. cerevisiae</i> .....	68
Tabela 4 - Comparação físico-química entre cervejas BGSA produzida por <i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i> e cerveja BGSA produzida por <i>Sacch. cerevisiae</i> .....	70
Tabela 5 - Comparação morfológica entre as colônias e microbiológica entre cervejas Pilsen produzidas por <i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i> e <i>Sacch. pastorianus</i> .....	73
Tabela 6 - Comparação morfológica entre as colônias e microbiológica entre cervejas IPA produzidas por <i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i> e <i>Sacch. cerevisiae</i> .....	75
Tabela 7 - Comparação morfológica entre as colônias e microbiológica entre cervejas BGSA produzidas por <i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i> e <i>Sacch. cerevisiae</i> .....	76
Tabela 8 – Consumo de cervejas no estilo Pilsen produzidas por <i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i> e <i>Sacch. pastorianus</i> .....	79
Tabela 9 – Consumo de cervejas no estilo IPA produzidas por <i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i> e <i>Sacch. cerevisiae</i> .....	80
Tabela 10 – Consumo de cervejas no estilo BGSA produzidas por <i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i> e <i>Sacch. cerevisiae</i> .....	80
Tabela 11 – Custos em insumos cervejeiros.....	94
Tabela 12 – Custos em equipamentos de produção de cervejas.....	94

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cervejaria e padaria no Egito Antigo.....	14
Figura 2 – Principais rotas e cidades da Liga Hanseática.....	16
Figura 3 – Primeiros rótulos das cervejarias brasileiras.....	20
Fórmula 1 - Análise de cor.....	28
Figura 4 – Estruturas do grão de cevada.....	31
Figura 5 – Grão de cevada em processo de germinação.....	32
Figura 6 – Formação da acróspira e da radícula.....	32
Figura 7 – Intensidade de torras (malte de cevada).....	33
Figura 8 - Cadeia da amilose.....	33
Figura 9 – Cadeia da amilopectina.....	34
Figura 10 – Estrutura molecular das enzimas de hidrólise do amido.....	35
Figura 11 – Atuação das amilases na cadeia do amido.....	35
Figura 12 – Teste do iodo.....	36
Figura 13 - Lúpulo <i>in natura</i> e em pellets.....	37
Figura 14 – Estrutura química dos compostos presentes no lúpulo.....	38
Figura 15 – Processo de fermentação alcoólica.....	40
Figura 16 – Célula de levedura.....	42
Figura 17 – Modelo de mosaico fluido para a estrutura da membrana plasmática....	43
Figura 18 – Fase preparatória da via glicolítica.....	47
Figura 19 – Fase de pagamento da via glicolítica.....	48
Figura 20 – Ciclo de Krebs.....	48
Figura 21 - Micrografia eletrônica do <i>Saccharomyces cerevisiae var. boulardii</i> .....	49
Figura 22 – Moagem do malte.....	60
Figura 23 – Processo de mostura.....	60
Figura 24 – Tráfega do mosto filtrado e processo de fervura.....	61
Figura 25 – Inoculação da levedura e fermentação.....	62
Figura 26 – Equipamento para análises físico-químicas.....	64
Figura 27 – Meios de cultura utilizados.....	65
Figura 28 – Exemplo de contagem por meio de cultura realizado para cada estilo de cerveja.....	71
Figura 29 – Visão microscópica de leveduras coradas (mortas) e não coradas (vivas) com azul de metileno.....	72

Fórmula 2 - Volume de ingestão diária recomendado.....78

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo Pilsen com <i>Sacch. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> .....	81
Gráfico 2 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo Pilsen com <i>Sacch. pastorianus</i> .....	82
Gráfico 3 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo Pilsen com <i>Sacch. var. boulardii</i> .....	83
Gráfico 4 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo Pilsen com <i>Sacch. pastorianus</i> .....	83
Gráfico 5 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo IPA com <i>Sacch. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> .....	85
Gráfico 6 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo IPA com <i>Sacch. cerevisiae</i> .....	85
Gráfico 7 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo IPA com <i>Sacch. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> .....	86
Gráfico 8 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo IPA com <i>Sacch. cerevisiae</i> .....	87
Gráfico 9 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo BGSA com <i>Sacch. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> .....	88
Gráfico 10 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo BGSA com <i>Sacch. cerevisiae</i> .....	89
Gráfico 11 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo BGSA com <i>Sacch. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> .....	90
Gráfico 12 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo BGSA com <i>Sacch. cerevisiae</i> .....	90

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais produtos probióticos comercializados no mercado.....	54
Quadro 2 – Cronograma.....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

BJCP – Beer Judge Certification Program

EBC – European Brewing Convention

OG – Densidade Original

FG – Densidade Final

IBU – International Bitter Unit

ABV – Alcohol by Volume

SRM – Standard Reference Method

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

BGSA – Belgian Golden Strong Ale

IPA – Indian Pale Ale

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido

NAD<sup>+</sup> – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidado

FADH – Flavina Adenina Nucleotídeo Reduzido

ATP – Adenosina Trifosfato

GTP – Trifosfato de Guanosina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>14</b>
3.1	CERVEJA	14
<b>3.1.1</b>	<b>História da cerveja no mundo</b>	<b>14</b>
3.1.1.1	Idade Média	15
3.1.1.2	Idade Moderna	16
3.1.1.3	Idade Contemporânea	18
<b>3.1.2</b>	<b>História e influências da cerveja no Brasil</b>	<b>19</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Benefícios a saúde</b>	<b>22</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Estilos de cerveja</b>	<b>23</b>
3.1.4.1	American lager (Pilsen)	24
3.1.4.2	Indian Pale Ale (IPA)	24
3.1.4.3	Belgian Golden Strong Ale (BGSA)	25
<b>3.1.5</b>	<b>Parâmetros legais para uma cerveja</b>	<b>25</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Análises da cerveja</b>	<b>39</b>
3.1.6.1	Análises físico-químicas	40
3.2	ETAPAS DA PRODUÇÃO CERVEJEIRA DO PONTO DE VISTA METODOLÓGICO E BIOQUÍMICO	27
<b>3.2.1</b>	<b>Malteação</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Mostura</b>	<b>30</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Fervura</b>	<b>34</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Fermentação</b>	<b>36</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Maturação</b>	<b>38</b>
3.3	LEVEDURAS	39
<b>3.3.1</b>	<b>Identificação microbiológica na cerveja</b>	<b>46</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Leveduras cervejeiras</b>	<b>47</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Metabolismo aeróbico da levedura</b>	<b>48</b>

3.3.4	<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i></b> .....	50
3.4	PROBIÓTICOS.....	53
3.4.1	<b>Descoberta e propriedades</b> .....	54
3.4.2	<b>Principais microrganismos e alimentos probióticos</b> .....	55
3.4.3	<b>Parâmetros legais para uma bebida probiótica</b> .....	57
3.4.3.1	Análise microbiológica .....	59
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	60
4.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO .....	60
4.2	DELINEAMENTO DA PESQUISA .....	61
4.3	PRODUÇÃO DA CERVEJA.....	61
4.3.1	<b>Propagação da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i></b> .....	61
4.3.2	<b>Elaboração</b> .....	61
4.3.2.1	Pilsen.....	64
4.3.2.2	Indian Pale Ale.....	64
4.3.2.3	Belgian Golden Strong Ale.....	65
4.3.3	<b>Análises</b> .....	65
4.3.3.1	Físico-químicas.....	65
4.3.3.2	Microbiológicas .....	66
4.3.3.3	Sensoriais.....	67
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	68
5.1	RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	68
5.1.1	<b>Físico-química do estilo Pilsen produzido por <i>Sacch. var. boulardii</i> e <i>Sacch. pastorianus</i></b> .....	68
5.1.2	<b>Físico-química do estilo IPA produzido por <i>Sacch. var. boulardii</i> e <i>Sacch. cerevisiae</i></b> .....	70
5.1.3	<b>Físico-química do estilo BGSA produzido por <i>Sacch. var. boulardii</i> e <i>Sacch. cerevisiae</i></b> .....	71
5.2	RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	73
5.2.1	<b>Microbiologia do estilo Pilsen produzido por <i>Sacch. var. boulardii</i> e <i>Sacch. pastorianus</i></b> .....	75
5.2.2	<b>Microbiologia do estilo IPA produzido por <i>Sacch. var. boulardii</i> e <i>Sacch. cerevisiae</i></b> .....	77



<b>5.2.3 Microbiologia do estilo BGSA produzido por <i>Sacch. var. boulardii</i> e <i>Sacch. cerevisiae</i></b> .....	<b>78</b>
<b>5.2.4 Ingestão diária recomendada</b> .....	<b>80</b>
5.2.4.1 Pilsen.....	81
5.2.4.2 IPA.....	82
5.2.4.3 BGSA.....	82
<b>5.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES SENSORIAIS</b> .....	<b>83</b>
<b>5.3.1 Análise sensorial do estilo Pilsen produzido por <i>Sacch. var. boulardii</i> e <i>Sacch. pastorianus</i></b> .....	<b>83</b>
<b>5.3.2 Análise sensorial do estilo IPA produzido por <i>Sacch. var. boulardii</i> e <i>Sacch. cerevisiae</i></b> .....	<b>87</b>
<b>5.3.3 Análise sensorial do estilo BGSA produzido por <i>Sacch. var. boulardii</i> e <i>Sacch. cerevisiae</i></b> .....	<b>91</b>
<b>6 RECURSOS</b> .....	<b>97</b>
6.1 RECURSOS HUMANOS .....	97
6.2 RECURSOS CIENTÍFICOS.....	97
6.3 RECURSOS MATERIAIS E FINANCEIROS.....	98
<b>7 CRONOGRAMA</b> .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	<b>100</b>
<b>REFERENCIAL</b> .....	<b>103</b>
<b>APÊNDICE A – FICHA TÉCNICA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL PARA O ESTILO PILSEN</b> .....	<b>116</b>
<b>APÊNDICE B – FICHA TÉCNICA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL PARA O ESTILO IPA</b> .....	<b>117</b>
<b>APÊNDICE C – FICHA TÉCNICA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL PARA O ESTILO BGSA</b> .....	<b>118</b>
<b>ANEXO A - MÉTODO EBC 9.43.2</b> .....	<b>119</b>
<b>ANEXO B - MÉTODO EBC 9.4</b> .....	<b>121</b>
<b>ANEXO C - MÉTODO EBC 9.2.3</b> .....	<b>126</b>
<b>ANEXO D - MÉTODO EBC 9.45</b> .....	<b>131</b>

<b>ANEXO E - MÉTODO EBC 9.35.....</b>	<b>135</b>
<b>ANEXO F - MÉTODO EBC 9.8.....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO G - MÉTODO EBC 3.1.1.1 .....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO H - MÉTODO EBC 3.2.1.1 .....</b>	<b>145</b>
<b>ANEXO I - MÉTODO EBC 5.1.4 .....</b>	<b>148</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com características únicas, diferentes estilos de cervejas artesanais vêm caindo no gosto da população brasileira, que, nos dias atuais, tem buscado produtos diferenciados e de maior qualidade. O Rio Grande do Sul tem se destacado neste ramo, sendo o segundo maior estado em número de cervejarias registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no ano de 2019, e o primeiro em número de produtos registrados (BRASIL, 2019).

Na visão do grande público, a cerveja é apenas uma bebida alcoólica para ser consumida em momentos de descontração, e que não apresenta grande qualidade nutricional. Entretanto, já é sabido que, estão presente na cerveja, vitaminas do complexo B, selênio, diversos compostos com capacidade redox e com propriedades anti-inflamatórias, além de prenilflavonóis (SIQUEIRA *et al.*, 2008).

A busca do consumidor por alimentos nutricionalmente ricos tem sido impulsionada neste período de pandemia, momento em que 70% dos consumidores ao redor do planeta estão mudando de dieta na busca por hábitos alimentares mais saudáveis (CONSUMIDOR MODERNO, 2020). No Brasil, a soma é um pouco menor, mas igualmente considerável - 51% da população busca por um estilo de vida mais saudável. O mesmo tem ocorrido com a indústria cervejeira, que busca inovações para manter suas apostas num público cada vez mais exigente e consciente na busca por alimentos funcionais. Desta forma, a elaboração de cervejas com características probióticas é ainda um campo que deve ser explorado.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2002), “os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Eles devem ser viáveis desde a fonte inicial de armazenagem, até se estabelecerem no organismo do hospedeiro para posterior proliferação. Esses microrganismos podem englobar bactérias como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, ou algumas leveduras como as da espécie *Saccharomyce* (*Sacch.*). Quando ministrados de forma adequada, eles podem modificar a microbiota, principalmente a intestinal, através de fixação e colonização, desencadeando benefícios a saúde do hospedeiro.

Na indústria cervejeira, tradicionalmente há inoculação de linhagens de leveduras específicas, comumente do gênero *Saccharomyces*, das espécies *cerevisiae* ou *pastorianus*, que conferem aromas e sabores particulares de acordo

com a linhagem escolhida (OLIVEIRA, 2011). Dentre as especificações das leveduras há uma distinção de acordo com a temperatura e o local em que fermentam. As do tipo *ales* são leveduras de alta fermentação que se dispõem no topo do fermentador, e trabalham numa temperatura de 18° a 22°C. As do tipo *lager* são leveduras de baixa fermentação, que se depositam na base do fermentador operando entre 7° e 15°C (GIBSON & LITI, 2015; WENDLAND, 2014).

Existem também estilos onde o cervejeiro faz uma segunda fermentação com a espécie *Brettanomyces*, que se trata de uma levedura utilizada para a produção de cervejas mais secas e ácidas, que adquirem notas bastante frutadas com o passar do tempo (BASSO, 2019). Ainda é possível realizar uma fermentação espontânea em tanques abertos, com as leveduras existentes no próprio ambiente, o que gera cervejas incomuns e únicas, sendo impossível sua reprodutibilidade.

Para tornar a cultura cervejeira mais popular quanto a seus benefícios e funcionalidades, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a possibilidade de utilização de uma levedura não convencional na indústria cervejeira, elaborando três estilos de cerveja com a linhagem *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, que apresenta comprovado potencial fermentativo e com capacidade probiótica, e comparando com dados analíticos e sensoriais de cervejas de mesmo estilo, elaboradas com leveduras convencionais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir cerveja artesanal com apelo probiótico nos estilos Pilsen, Indian Pale Ale e Belgian Golden Strong Ale, utilizando *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, e compará-los com aquelas produzidas com linhagens convencionais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* para elaborar uma cerveja artesanal com apelo probiótico dos estilos Pilsen, Indian Pale Ale e Belgian Golden Strong Ale;
- Comparar as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais da cerveja Pilsen produzida por *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, com a cerveja Pilsen produzida por *Saccharomyces pastorianus* - Lallemand Diamond.
- Comparar as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais da cerveja Indian Pale Ale produzida por *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, com a cerveja Indian Pale Ale elaborada com a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* – Safale US-05.
- Comparar as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais da cerveja Belgian Golden Strong Ale produzida por *Saccharomyces var. boulardii*, com a cerveja Belgian Golden Strong Ale produzida por *Saccharomyces cerevisiae* – Safale S-04.
- Avaliar o enquadramento das cervejas produzidas com relação aos parâmetros legais que envolvem a comercialização de uma cerveja, bem como aos padrões legais referentes a bebidas probióticas.
- Avaliar se o limite de ingestão diário da bebida obtida está de acordo com a recomendação diária de consumo de probióticos;
- Avaliar o custo e a qualidade do produto final para introdução no mercado.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 CERVEJA

##### 3.1.1 História da cerveja no mundo

Os primeiros registros de produção cervejeira datam dos sumérios, há cerca de 6 (MULLER, 2002; PRIEST; STEWARTS, 2006) a 4 mil anos (COSTA, 2016; MARK, 2011), especialmente após o fim do nomadismo e início da agricultura. Essa civilização era fixada na crescente fértil da Mesopotâmia (MARK, 2011; MULLER, 2002), onde a cevada crescia de maneira selvagem.

Com a conquista da Suméria pelos Babilônicos, a produção cervejeira evoluiu em todos os âmbitos, estando presente inclusive no primeiro conjunto de leis que se tem conhecimento, o Código de Hammurabi (aproximadamente 1728 a.C) (OLIVER, [2011?]; LINCOLN, DORNBUSCH, [201-]).

Delwen (1996), em suas escavações no Egito pelo Departamento de Arqueologia da Universidade de Cambridge, identificou e registrou que, entre 3100-2686 a.C., os egípcios também já estavam familiarizados com a cultura cervejeira, possuindo uma produção ainda rudimentar, como apresentado na Figura 1, mas que demonstram um inicial conhecimento para a elaboração da bebida.

Figura 1 – Cervejaria e padaria no Egito Antigo



Fonte: Mark (2011)

Depois da derrota grega em Ácio, em 31 a.C., o Egito passou para a dominação romana (OLIVER, [2011?]), que admiravam muito mais o vinho que a cerveja, sendo que, nesse período, a cerveja se categorizou oficialmente como uma bebida de classe social baixa (COSTA, 2016; LINCOLN; DORNBUSCH, [201-]), enquanto que o vinho assumiu definitivamente seu lugar nas mesas da classe social alta em todo o Egito.

Mesmo com o preconceito romano sobre a cerveja, com a expansão do império, muitas regiões de dominação romana não eram aptas à cultura da uva (MEUSSDOERFFER, 2009). Foi necessário, então, adequar e fornecer, às tropas, a bebida local. Além disso, Morado (2017) e Poelmans & Swinnen (2011), também salientam que, em muitas regiões, a população costumava repudiar os costumes de seus dominadores, o que contribuiu para a disseminação da cerveja como a bebida cultural de vários povos europeus.

### 3.1.1.1 *Idade Média*

Com o fim do Império Romano, a chegada da cultura cervejeira germânica na Europa Ocidental, e com a introdução da religião católica de norte a sul do continente (MEUSSDOERFFER, 2009), a fabricação da cerveja passou a ser cotidiano nos mosteiros cristãos (MARK, 2011; MORADO, 2017).

Em torno de 643, São Columbano, um missionário irlandês, escreveu que “como sua bebida, eles preparavam cerveja (*cerevisia*) de grãos ou suco de cevada”, referindo-se à produção dos monges em comparação com a bebida muito bem estabelecida e desenvolvida na Irlanda (MEUSSDOERFFER, 2009). Foram missionários como São Columbano que expandiram a tradicional cultura cervejeira celta e germânica por toda a Europa (MEUSSDOERFFER, 2009; MORADO, 2017).

Como apresentou Anderson (2006) em seu capítulo do livro *Handbook of Brewing* de Fergus Priest e Graham Stewarts (2006), os monges aperfeiçoaram as técnicas de produção da cerveja, investindo no uso mais acentuado de lúpulo, pois perceberam que esse ingrediente conferia a bebida maiores aromas e sabores, além de conservar o produto por um período de tempo mais longo. O primeiro registro deste ingrediente data dentre os séculos 8 e 9 na Alemanha Central, e indica que ao menos alguns mosteiros faziam a utilização de lúpulo (MEUSSDOERFFER, 2009).

Conforme o comércio cervejeiro foi crescendo para fora dos mosteiros, leis urbanas que garantissem a pureza da bebida e o fornecimento de grãos, se tornaram cada vez mais necessárias (MEUSSDOERFFER, 2009). Investigando historicamente, são registradas ordenações que possuíam a intenção de garantir esses direitos, como a exemplo de Augsburg em 1158, Paris em 1268 e Nuremberg em 1293 (OLIVER, [2011?]).

No século 13, houve também o surgimento de uma associação comercial entre algumas cidades, a Liga Hanseática, exibida na Figura 2 (SÁ, 2010). Tinha por objetivos beneficiar o comércio entre as cidades que eram associadas, auxiliar as negociações com regiões comerciais estrangeiras, e monopolizar o comércio naval nos mares Báltico e os do Norte da Europa (SÁ, 2010). Essa liga teria seu ápice já durante a Idade Moderna, estando altamente relacionada com a fabricação de cervejas que seriam transportadas por longas distâncias.

Figura 2 – Principais rotas e cidades da Liga Hanseática



Fonte: Martes (2008)

### 3.1.1.2 Idade Moderna

A queda do Império Romano permitiu a expansão marítima de outros impérios, como é o caso do Europeu (LAVINSCKY, 2017). Os vikings, a liga hanseática, os holandeses e os britânicos tomaram conta do cenário comercial naval, todos eles tendo a cerveja como insumo indispensável para as longas viagens (MEUSSDOERFFER, 2009). Lavinsky (2017) enfatiza que, para isso, a cerveja



deveria ser nutritiva, e manter sua qualidade durante todo o percurso, o que era característico dos estilos mais lupados.

Nesse contexto, produtores da Liga Hanseática foram um dos principais responsáveis pela criação de uma cerveja que englobava esses requisitos (LAVINSCKY, 2017), desenvolvendo um produto que tinha como substrato o malte de trigo e de cevada, ao invés do malte de aveia comumente utilizado na época (MEUSSDOERFFER, 2009). Essa receita que continha matérias-primas exclusivas da Liga, como o lúpulo e maltes, conseguidos pela associação com celeiros de diversas partes do mundo (MEUSSDOERFFER, 2009), deixava os produtores livres dos grãos da safra, conferia um produto diferencial em sabor, e mais estável, o que garantia a qualidade para uma ampla exportação, assim como para o consumo dos marinheiros (POELMANS; SWINNEN, 2011). Posteriormente, entre os séculos 14 e 15, a aveia seria amplamente substituída pela cevada como cereal base da receita cervejeira (MEUSSDOERFFER, 2009).

Leis locais sobre a fabricação e comercialização da cerveja foram promulgadas desde sempre, dado o amplo crescimento do mercado consumidor, que visavam garantir um produto padronizado, de qualidade, e que fosse lucrativo em impostos (MORADO, 2017; OLIVER, [2011?]). Porém, foi em 23 de abril 1516, na Baviera, que o duque Wilhelm IV (DORNBUSCH; HEYSE, [20--]), estabeleceu uma lei que seria um marco para toda a indústria cervejeira.

A *Reinheitsgebot*, ou “Lei da Pureza”, definiu formalmente os ingredientes do produto para que este fosse rotulado como cerveja, finalmente consagrando a cevada e lúpulo como bases para a fabricação, e eliminando bebidas à base de outros cereais e/ou com adjuntos (MORADO, 2017; MEUSSDOERFFER, 2009). Além disso, a Lei estabelecia um preço padrão, protegendo o consumidor de um superfaturamento em um produto de alimentação básica na época (MARK, 2011; LINCOLN, DORNBUSCH, [201-]), instaurava normas administrativas para certificar a quantidade da bebida. (MEUSSDOERFFER, 2009), e deixava claro que, para a produção da bebida, os ingredientes exclusivos eram água, malte de cevada e lúpulo (COSTA, 2016; DORNBUSCH; HEYSE, [20--]; MORADO, 2017; MEUSSDOERFFER, 2009; POELMANS, SWINNEN, 2011), com permissão futura para a utilização de trigo em alguns estilos (LINCOLN, DORNBUSCH, [201-]; POELMANS, SWINNEN, 2011), e do fermento, após o descobrimento da levedura

no processo de elaboração (LINCOLN, DORNBUSCH, [201-]; MORADO, 2017; PRIEST, STEWARTS, 2006).

Reinos como o da Baviera e da Boêmia, onde a nobreza possuía muitas cervejarias sob seu domínio, assim como a matéria prima para a produção da bebida, conseguiram manter a indústria cervejeira viva durante as dificuldades dos séculos 16 e 17 como a Guerra dos 30 anos, o constante aumento do preço da cevada, e a perda de mercado para outras bebidas (MORADO, 2017). Esses locais continuaram distribuindo uma cerveja de qualidade pela Europa, levando-os a um grande destaque futuro na produção cervejeira (MEUSSDOERFFER, 2009). Um exemplo disso é o desenvolvimento do processo *lager* na Baviera, onde a fermentação ocorre mais lentamente, em temperatura baixa, com o fermento se acumulando no fundo do fermentador (POELMANS; SWINNEN, 2011), gerando uma cerveja mais durável, o que dispensava a necessidade do gelo natural para conservação, deixando de limitar a fabricação apenas aos meses de inverno (LAVINSCKY, 2017).

O século 17 também foi marcado por uma inovação que entraria para história da produção em larga escala. Durante a Revolução Industrial, mais especificamente em 1764, James Watt criou uma máquina a vapor que permitia a geração de energia a base de carvão, uma completa evolução para todo o setor fabril, permitindo a industrialização de todo tipo de processo (DATHEIN, 2003).

### 3.1.1.3 Idade Contemporânea

A Idade Contemporânea é marcada por inovações científicas e industriais, sendo as três mais marcantes para o mercado cervejeiro a criação do estilo Pilsen, que tomaria o mercado mundial em poucos anos, a descoberta da fermentação alcoólica em 1856 por Louis Pasteur, e a invenção da refrigeração com amônia em 1875.

No ano de 1842, Josef Groll, um mestre cervejeiro alemão, chamado para resolver um problema de qualidade da cerveja na cidade de Plzeň (Pilsen), atual República Tcheca, desenvolve um estilo focado em uma cerveja clara e fortemente lupada, carbonatada e com sabor equilibrado, que ficaria conhecida mundialmente como Pilsen (MEUSSDOERFFER, 2009; MORADO, 2017; POELMANS, SWINNEN, 2011). Mesmo de difícil reprodução, já que o sucesso da Pilsen se deve à água da

cidade de Plzeň (Pilsen), nos anos seguintes, esse estilo tomaria o cenário cervejeiro europeu (MEUSSDOERFFER, 2009), e o logo chegaria a outros países.

Na área da fermentação, desde 1837 cientistas como Charles Cagniard-Latour, Theodor Schwann e Friedrich Kützing já defendiam, com base em seus estudos, que a fermentação alcoólica era consequência biológica, e não química, como se acreditava inicialmente. Neste contexto, em 1857, pesquisando sobre a fermentação láctica, o cientista Louis Pasteur detectou ao microscópio a presença de diversas estruturas complexas, que, segundo ele, apenas um processo de organismos vivos seria capaz de gerá-las, pois reações químicas originariam compostos totalmente simétricos, identificando então a origem biológica da fermentação, a levedura.

O ano de 1873 também foi marcado por uma importante inovação tecnológica, quando Carl von Linde, um engenheiro alemão, desenvolveu o primeiro sistema de refrigeração mecânica, e o instalou em uma cervejaria (HUNT, ([20--])). Linde, se baseando no conceito básico de refrigeração por expansão, (DORNBUSCH, ([20--])), utilizou amônia como fluido refrigerante, dada sua propriedade de rápido resfriamento, conseguindo criar blocos de gelo. Em especial na produção cervejeira, a refrigeração mecânica permitia que a bebida fosse produzida o ano inteiro, não sendo mais dependente do gelo natural para regular o calor gerado durante a fermentação, e, portanto, não havendo mais limitações de produção apenas para os meses de inverno (OLIVER, [2011?]). Essa máquina seria implementada em todas as cervejarias nos anos seguintes (HUNT, ([20--])).

### **3.1.2 História e influências da cerveja no Brasil**

A cerveja chegou ao Brasil por volta de 1808, quando o país estava sobre domínio da Família Real Portuguesa, as importações de produtos ingleses se intensificaram, dado a aliança entre Portugal e Inglaterra, com os estilos Pale Ale e Porter dominantes no mercado (ROTOLO; MARCUSSO, 2019). No entanto, foi somente a partir 1880, que a cerveja *lager* alemã chegou ao Brasil, e reformulou o cenário (LAVINSCKY, 2017).

No ano de 1853, na cidade de Petrópolis, o alemão Henrique Kremer funda a primeira cervejaria do Brasil, a Imperial Fábrica de Cerveja Nacional (MORADO, 2017), que receberia o nome de Bohemia em 1989 (BOHEMIA, 2021?). Logo em

1888, como retratado por Morado (2017), surge a Antartica Paulista e a Manufatura de Cerveja Brahma, ambas focadas no estilo Pilsen, já altamente aceito e desenvolvido no cenário cervejeiro. Seus primeiros rótulos são ilustrados na Figura 3.

Figura 3 – Primeiros rótulos das cervejarias brasileiras



Fonte: Bohemia (2021?); Ambev (2021?)

Em meados de 1896 os impostos sob a importação da cerveja aumentaram drasticamente, e em 1904 um limite para a quantidade de produto importado seria estabelecido (LAVINSCKY, 2017). Essas mudanças auxiliaram grandemente no desenvolvimento do mercado produtivo nacional, mesmo que ainda dependente de importações de matérias primas (LAVINSCKY, 2017). Portanto, foi entre os anos de 1890 a 1930 que a indústria cervejeira brasileira se desenvolveu, impulsionada principalmente por empresários alemães, portugueses e brasileiros, que baratearam a produção e impulsionaram a venda da bebida (MARQUES, 2014).

Em seu livro Larousse da Cerveja de 2017, Morado aponta que, nesse momento histórico, a cerveja era tratada apenas como um produto de consumo em massa, produzida em grande escala por maquinário industrial, não havendo, inclusive, variedade de estilos. No entanto, o mesmo autor reúne duas principais ondas da volta do reconhecimento da produção artesanal. A primeira onda ocorreu por volta do ano de 1986, impulsionada pelo fim do regime militar e consequente abertura do país para importações, o cenário mudou com a inauguração da cervejaria Bavarian Park, na cidade de Curitiba, e a chegada de uma grande variedade de estilos mundiais de cerveja aos mercados. A segunda, se deve a fundação da DadoBier em 1995, na cidade de Porto Alegre, que foi o primeiro bar-cervejaria do Brasil, com produção mais artesanal, e alta influência do mercado americano. Nos anos seguinte, novos bares-cervejarias seriam abertas em todo o Brasil.

O aumento significativo do consumo de cerveja no Brasil, e o início da competição do processo industrial com o artesanal, fez com que, em 1999, a Companhia Antarctica Paulista e a Companhia Cervejaria Brahma se fundissem, resultando no surgimento da Companhia de Bebidas das Américas (AmBev) (MORADO, 2017). Em breve, a AmBev se fundiria com a empresa belga Interbrew, tornando-se o maior grupo cervejeiro do mundo (MORADO, 2017).

Segundo dados da Euromonitor Internacional, divulgados pelo G1, o consumo de cervejas sofreu com quedas desde 2014, mas tem crescido a partir 2018, onde a venda foi estimada em 12,20 bilhões de litros por ano, passou a 12,63 bilhões de litros em 2019, 13,31 bilhões de litros em 2020, com projeções de 13,67 bilhões de litros para 2021. Nesse cenário, as marcas mais tradicionais ainda possuem o maior destaque, com Brahma e Skol dominando o mercado.

Na parcela das cervejas artesanais no mercado brasileiro, o Instituto da Cerveja do Brasil, em parceria com centenas de microcervejarias, o MAPA, e com associações regionais, fez um minucioso estudo publicado no ano de 2017. Esta investigação de 2 anos, revelou que o Brasil produziu cerca de 91 milhões de litros anuais de cerveja artesanal até 2015, o que é considerado apenas 0,7% do mercado geral de cervejas do país em 2017. No entanto, o Anuário da Cerveja do MAPA de 2020, demonstra que o mercado de cervejas artesanais tem apresentado um crescimento acelerado, com dados sobre registro de novas cervejarias perante o órgão. Neste documento, o MAPA mostrou que, no ano de 2020, o número de registros de estabelecimentos cervejeiros bateu a marca de 1383, 14,4% a mais que no ano anterior.

Os dados apresentados no Anuário da Cerveja de 2020, ressaltam como o mercado das cervejas artesanais no Brasil está em expansão, e tende apenas a crescer nos próximos anos, com destaque para a criação de novos estilos, a exemplo da Catharina Sour, primeiro estilo de cerveja totalmente brasileiro reconhecido e aceito pelo Beer Judge Certification Program (CATHARINA SOUR, 2021?), o cultivo de lúpulo em território nacional, que mesmo tendo crescido 110% de 2020 para 2021, ainda necessita de grandes volumes de importações, em consequência da alta demanda pela matéria prima (UOL, 2021), e a pesquisa sobre novas linhagens de leveduras para o mercado cervejeiro, com destaque para um estudo desenvolvido na USP, onde se catalogou, dentro de uma série de leveduras coletadas na biodiversidade de culturas do Brasil, uma levedura capaz de suportar

condições extremas de fermentação, apta a produção de cervejas, e trazendo a bebida complexidade de aroma e sabor (JORNAL DA USP, 2017).

### 3.1.3 Benefícios a saúde

De modo geral, o etanol apresenta benefícios comprovados a saúde quando administrado em doses de aproximadamente 15 gramas diárias para mulheres e 30 gramas diárias para homens, segundo a Organização Mundial da Saúde. Como apresentam Almeida-Pitito *et al.* (2013), em seu artigo “O lado saudável do consumo de bebida alcoólica”, publicado na revista USP, estudos referentes aos benefícios do consumo controlado de etanol são desenvolvidos desde 1986, quando Framingham, após acompanhar pacientes de ambos os sexos por 24 anos, encontrou relação entre mortalidade mais baixa por doença coronariana, quando consumidas doses de etanol recomendadas. Os mesmos autores ainda destacam que inúmeros estudos foram conduzidos na mesma proposta, investigando pacientes que consumiam etanol moderadamente por 12 a 20 anos, em comparação com os que se abstinham totalmente, sendo observadas taxas de mortalidade 10% a 15% menores nesses pacientes, assim como 30% a 40% menos chance de morte por problemas cardiovasculares.

Estudos como o INTERHEART, que englobou pacientes de 52 países, fizeram associações com o consumo moderado de etanol e a redução da ocorrência de infarto agudo do miocárdio (YUSUF *et al.*, 2004). Almeida-Pitito *et al.* (2013), ainda demonstram dados do Nurses’ Health Study, que em 26 anos de estudo, puderam assimilar menores risco de AVC hemorrágico ou isquêmico em mulheres que consumiam as doses diárias indicadas pela OMS, em comparação com as que se privavam do consumo. Além das inúmeras pesquisas relacionadas com os benefícios cardiovasculares do consumo de etanol, há também estudos que verificaram o menor risco de diabetes tipo 2 em pacientes que fazem o uso de doses recomendado de etanol (ANDRADE; OLIVEIRA, 2009).

Quando se trata de cerveja, a ingestão diária recomendada pela OMS se baseia na graduação alcoólica da bebida, ficando em torno de 350 mL para mulheres e 700 mL para homens, considerando uma porcentagem de 5% em volume de álcool. Siqueira *et al.* (2008) fazem um aprofundado estudo referente aos compostos benéficos presentes na bebida. Os autores, assim como a Associação

Brasileira da Indústria da Cerveja, apresentam que, além dos benefícios do etanol da bebida, a composição da cerveja é rica em selênio, silício, compostos fenólicos, sais minerais, e vitaminas do complexo B, como folatos e riboflavina. Essas substâncias conferem à cerveja propriedades anti-inflamatórias, melhora a circulação cerebral, aumenta o colesterol bom, diminui as incidências de AVCs, possui altas quantidades de ferro, em especial nas cervejas escuras, o que auxilia na oxigenação do corpo, e melhora a densidade óssea.

Os benefícios da cerveja são oriundos principalmente do malte e do lúpulo, variando de acordo com as quantidades e características dos insumos utilizados (ALMEIDA-PITITO *et al.*, 2013). Os compostos fenólicos, por exemplo, em especial os polifenóis e os prenilflavonóis, se encontram em grande parte no malte e no lúpulo, respectivamente (SIQUEIRA *et al.*, 2008). Estes compostos são os responsáveis pelas propriedades redox da bebida, influenciando no nível de lipídeos do plasma e, conseqüentemente, aumentando a capacidade anticoagulante do organismo (SIQUEIRA *et al.*, 2008). Autores como Almeida-Pitito *et al.* (2013) e Siqueira *et al.* (2008) citam com destaque o composto fenólico xanthohumol, presente na cerveja, e um agente inibitório de enzimas pró-inflamatórias e pró-carcinogênicas.

#### **3.1.4 Estilos de cerveja**

O Guia de Estilos de Cerveja do BJCP - Beer Judge Certification Program – trata-se de um itinerário sobre inúmeros estilos de cerveja artesanal, seguidos por toda a comunidade cervejeira, servindo como parâmetro para o produtor caseiro e como manual para importantes competições. Este guia descreve características sensoriais como aroma e sabor, os ingredientes característicos, parâmetros analíticos como percentual alcoólico e amargor, e ainda apresenta uma breve história sobre cada estilo.

As descrições apresentadas nesse manual serão adotadas como critério de comparação entre as cervejas fermentadas com leveduras convencionais, e com a *Sacch. cerevisiae var. boulardii* para os estilos abaixo, que fazem parte do presente estudo.

#### 3.1.4.1 *American lager (Pilsen)*

Pelas definições do guia BJCP (2015), o estilo lager possui alta carbonatação, coloração muito clara, sabor neutro e amargor baixo. Possui cor amarelo claro, com espuma branca límpida e pouco persistente. Seu aroma de malte é quase ausente, podendo remeter a granulado, doce ou milho assim como seu sabor. O aroma de lúpulo deve ser leve, com notas de condimento e floral, e é ideal que seu amargor ao paladar seja baixo. O importante nesse estilo é o equilíbrio suave entre o maltado e o amargo.

Ainda seguindo as orientações do BJCP para este estilo, a densidade-original (Original Gravity - OG) característica deve estar entre 1040-1050, a densidade-final (Final Gravity - FG) entre 1004-1010, o amargor em Unidades Internacionais de Amargor (International Bitterness Units - IBU) entre 8 e 18, o teor de etanol por volume (ABV) entre 4,2 e 5,3%, e a cor se fixa entre palha e amarelo, de acordo com Standard Reference Method (SRM) (BJCP, 2015).

#### 3.1.4.2 *Indian Pale Ale (IPA)*

Com uma cor dourado médio a leve âmbar-avermelhado, de espuma límpida e persistente, as cervejas do estilo IPA têm um intenso aroma de lúpulo com notas cítricas, floral, pinho, condimento, frutas tropicais e de caroço, entre outras. É interessante para o estilo apresentar aroma de lúpulo fresco e malte granulado-maltado, mas pouco ou nada de grama verde e/ou frutado de levedura. Igualmente presente no sabor, o lúpulo se destaca pela intensidade, conferindo intenso amargor à cerveja, refletindo no paladar as mesmas características citadas para o aroma. Tendo um final seco a meio seco, o malte deve ter um sabor leve de granulado-maltado, com possíveis notas suaves de caramelo ou tostado, mas com baixo a ausente dulçor. Sua carbonatação é média-alta, com pouca sensação alcoólica presente ao paladar (BJCP, 2015).

Os parâmetros analíticos de qualidade ficam entre 1,056 a 1,070 para OG, 1,008 a 1,014 para a FG, IBU entre 40 e 70, ABV entre 5,5 e 7,5%, e SRM de âmbar profundo a cobre (BJCP, 2015).



### 3.1.4.3 *Belgian Golden Strong Ale (BGSA)*

É um estilo de complexos aromas como éster de pera, maçã ou laranja, fenol apimentado, lúpulo floral, álcoois suaves, e um discreto malte granulado doce. As cervejas BGSA possuem cor dourada com espuma branca persistente, e características ao paladar muito similares às aromáticas. A alta carbonatação, o final seco e o perceptível calor alcoólico, o éster frutado, os fenóis e lúpulos picantes, o amargor marcante, e a sensação suave com relação aos álcoois, conferem alguns dos atributos desse estilo (BJCP, 2015).

Para que se enquadre como uma Belgian Golden Strong Ale, a cerveja deve apresentar OG entre 1,070 e 1,095, FG entre 1,005 e 1,016, teor alcoólico em 7,5-10,5%, cor de amarelo a ouro, e IBU de 22 a 35 (BJCP, 2015).

### 3.1.5 **Parâmetros legais da produção de uma cerveja**

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, conforme definido no art. 13, da Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, publicada no Diário Oficial da União, a cerveja deve ser constituída, obrigatoriamente por:

- I - água potável, conforme estabelecido em legislação específica do Ministério da Saúde;
- II - malte ou seu extrato, conforme definição do art. 4º, exceto para as bebidas definidas no art. 10, incisos III e IV;
- III - lúpulo ou seu extrato, conforme definição do art. 8º, exceto para a "cerveja gruit"(BRASIL, 2019, p.3).

Além disso, o art. 14 da mesma Instrução Normativa informa os ingredientes opcionais da cerveja, que são:

- I - adjuntos cervejeiros, conforme definição do art. 6º;
- II - ingredientes de origem animal, vegetal ou outros ingredientes aptos para o consumo humano como alimento, obedecidos os respectivos regulamentos técnicos específicos;
- III - levedura e outros microrganismos fermentativos utilizados para modificar e conferir as características típicas próprias da cerveja, desde que garantida sua inocuidade à saúde humana (BRASIL, 2019, p.3).

Ainda, conforme Decreto nº 9.902, de 8 de julho de 2019, art. 36, a fermentação é elemento primordial para a produção de cerveja, processo esse executado pela levedura, seja ela adicionada à receita, ou advinda dos cereais ou do próprio ambiente. De forma simplificada, a fermentação consiste no consumo da glicose presente no mosto pela levedura, que, por meio do metabolismo anaeróbio,

produz gás carbônico e álcool. De uma forma mais científica, pode-se afirmar que a fermentação é um processo no qual o receptor final de elétrons é um composto orgânico, sendo, neste caso, o acetaldeído.

A legislação apresenta âmbitos analíticos necessários aos produtos, a fim de garantir sua qualidade e padronização. Conforme estabelecido no Decreto nº 9.902, art. 36 de 8 de julho de 2019:

Cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro (BRASIL, 2019, p.1).

Com essa definição, a Instrução Normativa Nº 65, de 10 de dezembro de 2019 do Diário Oficial da União, apresenta nos artigos 7, 10, 11, 17 e 27, os padrões de identidade e qualidade obrigatórios das cervejas. O art. 19 do capítulo 5 da mesma Normativa, instaura que os parâmetros analíticos devem ser aplicados pelos métodos estabelecidos na Convenção de Cervejeiros da Europa – EBC, e no art. 22, que o aroma e sabor da bebida não devem ser estranhos, mas sim particulares do estilo proposto pela cervejaria. No art. 18, fica estabelecido que contaminantes microbiológicos não podem ser superiores aos já regulamentados pelos órgãos correspondentes.

Sendo assim, para que um produto seja caracterizado como cerveja, deve ser feito à base de malte de cevada ou outros cereais como adjunto, lúpulo, água e levedura. Deve também possuir extrato primitivo em peso maior que 5%, seu mosto deve ser constituído por, no mínimo, 55% de malte de cevada, e no máximo 45% de adjuntos cervejeiros. Além disso, deve apresentar graduação alcoólica acima de 2,0% em volume, a produção deve ter ocorrido sem a utilização de edulcorantes, e os aditivos e coadjuvantes utilizados devem ser autorizados e seguir as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Como padrão microbiológico, a Normativa considera que apenas a ausência de coliformes termotolerantes é significativo (BRASIL, 2019).

O Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, foi o primeiro a se referir integralmente a bebidas alcoólicas fermentadas em sua seção III. Nele eram estabelecidos mais alguns parâmetros legais como cor da cerveja, e tipo da fermentação, padrões que foram revogados em 2019, mas que ainda podem ser encontrados em alguns rótulos, e são bem quistos pela comunidade cervejeira.

## 3.2 ETAPAS DA PRODUÇÃO CERVEJEIRA DO PONTO DE VISTA METODOLÓGICO E BIOQUÍMICO

Para a fabricação de um produto de qualidade, há três processos operacionais principais de controle que devem ser seguidos:

1. Regulagem de temperatura, para evitar a desnaturação de enzimas primordiais ao processo, garantir o máximo de açúcares básicos fermentescíveis possível, e controlar o metabolismo fermentativo;
2. Baixo pH, para evitar ação bacteriana, assim como conferir os aromas particulares da cerveja por meio de compostos como álcoois, ésteres e compostos de enxofre;
3. Mensuração de densidade, para avaliar a cinética de fermentação;

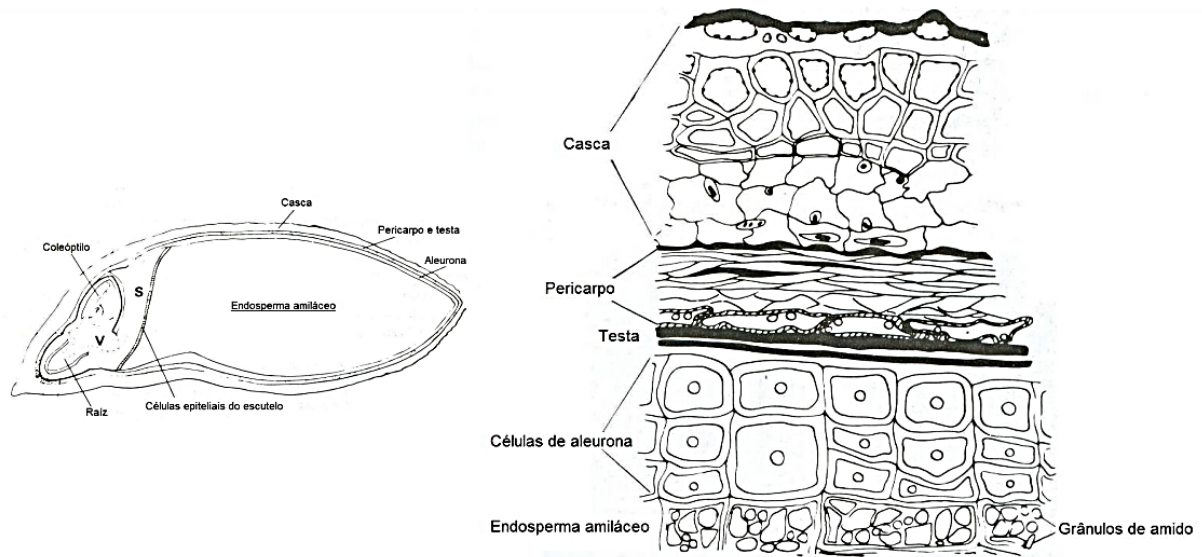
Esses controles operacionais devem ser seguidos até a elaboração completa de uma cerveja, que envolve um processo em cinco etapas básicas: malteação, mostura, fervura, fermentação e maturação (RIBEIRO, 2020; SIQUEIRA *et al.*, 2008).

### 3.2.1 Malteação

A primeira etapa é a *malteação*, técnica muitas vezes não realizada pelo cervejeiro, já que o malte é vendido pronto pelas maltarias, nas condições propostas para cada estilo de cerveja. Todavia, esse processo é de extrema importância para se produzir um malte de qualidade, pois baseia-se no fornecimento das condições adequadas ao grão para sua germinação, visando a liberação de enzimas de quebra do amido, e posterior secagem e/ou torrefação, para interromper a germinação em temperaturas definidas pelo estilo de cerveja proposto (MORADO, 2017; RIBEIRO, 2020; WHITE; ZAINASHEFF, 2020).

Na malteação, tradicionalmente é utilizado o grão de cevada (Figura 4), sendo possível também a utilização de trigo e aveia. No primeiro momento, esse grão passa pelo processo de maceração, onde ocorre o fornecimento de oxigênio e água, para despertar o grão da dormência (MORADO, 2017).

Figura 4 – Estruturas do grão de cevada



Fonte: Labgrãos (2021?)

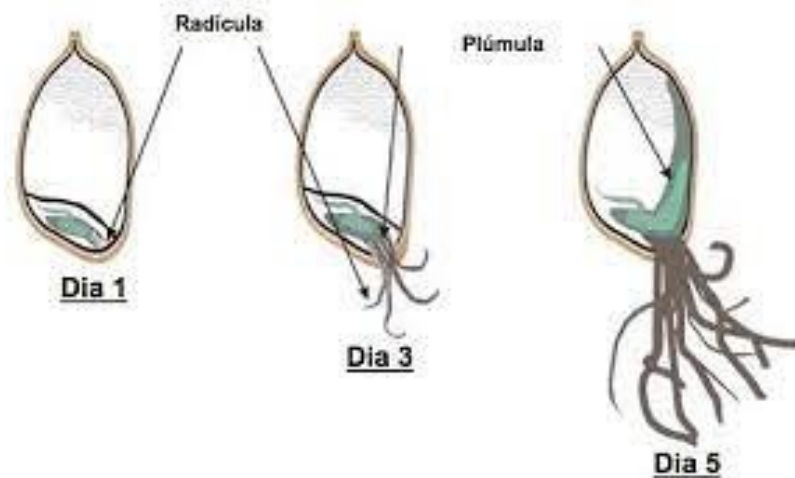
Posteriormente, ocorre a germinação controlada (Figura 5), momento no qual se forma a radícula e a acrospira no grão, como exibido na Figura 6 (MORADO, 2017), ocorrendo também, a produção de enzimas que degradam a parede celular do endosperma do grão,  $\alpha$ -amilases e  $\beta$ -amilases, que quebraram as grandes cadeias do amido presente no endosperma do grão em açúcares fermentescíveis, e de enzimas que quebraram as proteínas contidas no malte (RIBEIRO, 2020; WHITE; ZAINASHEFF, 2020). Nessa etapa, o tempo que o grão ficará germinando influenciará na disponibilidade de açúcar para a levedura, devendo-se tomar cuidado para que o amido não seja convertido inteiramente em açúcares simples, assim, permite-se que o cervejeiro controle posteriormente o grau alcoólico da cerveja (MORADO, 2017).

Figura 5 – Grão de cevada em processo de germinação



Fonte: Labgrãos (2021?)

Figura 6 – Formação da acróspira e da radícula



Fonte: Rodrigues; Moraes; De Castro (2015)

Por fim, o malte passa pela secagem altamente controlada através da circulação de ar quente, para evitar a total inativação das enzimas que serão necessárias na mostura (PALMER, 2017). Unido a secagem, é possível realizar a torrefação, que, de acordo com a intensidade dos dois processos - Figura 7, pode conferir ao malte colorações, aromas e sabores neutros, de caramelo, de cacau, de biscoito, de crosta de pão, e de café (MORADO, 2017; PALMER, 2017). A veemência com que a secagem e a torrefação são empregadas, influenciará diretamente na quantidade de enzimas que permanecerá viável para os processos a

seguir, mas também elimina umidade do grão, o que diminui os riscos de ataques fúngicos na armazenagem (MORADO, 2017).

Figura 7 – Intensidade de torras (malte de cevada)



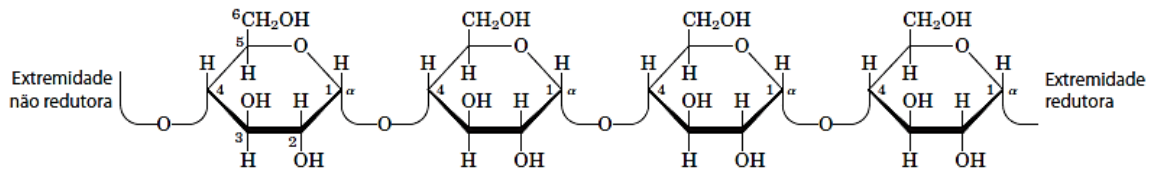
Fonte: Don Alcides (2018)

### 3.2.2 Mostura

O processo de *mostura*, é aquele que, através da adição de água ao malte, ocorre a total ativação das enzimas responsáveis pela quebra do amido e de proteínas, que serão a fonte de nutriente para a levedura durante a fermentação (RIBEIRO, 2020). Nessa etapa, é necessário ativar enzimas específicas através de rampas de temperatura controladas e particulares (RIBEIRO, 2020), sendo necessário também evitar que ocorra uma mostura acima de 72°C, pois isto acarreta na desnaturação proteica (MORADO, 2017; ROSA; AFONSO, 2014), tornando o mosto ainda rico em açúcares complexos, e conseqüentemente pouco fermentável.

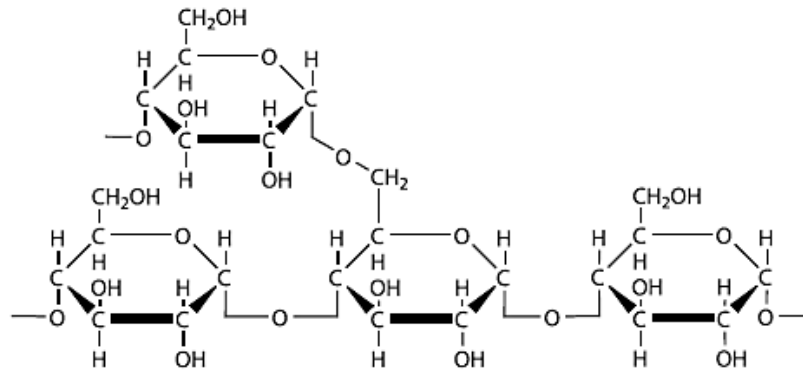
A molécula do amido é uma complexa e enorme cadeia formada por glicoses, ora colocadas de forma linear, as amiloses como na Figura 8, ora ramificadas, as amilopectinas, como representadas na Figura 9 (RIBEIRO, 2020). Contudo, o mosto cervejeiro está sendo preparado para a fermentação, papel desempenhado pela levedura, que possui a capacidade de consumir apenas açúcares mais simples, como monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos (PALMER, 2017 p. 87). Sendo assim, para uma cerveja de qualidade, é importante que no mosto haja concentrações maiores dos chamado açúcares fermentescíveis.

Figura 8 - Cadeia da amilose



Fonte: Nelson; Cox (2014)

Figura 9 – Cadeia da amilopectina



Fonte: Ribeiro (2020)

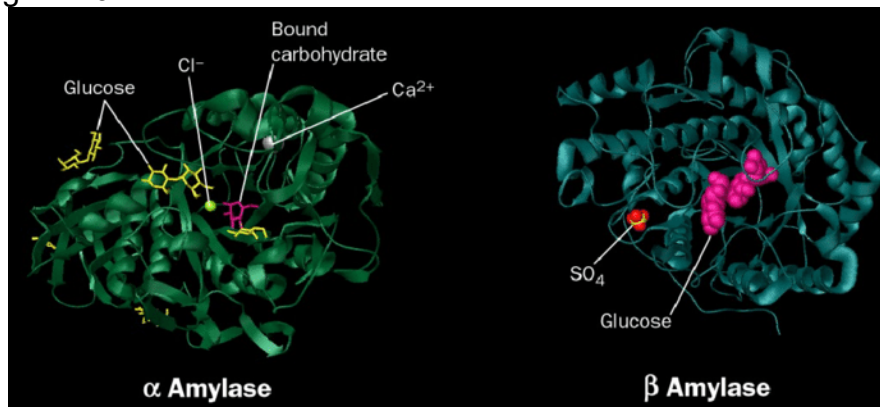
Durante a mostura, as rampas de temperatura, variações de temperatura por faixas de tempo ao longo do processo, são indispensáveis, para que as enzimas comecem a se solubilizar na solução, e para que ocorra a ativação de enzimas proteolíticas, e também das enzimas amilolíticas, como a  $\alpha$ -amilase e a  $\beta$ -amilase (MORADO, 2017; RIBEIRO, 2020). Morado (2017) expõe que, apesar de variar de cervejaria para cervejaria, algumas faixas de temperatura são amplamente empregadas, a fim de desempenhar funções diferentes. O autor apresenta que, temperaturas entre 40 a 45°C, favorece a ação de enzimas como as betaglucanases e as celulases, o que facilitara a solubilização do amido. Já entre a faixa de 50 a 55°C, ocorre o repouso proteolítico, onde há a quebra de algumas proteínas do malte, regulando a espuma e o brilho da cerveja. Entre 60 a 72 °C, as enzimas que atuam na hidrólise do amido são ativadas, o que determina o corpo da cerveja, sendo que, acima dessa temperatura, as enzimas começam a sofrer desnaturação, e o processo cessa estabilizando o mosto final.

Ribeiro (2020) esclarece como ocorrem as rampas de temperatura, que iram priorizar a ação das enzimas que hidrolisam o amido, e que são fundamentais para a produção da cerveja. A  $\alpha$ -amilase (Figura 10), que atua integralmente entre 65 e 75°C, quebra o amido em qualquer ponto de sua cadeia, de forma totalmente aleatória (Figura 11). Essa ação pode gerar alguns açúcares fermentescíveis, mas



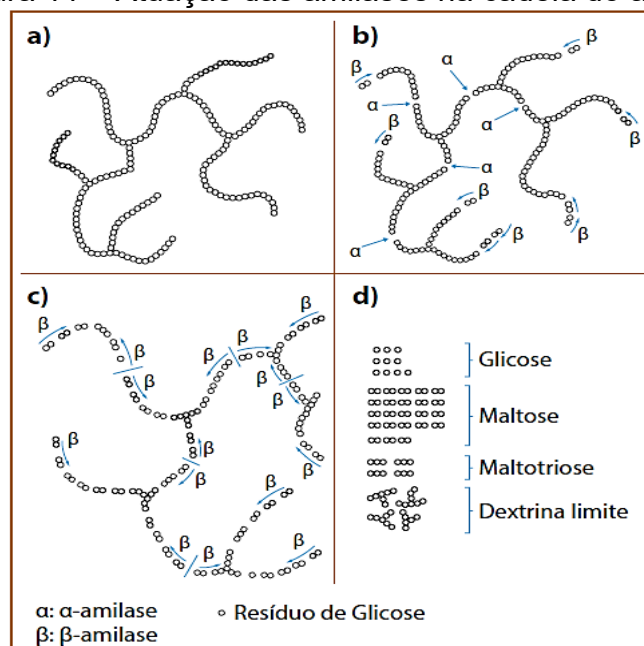
uma maior quantidade de dextrinas, açúcares menores, mas não consumidos pela levedura, que, quando priorizada essa faixa de temperatura, dá-se origem a uma cerveja encorpada, com dulçor residual, e pouco alcoólica. Já a  $\beta$ -amilase (Figura 10) atua melhor entre 60 a 65°C, quebrando o amido nas extremidades das cadeias, originando maiores quantidades de açúcares fermentescíveis (Figura 11) como a maltose, a glicose, e a maltotriose (SIQUEIRA *et al.*, 2008; MACEDO; BOLLINI, 2009). Quando priorizada a temperatura de ativação da  $\beta$ -amilase, a cerveja terá um caráter mais seco, e com maior teor alcoólico. Portanto, para um produto de características equilibradas, as faixas de temperatura empregadas devem permitir a boa atuação das duas enzimas.

Figura 10 – Estrutura molecular das enzimas de hidrólise do amido



Fonte: Nelson; Cox (2006)

Figura 11 – Atuação das amilases na cadeia do amido



Fonte: Ribeiro (2020)



Dentro da indústria cervejeira, durante o processo de mostura, há um método desenvolvido para compreender quando o processo foi efetivo. O *teste do iodo* consiste na retirada de algumas gotas do mosto cervejeiro em parcelas de tempo, para misturá-lo com tintura de iodo a 2%. Quando a partir dessa mistura é detectada a coloração azul escura, assume-se que o processo ainda não foi efetivo, e partir do momento que se verificar uma coloração alaranjada, considera-se que a hidrólise foi completa (UFPB, 2017). Essa comparação pode ser visualizada na Figura 12. Segundo publicação do Laboratório Didático de Bioquímica da Universidade Federal da Paraíba (2017), como o amido é composto por amiloses e amilopectinas, que são polissacarídeos de alto peso molecular, elas estão sujeitas a reações de complexação, formando compostos coloridos. Conforme verificou a pesquisa, quando ainda há presença de muitos açúcares complexos no mosto, a coloração da solução fica azul pois o iodo fica aprisionado nas cadeias de amilose e amilopectina. No momento em que a hidrólise do amido estiver completa, a coloração será a cor característica do iodo, já que as reações de complexação não ocorreram mais de maneira intensa.

Figura 12 – Teste do iodo



Fonte: Concerveja (2016)

Por fim, para finalizar a mostura, ocorre o processo conhecido como Mash Out, onde a temperatura do mosto é elevada em torno de 78°C, com o objetivo principal de desnaturação enzimática, a fim de estabilizar o mosto que já sofreu a hidrólise necessária (RIBEIRO, 2020).

### 3.2.3 Fervura

Depois da mostura, é realizada uma filtração simples do mosto, para retirada principalmente da casca do malte, assim como uma posterior lavagem desses bagaços, a fim de extrair os açúcares fermentescíveis que ainda está embebido nas cascas (mosto secundário), melhorando o rendimento do processo (MORADO, 2017; ROSA; AFONSO, 2014). Em seguida, o mosto primário é misturado ao mosto secundário, e ocorre a *fervura*, processo que dura normalmente de 60 a 90 min, onde, parcelas de lúpulos, nas formas apresentadas na Figura 13, e de aditivos, quando vinculadas à receita, são adicionados gradativamente (PALMER, 2017).

Figura 13 - Lúpulo *in natura* e em pellets



Fonte: Cerveja da Casa (2018)

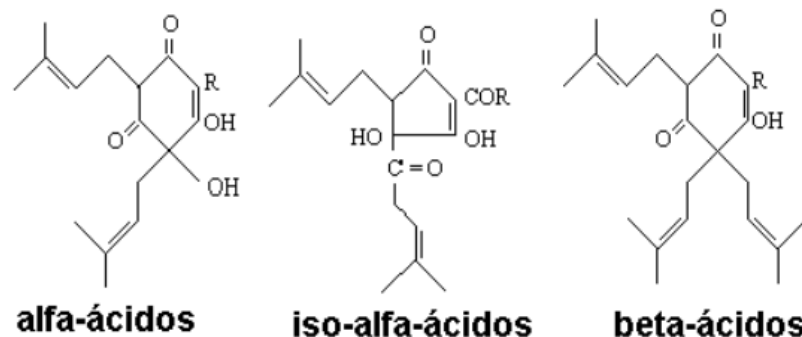
A fervura tem por objetivos principais a inativação das enzimas que ainda podem estar agindo, e assim estabilizar a composição do mosto, esterilizá-lo para evitar ação de outros microrganismos durante a fermentação, evaporar compostos que conferem sabores e aromas indesejáveis por meio da volatilização, liberar os  $\alpha$ -ácidos presentes no lúpulo, que serão responsáveis pelo amargor e parte do aroma da bebida, assim como promover reações de caramelização, que influenciarão na

cor e no aroma da cerveja (MORADO, 2017; RIBEIRO, 2020; ROSA; AFONSO, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2008).

Palmer (2017), no quarto capítulo de seu livro *How to Brew*, traz o quanto à fervura é importante para se iniciar a fermentação, apresentando as reações de Maillard, que são responsáveis por parte da cor e sabor da cerveja, e são afetadas pelos ingredientes iniciais da bebida, pela temperatura da fervura, e pelo tempo total do processo. As reações de Maillard são ligações químicas de açúcares simples e aminoácidos, que acabam por gerar melanoidinas e compostos heterocíclicos, responsáveis por conferir cheiros e sabores em qualquer processo de cozimento (PALMER, 2017).

Também de extrema relevância durante a fervura está a adição de lúpulo, que de acordo com o estilo da cerveja, pode ocorrer durante todo o processo, ou apenas em um momento, o que irá definir a intensidade do amargor da cerveja (RIBEIRO, 2020 p. 36). Durante a fervura, o lúpulo expele seus  $\alpha$ -ácidos (Figura 14), que entram em solução, e são os provedores do amargor da cerveja (ROSA; AFONSO, 2014). Um acréscimo aromático também advém do tipo de lúpulo utilizado, dado seus óleos essenciais (ROSA; AFONSO, 2014) e polifenóis (MORADO, 2017), igualmente liberados durante a fervura do mosto. Além das qualidades sensoriais e de conservação, a presença do lúpulo na cerveja também confere a ela quantidades significativas de vitaminas C e D (MORADO, 2017), assim como um potencial antioxidante (SIQUEIRA *et al.*, 2008; MACEDO; BOLLINI, 2009).

Figura 14 – Estrutura química dos compostos presentes no lúpulo



Fonte: Centro de Tecnologia Senai - Alimentos e Bebidas (2021?)

### 3.2.4 Fermentação

Logo após a fervura, o mosto deve ser resfriado, e é realizada a inoculação da levedura específica ao estilo, para que aconteça a *fermentação*. Nessa etapa, é importante garantir que as quebras enzimáticas ocorridas nos processos anteriores tenham sido efetivas, pois se houver maiores quantidades de açúcares complexos do que simples, a levedura não terá capacidade de fermentar adequadamente.

Dentro do processo cervejeiro, para a produção do etanol, é necessário que a levedura esteja em condições de anaerobiose. Porém, no primeiro momento do processo, Palmer (2017), Ribeiro (2020) e White & Zainasheff (2020) alegam que é imprescindível que haja uma quantidade de oxigênio no ambiente, pois as leveduras precisam sintetizar ácidos graxos insaturados e esteróis que são necessários na formação e conservação de suas membranas celulares, processo possível apenas em aerobiose, e que permite sua reprodução adequada. Ribeiro (2020) também traz que, a falta de oxigenação no mosto faz com que as leveduras não produzam o acetil-CoA, coenzima responsável por iniciar a biossíntese desses ácidos graxos, e produzida apenas no ciclo de Krebs.

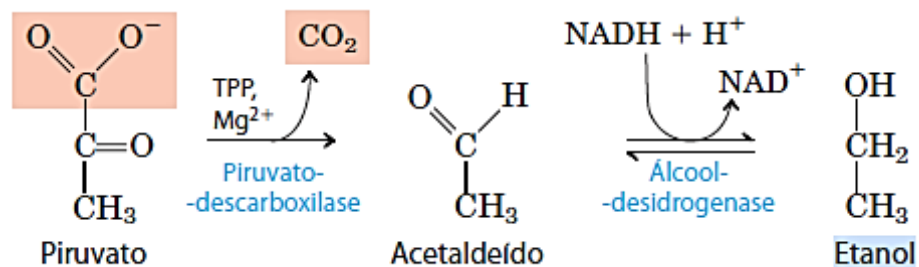
Como apresentado por Palmer (2017), em seu livro *How to Brew*, os açúcares presentes no mosto cervejeiro, por ordem decrescente de concentração são maltose, dextrinas, maltotriose, glicose, sacarose e frutose. Além de açúcares, o mosto cervejeiro ainda é rico em proteínas coaguladas, aminoácidos e peptídeos livres, e substâncias de aromas advindos do malte e do lúpulo, todos em concentrações adequadas para que o processo ocorra de maneira saudável (RIBEIRO, 2020). Um problema possível quando há pouca quantidade de aminoácidos livres, por exemplo, é um estresse fermentativo por falta de cofatores, o que resulta em uma fermentação lenta, e a produção de sabores e aromas desagradáveis (RIBEIRO, 2020).

Com a aeração adequada do mosto, inicialmente as leveduras oxidam o piruvato em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O para se reproduzirem rapidamente e aumentar a permeabilidade e transferência de nutrientes de suas membranas. (SIQUEIRA *et. al*, 2008; WHITE; ZAINASHEFF, 2020). Após a fase de crescimento, as leveduras passam a consumir os açúcares mais simples do mosto, começando pela glicose, frutose e sacarose, passando pela maltose, e em seguida a maltotriose (PALMER, 2017). Elas realizam essa síntese por meio da difusão facilitada, onde os açúcares

passaram para dentro da célula, onde enzimas sintetizadas pela própria levedura fazem a quebra das cadeias dos dissacarídeos e dos trissacarídeos, que entraram como glicose na via glicolítica, para dar início a fermentação (UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, 2018; WHITE; ZAINASHEFF, 2020).

Na fermentação alcoólica, Ribeiro (2020) e Tortora (2017) seguem elucidando que há formação de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido (NADH), carregadora de elétrons, de Adenosina Trifosfato (ATP), e de piruvato. Em condições de privação de oxigênio, este último é convertido em CO<sub>2</sub> e acetaldeído pela enzima piruvato-descarboxilase. Finalmente, a enzima desidrogenase alcoólica transforma o acetaldeído no produto pretendido, o etanol, pela concomitante redução do acetaldeído e oxidação do NADH. Nesta reação, a molécula de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidado (NAD<sup>+</sup>) precisa ser regenerada, processo que, em anaerobiose, ocorre durante as reações de produção do etanol. Além dos produtos principais da fermentação alcoólica, há formação de produtos secundários durante todo o processo. Dentre estes subprodutos estão o acetaldeído e as dicetonas vicinais (diacetil); ácidos cítrico, acético, propiônico, pirúvico, succínico e axaloacético; acetatos de isoamila, etila e n-propila; dimetil sulfito e dióxido de enxofre; álcoois superiores como 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol (ROSA; AFONSO, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2008; MACEDO; BOLLINI, 2009).

Figura 15 – Processo de fermentação alcoólica



Fonte: Nelson; Cox (2014)

Tortora (2017) demonstra que as coenzimas reduzidas, em especial o NADH, transferem os elétrons do processo para o piruvato e derivados, que são considerados os aceptores finais de elétrons. Eles serão então reduzidos ao produto principal da fermentação, o etanol, assim como a subprodutos. Os autores ainda ressaltam que o processo de fermentação alcoólica possui baixo rendimento

energético, já que o acceptor final de elétrons não é uma molécula de O<sub>2</sub>, como no metabolismo aeróbio, com geração de apenas duas moléculas de (ATP) por molécula de glicose.

Para regular adequadamente todo esse processo de fermentação, os cervejeiros desenvolveram alguns parâmetros a serem seguidos, tais como a genética da levedura, que deve ser de bom fornecedor, fresca, refrigerada e hidratada corretamente; a temperatura em que o processo acontece, pois a fase de crescimento celular gera calor, fazendo com que a levedura produza substâncias indesejadas, causando dormência e até morte celular; o tempo de fermentação, que deve ser suficiente para a atenuação do mosto; e a pressão de ar dentro do fermentador, controlada por algum equipamento para que não interfira no metabolismo da levedura, e nem prejudique o produto final (MORADO, 2017; PALMER, 2017; RIBEIRO, 2020).

### 3.2.5 Maturação

Depois de fermentar o mosto, se faz necessária a *maturação* por fatores como o consumo dos açúcares residuais pela levedura, a absorção de compostos indesejáveis a cerveja, emprego do frio para dificultar a proliferação de microrganismos, carbonatação natural e decantação das leveduras para clarificação da bebida (MORADO, 2017; RIBEIRO, 2020; ROSA; AFONSO, 2014). Esse processo necessita de tempo, em torno de 6 a 30 dias, dependendo do estilo da cerveja, para que a levedura consiga desempenhar integralmente seu papel, e para que o frio preserve as características sensoriais desejadas (RIBEIRO, 2020; ROSA; AFONSO, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2008; MACEDO; BOLINI, 2009).

É na etapa da maturação que se deve acrescentar os condimentos, vinculados ao estilo e à receita (MORADO, 2017). É também nesse momento que se efetua o processo conhecido como Dry Hopping, onde é acrescentado lúpulo ao mosto, por meio da infusão a frio, com o objetivo de intensificar o aroma e o amargor da cerveja, assim como trazer frescor à bebida (MORADO, 2017).

Durante a fermentação, além do etanol e do gás carbônico, a levedura produz naturalmente outros compostos, alguns deles conhecidos como *off-flavors*, que vão conferir aromas e sabores desagradáveis à bebida. Alguns exemplos desses são o acetaldeído, que gera forte sabor de uvas e/ou maçã verde (RIBEIRO, 2020;

PALMER, 2017), e o diacetil que conferem características amanteigadas à cerveja (RIBEIRO, 2020; PALMER, 2017). Pequenas quantidades de alguns desses compostos é considerável aceitável no produto final, sendo que alguns estilos inclusive exigem as características sensoriais transmitidas por estes compostos (MORADO, 2017). No entanto, para que esses *off-flavors* não ultrapassem os limites, é na maturação que eles são reduzidos a níveis desejáveis, tornando a cerveja uma bebida agradável.

Logo após a fermentação, a maioria dos açúcares fermentescíveis foram consumidos, muitas células de levedura ainda estão ativas em suspensão, e estas necessitam de uma alternativa de alimento para continuar sua reprodução (PALMER, 2017). Então, inicialmente a levedura consome uma boa parte do açúcar residual que possa permanecer na cerveja em uma fermentação secundária, e em seguida elas iniciam o processo de “limpeza” da bebida, consumindo grande parte dos compostos indesejáveis produzidos por elas mesmas, tais como acetaldeído, diacetil e compostos sulfurados (ROSA; AFONSO, 2014).

Normalmente, a maturação é dividida em duas etapas. Em primeiro lugar, na etapa quente, ocorre a quebra enzimática do diacetil e seu consumo pela levedura, a redução do acetaldeído em álcoois simples, assim como a absorção de outros subprodutos indesejáveis (PALMER, 2017; RIBEIRO, 2020; ROSA; AFONSO, 2014). Na etapa de frio, as leveduras sofrem decantação, resultando na clarificação da bebida, estabilizando-a e prevenindo futuras oxidações (PALMER, 2017; RIBEIRO, 2020; ROSA; AFONSO, 2014). Sensorialmente concluída, a cerveja pode ser engarrafada e vendida.

### **3.2.6 Análises da cerveja**

Para garantir as exigências legais apresentadas na seção 3.1.4, e garantir que a bebida produzida possa ser comercializada como cerveja, devem ser realizadas análises físico-químicas, que são descritas abaixo.

### 3.2.6.1 Análises físico-químicas

#### 3.2.6.1.1 Densidade relativa

A densidade relativa da cerveja determina, basicamente, o quão efetiva foi sua fermentação. Como retratado por Morado (2017), em seu livro Larousse da Cerveja, no momento da mostura, o amido presente no malte é liberado e quebrado em açúcares fermentescíveis e não fermentescíveis, aumentando a densidade do mosto. Partindo do valor de densidade padrão da água ( $1 \text{ g/cm}^3$ ), considera-se que, quanto mais alta a densidade inicial do mosto, maior a quantidade de açúcares fermentescíveis presente nele (MUXEL, 2016). Sendo assim, como a levedura consumirá esses açúcares e produzirá etanol, a densidade final da cerveja deve estar relativamente mais baixa que sua densidade inicial, determinando quanto açúcar foi consumido, e conseqüentemente o teor alcoólico da cerveja (MORADO, 2017).

#### 3.2.6.1.2 Extratos original, real e aparente

Como determinado pelo MAPA (BRASIL, 2019, p. 2), na Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, o extrato original é definido como “a quantidade de substâncias dissolvidas (extrato) do mosto que deu origem à cerveja e deve ser sempre maior ou igual a 5,0% em peso”, ou seja, é a quantidade de substâncias solubilizadas antes de iniciar a fermentação. Já o extrato aparente refere-se à quantidade de extrato durante a fermentação, não levando em conta o erro analítico causado pela diferença de densidade entre a água e o álcool (JÚNIOR *et al.*, 2009). Quando se trata do extrato real, este também quantifica o extrato durante a fermentação, porém, já com a correção analítica necessária, dada a presença do álcool (JÚNIOR *et al.*, 2009). Em grande parte, esses extratos são açúcares, ou seja, quantificá-los permite compreender qual a disponibilidade de alimento para a levedura, assim como a produção de etanol de acordo com o consumo desses extratos, durante a fermentação (HENDGES; HENDGES, 2019).



### 3.2.6.1.3 Graduação alcoólica

Pela legislação brasileira, quando a graduação alcoólica da cerveja estiver acima de 0,05%, esta informação deve estar no rótulo do produto (MAPA, 2019). Ela é altamente influenciada pela mostura, quando enzimas são liberadas, em rampas de temperatura específicas, quebrando o amido em dextrinas e açúcares fermentescíveis (RIBEIRO, 2020, p. 35). Se há maior presença de dextrinas, o mosto é pobre em alimento para a levedura, e conseqüentemente o teor alcoólico da cerveja será menor, conferindo ao produto corpo e dulçor (RIBEIRO, 2020, p. 74). Já quando a mostura priorizar a quebra em açúcares fermentescíveis, a cerveja terá mais álcool, e um caráter seco (RIBEIRO, 2020). Portanto, a graduação alcoólica se refere a qualidade da mostura e da fermentação, demonstrando quanto açúcar estava presente no mosto, e quanto álcool a levedura conseguiu produzir por volume de produto (HENDGES; HENDGES, 2019).

### 3.2.6.1.4 Cor

A cor da cerveja é um parâmetro que, em 2019, foi revogado perante a lei, porém, ainda é comum encontrá-la nos rótulos, por ser muito característica do estilo de malte utilizado e de sua torrefação. O European Brewing Convention, ou EBC, é como se padroniza a cor da cerveja, método desenvolvido pelo British Brewing Institute, com cerca de 20 escalas de cores visuais (VERONESE, 2017). Há ainda um método analítico de definição de cor da cerveja, realizado por meio espectrométrico em comprimento de onda de 430 nm, seguindo a Fórmula 1:

$$C = 25 \cdot A_{430} \cdot f$$

Sendo C o comprimento de onda em EBC, 25 o fator de multiplicação, A<sub>430</sub> a absorbância, e f o fator de diluição (EBC, 2010).

### 3.2.6.1.5 Calorias

Segundo Mark Eurich, presidente do comitê técnico da America Association of Brewing Chemists, as calorias de uma cerveja provém das proteínas, do etanol, e

dos carboidratos, advindos do malte utilizado no processo de fabricação da bebida. Especialmente o etanol, a cada grama consumida, é capaz de fornecer 7,1 kcal ao indivíduo, nutrindo até 10% das necessidades calóricas diárias, quando ingerido em quantidade recomendadas (GUIMARÃES *et al.*, 2013). Sendo assim, se o objetivo é a produção de uma bebida com apelo mais saudável e nutricional, compreender o percentual calórico de diferentes estilos de cerveja permite uma observação detalhada das vantagens e desvantagens do produto.

#### 3.2.6.1.6 Amargor

O amargor característico de uma cerveja advém, principalmente, de compostos conhecidos como iso- $\alpha$ -ácidos, presentes no lúpulo, e isomerizados durante o processo de fervura (ALMAGUER, 2014). Moritz e Morris (1981) atribuem ao lúpulo diferentes características da cerveja, tais como sensoriais, a exemplo do sabor e do aroma, microbiológicos, auxiliando na esterilização do mosto, e atribuindo um efeito bactericida a bebida, e físico-químicos, precipitando determinados compostos nitrogenados do mosto, e agindo como um agente clarificante. Alguns autores ainda indicam que o amargor pode advir de outras fontes, como Hough (1961), que determina a influência do tipo de levedura utilizada, assim como Laws (1972), que categoriza também a interferência do método de fermentação. Como forma de quantificar numericamente o amargor da cerveja, as instituições oficiais americana e europeia aceitam o padrão de Internacional Bitterness Units (IBU), que pode ser determinado por método espectrofotométrico (HOWARD, 1968), por meio de cálculos que consideram a quantidade de lúpulo utilizado na receita, a sua porcentagem de  $\alpha$ -ácidos, a densidade antes da fervura, e o tempo da mesma (DINSLAKEN, 2016), ou então por softwares como Beer Smith, que se baseiam em cálculos como o citado anteriormente.

#### 3.2.6.1.7 pH

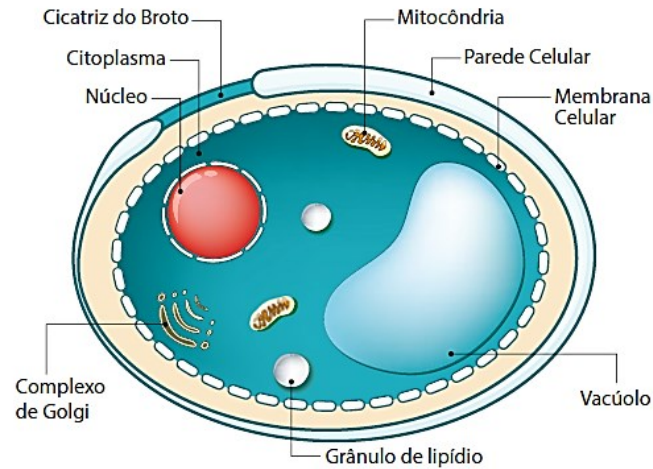
Em todo o processo de elaboração de uma cerveja, o controle de pH é um dos parâmetros de grande importância. Na grande maioria das localidades, o pH da água é neutro, girando em torno de 7, dado a quantidade de carbonato dissolvido nela, conferindo-a a propriedade de tampão (HOMINI LÚPULO, 2018). No processo

de mosturação, por exemplo, ao acrescentar o malte a água, o pH tende a se tornar mais ácido, isto por que o malte tem alta concentração de fosfatos que reagem com os minerais da água, e liberam íons  $H^+$  (HOMINI LÚPULO, 2018). Essa pequena acidificação é indispensável, já que, as enzimas que transformam o amido em açúcares fermentescíveis, possuem faixas muito específicas de pH e temperatura para sua ativação (HENDGES; HENDGES, 2019, p.86). O pH durante a elaboração da bebida ainda influencia na cor da cerveja final, no amargor e na extração de proteínas, que são importantes para a estabilidade da espuma (HENDGES & HENDGES, 2019, p.86). A partir da fermentação, até o produto finalizado, sempre é recomendado que o pH se mantenha abaixo de 4,5, a fim beneficiar a propagação das leveduras, assim como de evitar contaminações, especialmente bacterianas (ROSA; AFONSO, 2014).

### 3.3 LEVEDURAS

As leveduras são microrganismos unicelulares pertencentes ao Domínio *Eukarya*, Reino *Fungi*, que se reproduzem por brotamento ou gemulação, e de forma mais acelerada que outras espécies deste reino (CARVALHO *et al.* 2006; PRIEST; STEWARTS, 2006). Geralmente diferenciadas entre si pelas características fisiológicas que apresentam, já que a morfologia das espécies é muito similar, as leveduras são células com parede celular rígida, membrana celular formada por uma bicamada lipídica, e DNA encapsulado no núcleo celular, tal como ilustrado na Figura 16 (CARVALHO *et al.* 2006; RIBEIRO, 2020).

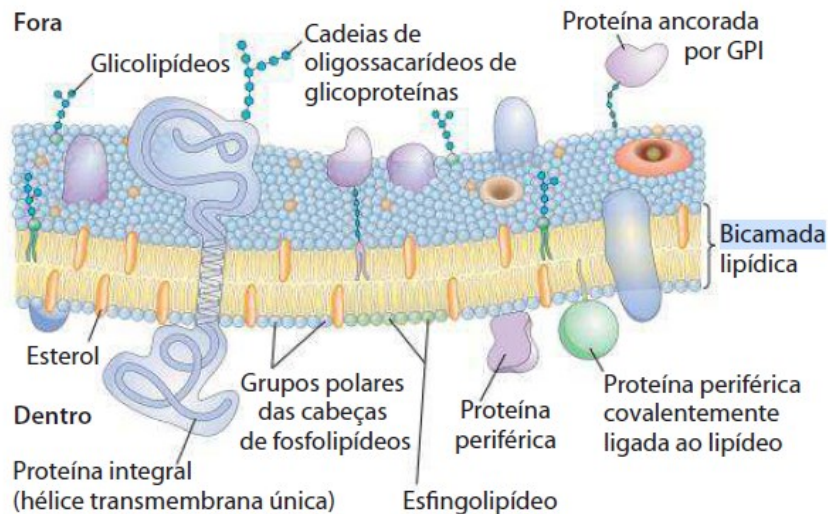
Figura 16 – Célula de levedura



Fonte: Ribeiro (2020)

Dentre os componentes de uma levedura, é a membrana plasmática que define quais substâncias entram ou saem da célula (RIBEIRO, 2020). A membrana é formada por uma bicamada lipídica, que são moléculas com uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, sendo assim semipermeável, onde fixam-se proteínas sinalizadoras que registram a presença de um açúcar fermentescível, e permitem sua entrada na célula, onde este será quebrado, quando necessário, e metabolizado (Figura 17). As mesmas proteínas sinalizadoras de membrana registram a presença de produtos residuais dentro da célula, e permitem também que ela os excrete (RIBEIRO, 2020; PALMER, 2017).

Figura 17 – Modelo de mosaico fluido para a estrutura da membrana plasmática



Fonte: Nelson; Cox (2014)

Como demonstra Palmer (2017), a levedura apresenta quatro etapas, obedecendo a curva de crescimento microbiano, iniciando pela Fase Lag que pode durar de 12 a 24 horas, onde a levedura passa a se adaptar às condições ambientais, muitas vezes utilizando suas próprias reservas de glicogênio, e o oxigênio dissolvido disponível, para sintetizar esteróis e ácidos graxos que formaram as membranas celulares das células-filhas, e gerenciaram seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de nutrientes. Em seguida há a Fase Exponencial que dura de 1 a 5 dias, onde a levedura passa a consumir os açúcares fermentescíveis do mosto, se reproduzindo rapidamente, e fermentando vigorosamente. É nessa etapa que a maioria dos compostos aromatizantes e de sabor da cerveja são formados, sendo necessário um controle rígido de temperatura, que, quando muito baixa, causa pouca fermentação por uma inércia celular, ou quando mais elevada, resulta em uma fermentação descontrolada, o que pode trazer aromas e sabores desagradáveis. Nos dois casos pode haver a formação de compostos indesejáveis. Há uma outra fase denominada desaceleração, que corresponde à saída da fase exponencial. Por fim, a levedura entra na fase estacionária, podendo durar de 4 a 12 dias, de acordo com o estilo da cerveja. Nesse momento, a levedura ainda está ativa, porém com baixa capacidade de brotamento. Há muitos subprodutos de seu metabolismo no mosto, que serão novamente absorvidos por estas células, como melhor exemplificado no item 3.2.5 da seção 3.2. Depois de consumir parte dos subprodutos, a levedura passa a Fase de Morte, formando flocos que se sedimentam, e são retirados ou não do produto final.

É importante salientar que, por serem organismos vivos, as leveduras possuem condições específicas para sobrevivência e proliferação. Portanto, dentro da indústria cervejeira, algumas condições são importantes (CARVALHO *et al.*, 2006; RIBEIRO, 2020):

- Genética da levedura: escolha da melhor cepa para trabalhar com um mosto de determinadas características, e para obter os aromas e sabores desejados;
- Qualidade do fornecedor: diz respeito ao quanto a produção da levedura é controlada, estando ela dentro do prazo de validade, o mais fresca possível, e mantida resfriada durante todo tempo de acondicionamento;

- Disponibilidade nutricional do mosto: a levedura necessita de um mosto com qualidade de açúcares fermentescíveis, aminoácidos, minerais e uma variedade de íons metálicos, pois são fatores que afetam na fermentação e que, se não bem regulados, resultam em *off-flavors*;
- Condições físicas: a levedura, assim como as enzimas, atua em faixas muito específicas de pH e temperatura, que quando empregados nos extremos, causa a produção de compostos indesejados e, em casos extremos, até a morte celular.

As principais leveduras cervejeiras são as do gênero *Saccharomyces*, no entanto, também é possível fermentar produtos sensorialmente únicos com outras linhagens de levedura. Geralmente, a fermentação não ocorre com leveduras de gêneros selvagens, pois apenas estilos muito específicos comportam os compostos produzidos por elas que, na maioria dos casos, entram na bebida como contaminantes, desencadeando formação de película na cerveja, desprendimento de odores e sabores desagradáveis, desvio de atenuação e turbidez excessiva (CARVALHO *et al.*, 2006; PRIEST; STEWARTS, 2006).

### 3.3.1 Identificação microbiológica na cerveja

Foi em 1789, que o cientista Antoine-Laurent Lavoisier conseguiu concluir que a fermentação se baseava na transformação do açúcar em dióxido de carbono e etanol, mas não compreendeu que esse processo era realizado pela levedura (WHITE; ZAINASHEFF, 2020). Mas em 1848, o cientista Louis Pasteur, já reconhecido na área química, se interessou pela fermentação, estudando os isômeros ópticos dos cristais de tartarato advindos de vinhos (SMITH, 2012). Com este trabalho, ele concluiu que a assimetria dessas moléculas só poderia ser explicada pela ação de organismos vivos, já que reações químicas deveriam originar cristais simétricos (SMITH, 2012; TORTORA *et al.*, 2017). Em 1857, pesquisando sobre a fermentação láctica, Pasteur detectou a presença de diversas moléculas complexas, que, segundo ele, apenas um processo de organismos vivos seria capaz de gerá-las, concluindo que a fermentação era obra biológica, e não química (SMITH, 2012). Entre a mesma época, acreditava-se na teoria da geração espontânea, que dizia que o próprio ar causava a fermentação, e as leveduras eram produzidas nesse processo. Com o experimento de fermentação “pescoço de cisne”,

Pasteur desenvolveu um meio mineral esterilizado, que ficou contido dentro de um frasco com uma boca de pescoço de cisne, que permitia a passagem de ar, mas não de poeiras, que continham microrganismos. Quando a poeira não alcançou o meio, não houve fermentação, assim, descartando a teoria de geração espontânea (WHITE; ZAINASHEFF, 2020).

Na indústria cervejeira, a contribuição de Pasteur foi advinda de seus recentes estudos e descobertas sobre a fermentação, quando um cervejeiro que estava tendo problemas com a sua produção, contratou o cientista para auxiliá-lo (SMITH, 2012; TORTORA *et al.*, 2017). Ao analisar o mosto em microscópio, Pasteur identificou uma estrutura em forma de glóbulos esféricos, e outra em forma de bastões (SMITH, 2012). Além disso, ele isolou álcool amílico, substância que, segundo Pasteur, não poderia ser obtida da degradação de álcool etílico. Desse modo, concluiu que havia algo além das leveduras, uma contaminação, que era responsável por converter o etanol em ácido acético, deteriorando o mosto (ROSENDO, 2016).

Seguindo o conhecimento já definido de que altas temperaturas inibiam o metabolismo dos microrganismos, Pasteur compreendeu que, para descontaminar o mosto, o mesmo deveria ser aquecido até uma temperatura que não afetasse as propriedades da bebida, mas que garantisse a extinção microbiológica de organismos patogênicos (ROSENDO, 2016). Dessa forma, nasce a Pasteurização, um tratamento térmico de baixa intensidade, onde o mosto é aquecido em temperaturas mais baixas, por um período de tempo mais longo, preservando as propriedades organolépticas da bebida, mas conferindo a ela uma estabilidade microbiológica (eliminando microrganismos patogênicos), para a posterior inoculação de flora selecionada e controlada (MAIA, 2012). Essa técnica é aplicada até hoje na indústria cervejeira, vinícola e de laticínios (TORTORA *et al.*, 2017).

### **3.3.2 Leveduras cervejeiras**

No processo cervejeiro, as leveduras mais utilizadas, dada sua eficiência, são as do gênero *Saccharomyces* (TORTORA *et al.*, 2017) sendo que duas espécies se destacam por suas habilidades fermentativas. As cervejas *ale*, ou de alta fermentação, são assim categorizadas pela fermentação com linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabalhando entre as temperaturas de 15°C e 25°C,

essas linhagens de leveduras de topo produzem cervejas mais alcoólicas, dado sua maior tolerância ao etanol e as mudanças de pH durante a fermentação. Já as cervejas *lager*, ou de baixa fermentação, sofrem ação de linhagens de *Saccharomyces pastorianus*, que trabalham na faixa de temperatura de 9°C a 15°C, com fermentação mais demorada, e produzindo estilos de cerveja mais suaves (CARVALHO *et al.*, 2006; MORADO, 2017; PIMENTA *et al.*, 2020; TORTORA *et al.*, 2017).

Apesar de menos comum, é possível realizar as chamadas fermentações naturais com leveduras do ambiente e até mesmo bactérias fermentativas. Os gêneros selvagens mais comuns são *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora* e *Issatchenkia*, que em geral, produzem compostos fenólicos, que conferem um sabor frutado à cerveja (CARVALHO *et al.*, 2006; MORADO, 2017; PRIEST; STEWARTS, 2006). O gênero *Brettanomyces*, por exemplo, que pode formar quantidades significativas de ácido acético, é altamente utilizada em fermentações de tanque aberto, pois ela não sobrevive em condições de anaerobiose (PRIEST; STEWARTS, 2006). Já o gênero *Toluraspora* traz à cerveja ésteres de banana e fenóis de cravo (MORADO, 2017).

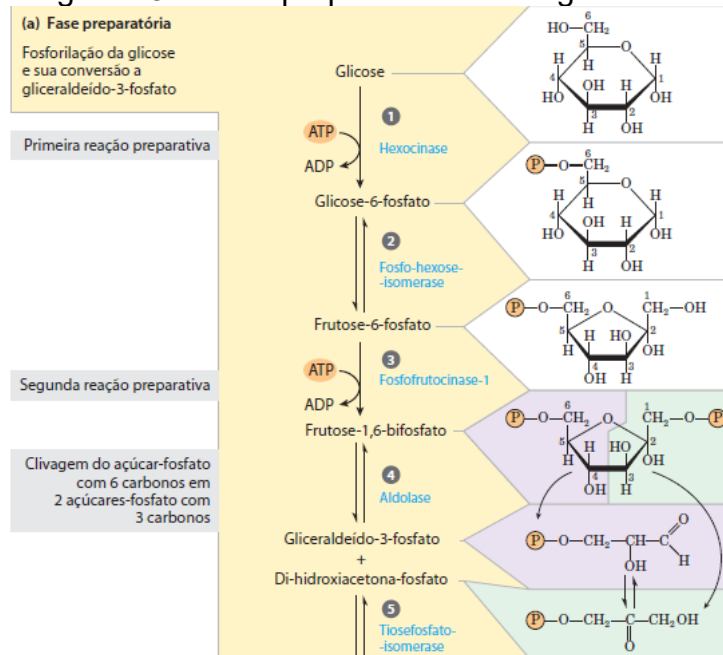
Na fermentação natural em tanques abertos, não há inoculação de nenhum microrganismo específico, sendo que o mosto sofre uma inicial proliferação com leveduras selvagens e bactérias fermentativas, que vão produzir ácido acético e aromas vegetais. Linhagens de leveduras *ale* atuam então, produzindo álcool por meses, até que o mosto é inteiramente dominado por bactérias das espécies *Acetobacter*, que produzem o ácido acético, e *Pediococcus*, que produzem ácido láctico. Por fim, leveduras do gênero *Brettanomyces* se propagam, e trazem aromas de couro e lã a cerveja (MORADO, 2017).

### 3.3.3 Metabolismo aeróbico da levedura

Após a via glicolítica, a levedura pode atuar em aerobiose, envolvendo o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, ou em anaerobiose na fermentação alcoólica, esta última já abordada no item 3.2.4 da seção 3.2. As Figuras 18 e 19 representam as fases da via glicolítica, que antecedem tanto processos aeróbios quanto anaeróbios.

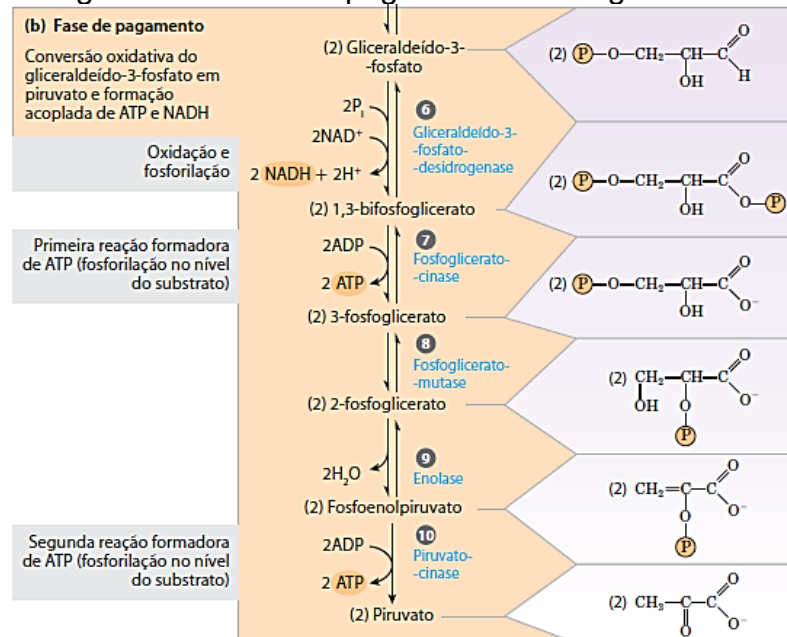


Figura 18 – Fase preparatória da via glicolítica



Fonte: Nelson; Cox (2014)

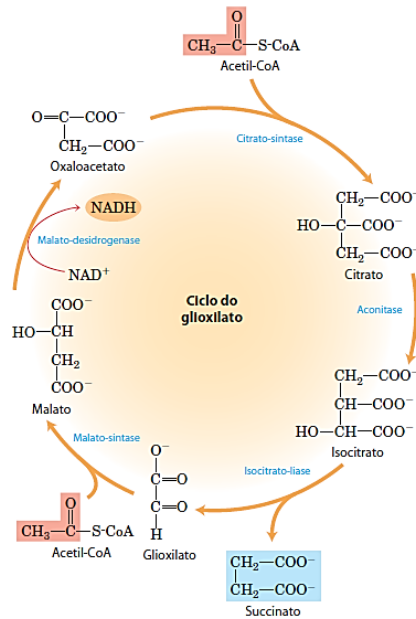
Figura 19 – Fase de pagamento da via glicolítica



Fonte: Nelson; Cox (2014)

Considerando o saldo bruto, a via glicolítica produz quatro moléculas de ATP, a nível de substrato, e duas moléculas de ácido pirúvico, e reduz duas moléculas de Dinucleótido de nicotinamida e adenina  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ . Em condições de oxigenação, a molécula de ácido pirúvico é descarboxilada, e o grupo acetil se unem a coenzima A, para formar a acetil-CoA, primeira molécula do ciclo de Krebs, retratado na Figura 20 (TORTORA *et. al*, 2017).

Figura 20 – Ciclo de Krebs



Fonte: Nelson; Cox (2014)

Esse processo respiratório gera elevadas maiores quantidades de energia metabólica (ATP) para a célula do que uma fermentação alcoólica, porque os NADH e Flavina Adenina Nucleotídeo Reduzido (FADH) formados neste ciclo vão diretamente para a fosforilação oxidativa (28 ATP + 2 GTP (Trifosfato de Guanosina) = 30 ATPs só no ciclo de Krebs). Considerando o processo total de armazenamento de energia metabólica durante a fase aeróbica, o saldo líquido em ATPs é 36 por molécula de glicose metabolizada. Na fermentação, o saldo líquido é de apenas 2 ATPs por molécula de glicose transformada em 2 moléculas de etanol e 2 de  $\text{CO}_2$ . (TORTORA *et al.*, 2017).

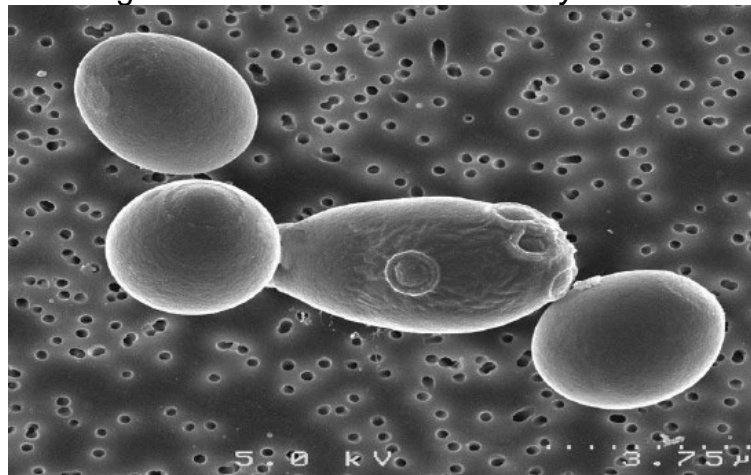
### 3.3.4 *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

Embora McFarland, 1996, em sua publicação “*Saccharomyces boulardii* Is Not *Saccharomyces cerevisiae*”, tenha defendido a distinção entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*, Alis van der Aa Kühle & Lene Jespersen, 2003, defendem na publicação “The Taxonomic Position of *Saccharomyces boulardii* as Evaluated by Sequence Analysis of the D1/D2 Domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region and the Mitochondrial Cytochrome-c Oxidase II Gene”, no jornal Systematic and Applied Microbiology, que a *boulardii* não é uma espécie única, sendo membro da *Saccharomyces cerevisiae*. O mesmo é observado no

Catalogue of Life, atualizado em agosto de 2021, que não categoriza a espécie *boulardii* dentro do gênero *Saccharomyces*, mesmo com as diferenças metabólicas e fisiológicas entre *boulardii* e *cerevisiae* (VANDENPLAS *et. al*, 2009). Deste modo, como forma de distinção entre os microrganismos utilizados durante esta pesquisa, a levedura *Saccharomyces boulardii* será tratada como *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*.

A *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, microscopicamente apresentada na Figura 21, foi descoberta em meados de 1920 pelo microbiologista francês Henri Boulard, que ao observar os nativos da Indochina, atual Vietnã, notou que eles utilizavam o chá das cascas da lichia para tratar casos de diarreia (LOPES; PINTO, 2010; MARTINS *et. al*, 2009; MULLER *et. al*, 2006; VANDENPLAS *et. al*, 2009). Ele esclareceu que o efeito terapêutico era advindo de uma levedura que recobria a casca da lichia, dando a ela o nome de *Saccharomyces boulardii* (MARTINS *et. al*, 2009).

Figura 21 - Micrografia eletrônica do *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*



Fonte: Dpt de Ciência dos Alimentos da Universidade de Guelph (2021?)

Mesmo taxonomicamente controversa, a *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, é comprovadamente uma levedura não patogênica, termotolerante, sendo 37°C sua temperatura ótima de trabalho, resistente a valores de pH ácidos dos sucos gástrico, entérico e pancreático, permanecendo ativa durante todo o percurso do sistema digestivo, assim como resistente à ação de antibióticos e quimioterápicos, conferindo a ela propriedades excepcionais para um microrganismo probiótico (EDWARDS-INGRAM *et al.*, 2007; KEGELE *et al.*, 2010; MCFARLAND; BERNASCONI, 1993; VANDENPLAS *et al.*, 2009).

A *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* é amplamente estudada quanto a seu comportamento no hospedeiro, com estudos como os de Edwards-Ingram *et al.* (2007), observando que a levedura não consegue se instalar no tubo digestivo pois a microbiota local impede essa aderência, mas pode sobreviver e atuar normalmente, quando administrada com continuidade. Além disso, seu potencial de sobrevivência em valor de pH ácido, permite que uma grande quantidade de células da levedura chegue ao intestino, otimizando seu potencial probiótico no organismo.

Rigothier *et al.* (1994), Czerucka & Rampal (2002), assim como Muller (2006), Vandenplas *et al.* (2009), e Kegele *et al.* (2010) pesquisaram sobre os mecanismos de atuação da *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* no hospedeiro, e concluíram que a levedura pode agir por três meios. Segundo estes estudos, a levedura desempenha um antagonismo sobre enteropatógenos como *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile* e *Escherichia coli*, produzindo substâncias capazes de inibir o crescimento desses microrganismos, neutralizando as toxinas e proporcionando maior resistência a proliferação destes patógenos no intestino, ou apenas competindo por nutrientes e sítios de ligação. A *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* age também com efeito trófico sobre a mucosa intestinal, produzindo poliaminas necessárias para a divisão celular, e síntese de DNA e de proteínas. Essas poliaminas são liberadas durante a fase catabólica da levedura, elevando a atividade de dissacaridases e o número de carreadores de glicose na membrana dos enterócitos (proporcionando melhora na absorção de carboidratos), assim como, favorecendo o aumento da concentração celular de imunoglobulina A, que secreta o fluido intestinal. Um outro mecanismo de ação da *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* é por meio da imunoestimulação, em que a levedura incita a expressão enzimática de imunoglobulinas e citocinas, assim como da atividade de células de defesa como macrófagos, natural *killer*, células T citotóxicas e interferon.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* é amplamente utilizada como probiótico, sendo recomendada em todas as idades e para uma série de doenças como diarreias de diferentes etiologias, incluindo as desencadeadas pelo uso de antibióticos, doenças inflamatórias intestinais, doenças recorrentes associadas ao *Clostridium difficile* e também a Síndrome do Intestino Irritável (CZERUCKA; RAMPAL, 2002; KEGELE *et al.*, 2010; MULLER, 2006; VANDENPLAS *et al.*, 2009).

Na indústria cervejeira, a levedura *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* não é empregada comercialmente, sendo tradicionalmente utilizadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*. Porém, dentro do gênero *Saccharomyces*, existem inúmeras espécies de leveduras que possuem o chamado fator *killer*, como ressaltava Palmer (2017), uma característica muito interessante para as indústrias de vinho e cerveja. Esse fator é normalmente advindo do plasmídeo M-dsRNA, que permite que a levedura secrete substâncias tóxicas, geralmente proteínas, que tem a capacidade de matar outras leveduras sensíveis presentes no meio.

Na natureza, há inúmeras linhagens de *Saccharomyces* e não *Saccharomyces* com capacidade *killer*. Foram isoladas, caracterizadas e identificadas (AGUSTINI *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016; AGUSTINI *et al.*, 2018), diversas linhagens obtidas de uvas de várias regiões do Brasil e muitas delas com capacidade *killer* (SILVA, 1996; SILVA, 1999; SILVA *et al.*, 2011; SILVA *et al.* 2011-a)

Azevedo (2005), em seu trabalho de comparação do potencial probiótico de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* e uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, pode observar efeitos antagônicos muito semelhantes no controle de *Escherichia coli*. Esta atividade antagônica, muito provavelmente, nada tem a ver com o fator *killer*.

### 3.4 PROBIÓTICOS

Segundo Rolfe (2000), Reid & Hammond (2005) e Henker *et al.* (2007), os probióticos são microrganismos que podem trazer melhorias à saúde. Eles devem ter a capacidade de sobreviver ao pH ácido do estômago, para então aderir ao epitélio do intestino e colonizá-lo, atuando em conjunto com a microbiota naturalmente presente (ZIEMER; GIBSON, 1998; LEE *et al.*, 1999). Quando em equilíbrio, essa microbiota natural, adicionada de organismos probióticos, pode auxiliar na produção de vitaminas, melhorar níveis de colesterol e de absorção de minerais, estimular o sistema imunológico, resistir a colonização de patógenos, auxiliar na prisão de ventre e ainda tratar de alguns tipos de diarreias (ROLFE, 2000; ISOLAURI, 2003; TESHIMA, 2003; LIONG e SHAH, 2005; CANANI *et al.*, 2007; STEFE *et al.*, 2008). Os probióticos, ainda podem auxiliar no direcionamento da

microbiota intestinal, assim como reformulá-la após uso de medicamentos, já que, quando a microbiota está em desequilíbrio, pode haver infecções bacterianas (ZIEMER; GIBSON, 1998).

### 3.4.1 Descoberta e propriedades

Louis Pasteur, em 1857, foi o primeiro cientista a estudar os probióticos, mesmo que indiretamente, ao pesquisar sobre a fermentação láctica (SMITH, 2012). Henry Tissier, em 1899, foi o primeiro a isolar um *Bifidobacterium*, postulando que esse tipo de microrganismo deslocava as bactérias proteolíticas que provocam diarreia. Porém, o conceito benéfico de probiótico foi desenvolvido em 1907, quando o microbiologista Ilya Ilyich Mechnikov (Élie Metchnikoff) sugeriu que as bactérias específicas poderiam beneficiar o trato gastrointestinal, e prolongar a vida do hospedeiro (FONSECA, 2018; MARTINS *et al.*, 2009).

Lilley & Stillwell em 1965, Kurmann, em 1988 e Fuller em 1989 e 1994 definiram que probióticos são “microrganismos vivos que, quando são consumidos, agem no trato gastrintestinal do organismo hospedeiro melhorando o balanço microbiano intestinal” (MARTINS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2002). No entanto, como ressalta Oliveira *et al.* em 2002, essa definição foi descrita de forma mais ampla por Havenaar *et al.* em 1992, que trata probióticos como “culturas puras ou mistas de microrganismos vivos que, quando aplicadas aos animais ou ao homem, tem efeitos benéficos ao hospedeiro promovendo o balanço de sua microbiota intestinal”.

Vandenplas *et al.* (2009, p. 255), ajuda a compreender os mecanismos de ação dos probióticos que incluem:

Regulação da homeostase microbiana intestinal, interferência na capacidade dos patógenos de colonizar e infectar a mucosa, modulação das respostas imunológicas locais e sistêmicas, estabilização da função de barreira gastrointestinal, inibição de enzimas procarcinogênicas e indução da atividade enzimática favorecendo a absorção e nutrição.

O mesmo autor, assim como Muller (2006), ainda sugerem que os probióticos diminuem as inflamações gastrointestinais, estimulando as células T reguladoras, e inibem as células T efectoras, aumentando a síntese de citocinas regulatórias que desempenham papel protetor.

Desta forma, entre os benefícios gerais do uso de probióticos, destacam-se a regulação da microbiota intestinal, a resistência ou reformulação da microbiota intestinal em caso de ataca de organismos patogênicos que exigiram o uso de antibióticos, a estimulação do sistema imunológico, colaboração para melhoria de casos de prisão de ventre e o tratamento de casos de diarreias (ISOLAURI, 2003; MARTINS *et al.*, 2009; ROLFE, 2000; TESHIMA, 2003; VANDENPLAS *et al.*, 2009).

### 3.4.2 Principais microrganismos e alimentos probióticos

Os microrganismos probióticos mais amplamente empregados são bactérias, em especial do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, mas também há algumas linhagens específicas de leveduras que conferem os mesmos benefícios já apresentado (LEE *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2002). A Tabela 1 exhibe os principais gêneros e espécies de microrganismos comprovadamente probióticos.

Tabela 1 – Principias espécies de microrganismos probióticos

Espécies de <i>Lactobacillus</i>	Espécies de <i>Bifidubacterium</i>	Outras espécies ácido lácticas	Espécies não ácido lácticas e leveduras
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle, 1917
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>		
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			

*L. rhamnosus*

Fonte: Holzapfel; Schillinger (2002)

Quando se trata de alimentos funcionais, categoria em que os alimentos probióticos também se enquadram, a European Commission Concerted Action on Funcional Food Science in Europe (1999 *apud* MOSER, 2017, p. 21), os define como:

Alimentos para os quais pode-se satisfatoriamente demonstrar que eles afetam benéficamente uma ou mais funções do organismo, além de garantirem efeitos nutricionais adequados, conduzindo a uma melhoria do estado de saúde e bem estar e/ou a uma redução do risco de doenças.

Autores como Celemi *et al.* (2017) Oliveira *et al.* (2002), e Oliveira (2017), citam que em resoluções da Anvisa, 2008, recomenda-se uma ingestão diária mínima de probióticos, na quantidade de  $10^8$  a  $10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC), para obtenção efetiva de seus benefícios. Portanto, é indicado que o alimento probiótico contenha a quantidade mínima sugerida de microrganismos probióticos vivos e ativos.

Dentre os produtos probióticos mais comercializados, estão microrganismo liofilizados ou em pó, e alimentos como iogurtes, leites e bebidas fermentadas, queijos e sorvetes (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008; ROSS; DESMOND; STANTON, 2005). O Quadro 1 elucida os principais produtos já comercializados comprovadamente probióticos, e os microrganismos que estão envolvidos nessa condição.

Quadro 1 – Principais produtos probióticos comercializados no mercado

<b>Tipo de produto</b>	<b>Produto comercializado</b>	<b>Microrganismo probiótico</b>
	Yakult	<i>L. casei</i> linhagem Shirota
	Chamyto	<i>L. johnsonii</i> <i>L. helveticus</i>
Leite fermentado		<i>L. casei</i>
	Leite fermentado Parmalat	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>
	Vigor Club – Poke-mons	<i>L. casei</i>



		<i>L. acidophilus</i>
	Batavito	<i>L. casei</i>
Leite fermentado		<i>S. thermophilus</i>
aromatizado	LC1 Active	<i>L. bulgaricus</i>
		<i>L. acidophilus</i> NCC 208
	logurte Biofibras	<i>B. lactis</i>
logurte		<i>L. acidophilus</i>
	Dietalact	<i>B. lactis</i>
		<i>L. acidophilus</i>
Mistura de bebidas	Biotura	<i>B. lactis</i>
		<i>L. acidophilus</i>
Suspensão oral	Leiba	<i>L. acidophilus</i>
Comprimidos ou sachê	Floratil	<i>Sacch. boulardii</i>

Fonte: adaptado de Oliveira *et al.* (2002)

Quando vinculados em alimentos, algumas condições devem ser observadas para a boa conservação do metabolismo do microrganismo probiótico. Contaminações ou microrganismos competidores e/ou inibidores, a temperatura da estocagem do produto, a atividade de água e a tensão do oxigênio dentro da embalagem, assim como o pH do alimento, interferem na viabilidade do microrganismo (OLIVEIRA, 2002).

### 3.4.3 Parâmetros legais para uma bebida probiótica

A RDC nº 241, de 26 de julho de 2018 (BRASIL, 2018), do Ministério da Saúde, que apresenta todos os requisitos para que seja comprovada a segurança e os benefícios dos probióticos à saúde quando para uso em alimentos, evidencia o conceito de probiótico no art.3, o definindo como “micro-organismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo”. Na mesma Resolução, no art.7, o Ministério da Saúde (2018, p. 3) exige que:

A comprovação da segurança dos probióticos e dos seus benefícios à saúde requer a caracterização e identificação inequívoca da linhagem do micro-organismo, por meio da apresentação de documentos técnicos ou estudos científicos que:

- I - identifiquem a espécie, de acordo com a nomenclatura binomial mais atual;
- II - identifiquem e caracterizem a linhagem, por meio de métodos genotípicos e fenotípicos;
- III - especifiquem a origem da linhagem; e
- IV - comprovem o depósito da linhagem em uma coleção de cultura internacionalmente reconhecida.

Seguindo a resolução, fica estabelecido, no art. 8, que essas comprovações de segurança do probiótico devem ser realizadas por meios de técnicas analíticas que garantam um histórico de uso, ausência de relatos de reações adversas, fatores de virulência ou patogenicidade, produção de metabólitos não prejudiciais, além de não apresentarem resistência a antibióticos. Ainda nos artigos 12 e 14, é determinado que os benefícios do probiótico a saúde devem ser claros quanto a população alvo deste produto. O microrganismo deve ter boa sobrevivência ao trato digestório humano, possuir uma dose mínima esclarecida para a obtenção do benefício, além de uma avaliação satisfatória do potencial alegado.

Para a bebida desenvolvida no presente trabalho, por se tratar, teoricamente, de um alimento probiótico que não possui registro perante o MAPA, não há legislações vigentes que possam conferir obrigatoriedade de análises padronizadas. Não obstante, como apresentado nas resoluções citadas, que se referem aos parâmetros de segurança que o microrganismo probiótico deve apresentar, e considerando a utilização da *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, levedura comercializada como probiótico através do medicamento Floratil, com efetividade amplamente comprovada, e de registro nº 138410071 pela Anvisa, a bebida em questão, se revelada a viabilidade do microrganismo, poderá ser enquadrada como um alimento probiótico, desde que a RDC nº 2, de 7 de Janeiro de 2002, do Ministério da Saúde, seja atendida. Nesta resolução, é deixado claro que, na rotulagem do produto, a quantidade de microrganismos viáveis que garantam a ação funcional alegada, dentro do prazo de validade, devem estar explícitos e próximos a Tabela de Informação Nutricional.

Deste modo, por não haver um roteiro analítico claro para a definição do potencial probiótico das cervejas em estudo, os parâmetros apresentados anteriormente, assim como a Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece o padrão de identidade e qualidade da bebida fermentada com bactérias e leveduras simbióticas conhecida como Kombucha, foram utilizadas como base para a

determinação das análises da “cerveja probiótica”. A normativa confere a obrigatoriedade da apresentação do pH e da graduação alcoólica da bebida, no âmbito físico-químico. No que se refere aos microrganismos, exigem-se a comprovações de segurança dos microrganismos fermentativos, e a manutenção destes no produto final, não sendo necessário o processo de filtração.

Além destes parâmetros, existem recomendações de ingestão diária de probióticos, para que se observem os efeitos terapêuticos no organismo (ANVISA, 2008; CARVALHO, 2016; SAAD, 2006). Essas doses podem variar de acordo com o microrganismo probiótico empregado, mas geralmente oscilam de  $10^6$  a  $10^9$  UFC/dia. Por esta razão, para este trabalho, como base para que a cerveja seja considerada um alimento com micro-organismos probióticos ativos e efetivos, ela deverá conter um mínimo de  $10^4$  UFC/mL do produto, para possuir ao menos  $5 \times 10^6$  UCF por garrafa da bebida.

#### 3.4.3.1 Análise microbiológica

Pelos parâmetros apresentados na seção 3.4.4, verifica-se que não há muitos padrões microbiológicos obrigatórios além das questões de segurança do microrganismo, segundo a legislação vigente. Sendo assim, com a comprovada eficácia e confiabilidade de *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, as análises compreenderam, principalmente, questões de quantidade de células da levedura, visando a confirmação do potencial probiótico da bebida.

As análises serão: contagem de células, contagem de células mortas e contaminações microbiológicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar o comportamento de *Sacch. cerevisiae var. boulardii* perante diferentes condições de substrato, três estilos distintos, escolhidos por suas particularidades, foram selecionados: Pilsen, pelo tradicionalismo da receita e alto consumo no mundo, Indian Pale Ale, pelo amargor do estilo, e Belgian Golden Strong Ale, pela sua característica mais alcoólica.

O mosto para a cerveja Pilsen foi separado em duas partes, onde uma foi fermentado com *Saccharomyces pastorianus* e outra com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*. O mosto para a cerveja Indian Pale Ale foi inoculado, parte com *Saccharomyces cerevisiae*, parte com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*.

Depois de prontas, todas as cervejas passaram por processos analíticos físico-químicos para avaliar, de forma quantitativa, as semelhanças entre as espécies e linhagens, visando posicionar a atividade da *Sacch. cerevisiae var. boulardii* no processo de elaboração dos diferentes estilos de cerveja.

As análises revelaram o enquadramento da bebida elaborada com *Sacch. cerevisiae var. boulardii* na legislação brasileira, sob ponto de vista microbiológico e físico-químico. Com relação ao aspecto microbiológico, verificar a viabilidade de uso da *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, no processo de elaboração, considerando as recomendações de ingestão diária de cerveja e de probiótico. Serão também efetuadas análises sensoriais, a fim de investigar a adequação da *Sacch. cerevisiae var. boulardii* na elaboração de cervejas, no que tange a aromas e sabores.

### 4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO

A produção das cervejas foi realizada em Santa Cruz do Sul, no Rio Grande do Sul, entre os meses de fevereiro e março do ano de 2021.

As análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais foram realizadas no laboratório da Cervejaria Imigração, localizada no município de Campo Bom, no estado do Rio Grande do Sul.

## 4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Com o propósito de vincular a inovação biotecnológica à produção comercial mundial, o estudo avaliou de forma aplicada, descritiva-exploratória, quali-quantitativa, hipotético-dedutivo, bibliográfica, experimental, documental, e por meio de levantamentos, uma linhagem de levedura com potencial fermentativo para a indústria cervejeira em expansão, mas que pudesse conferir à bebida as qualidades fornecidas pelo metabolismo comprovadamente probiótico do microrganismo.

No presente trabalho, a abreviação empregada para o gênero de leveduras *Saccharomyces* será *Sacch.*, seguindo o que determina Kreger-van Rij, 1984, para Coleções Internacionais de Leveduras, já que a abreviação *S.* é considerada para leveduras de outro gênero (VAN-RIJ, 1984).

## 4.3 PRODUÇÃO DA CERVEJA

### 4.3.1 Propagação da *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

A levedura foi obtida do medicamento comercial Floratil, sendo que, para sua utilização na fermentação, uma propagação se faz necessária. Para isso, em um frasco de Erlenmeyer, 500 mL de água foram fervidas com Dry Malt Extract, composto obtido, basicamente, pela secagem do malte, concentrando o amido do grão, e formando uma fonte de glicose para a célula, até que a densidade original registrada pelo densímetro (de massa específica) atingir aproximadamente 1,036. Essa solução foi fervida por aproximadamente 5 min, esfriada a 50°C, adicionadas as cápsulas de 1 grama de Floratil, e a suspensão foi mantida em agitação por um dia. Após esse processo, a suspensão ficou em repouso para a decantação. O processo foi repetido mais uma vez, a fim de obter um número maior de células.

### 4.3.2 Elaboração

O malte de cada estilo foi moído separadamente (Figura 22), e acrescentado à panela de brasagem/clarificação com a água já aquecida (Figura 23), e a mistura mantida sob agitação. Durante esse processo, foram realizadas rampas de temperatura, para promover a ativação de diferentes enzimas extratoras de amido,

para conferir mais ou menos corpo à cerveja. Essa panela possui ainda um fundo falso com um filtro, onde há a decantação e a filtragem dos sólidos em suspensão.

Figura 22 – Moagem do malte



Fonte: Autor (2021)

Figura 23 – Processo de mostura



Fonte: Autor, 2021

Enquanto o mosto filtrado era transferido para a panela de fervura, uma água já aquecida foi despejada na panela de brasagem/clarificação para realizar a lavagem dos grãos e otimizar o processo. Nesta etapa de fervura, o lúpulo foi acrescentado com um tempo determinado pelo estilo da cerveja (Figura 24). Ainda na panela de fervura, o processo de whirlpool (veemente mistura da cerveja para separação de restos de lúpulos, proteínas e outros subprodutos do mosto) foi aplicado. Com um trocador de calor tipo serpentina com água gelada, o mosto passou por refrigeração e foi transferido para o fermentador.

Figura 24 – Trásfega do mosto filtrado e processo de fervura



Fonte: Autor (2021)

Tanto para o fermento tradicional, como para a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* propagada, a inoculação foi realizada na proporção de 5 gramas de levedura por litro de mosto (Figura 25). O fermentador seguiu sob refrigeração, com temperatura de 0°C monitorada durante todo o processo, sendo a retirada do CO<sub>2</sub> controlada com AirLock (eclusa de ar). O envase foi realizado de forma manual em garrafas de 500 mL, por meio de uma pequena torneira presente no fermentador. O fechamento das garrafas se deu com o auxílio de um arrolhador de mesa, de forma manual.



Figura 25 – Inoculação da levedura e fermentação



Fonte: Autor (2021)

#### 4.3.2.1 Pilsen

Foram aquecidos 24 litros de água a 66°C, e acrescidos 5 Kg de malte Pilsen. Por 20 min, a solução foi deixada em repouso a 62°C, e a temperatura foi elevada a 71°C, por 40 min. Por fim, aumentou-se a temperatura até 76°C por mais 10 min, e realizado o teste do iodo, para confirmação da hidrólise total do amido. Os grãos foram lavados com 19 litros de água a 76°C.

Com um tempo total de fervura de 60 min, houve adição de lúpulo SAAZ 3,15 nos tempos de 40, 45 e 55 min. A densidade final do mosto foi medida com o auxílio de um densímetro, que registrou o valor de 1,043. A levedura comercial assim como a linhagem *Sacch. cerevisiae var. boulardii* foram inoculadas. O fermentador foi mantido sob refrigeração durante 11 dias tendo sua temperatura controlada, e mais 5 dias a 0°C, para maturação da cerveja.

#### 4.3.2.2 Indian Pale Ale

Em 24 litros de água aquecidos a 74°C, adicionaram-se 6,7 Kg de malte Pale Ale, e 100 gramas de malte Caraaroma. A mostura durou 60 min, onde permaneceu



por 68°C durante todo o processo. O teste do iodo confirmou o término do processo. Ainda foram utilizados 21 litros de água a 76°C para a lavagem dos grãos.

Durante a fervura, lúpulo Mosaic foi adicionado ao mosto aos 30, 45, 50 e 60 min, perfazendo um total de 60 min de processo. A densidade se fixou em 1,048. As linhagens de levedura foram inoculados, e a fermentação ocorreu por 10 dias, sendo ainda o processo de *Dry Hopping* aplicado nessa etapa. Por 4 dias, houve a maturação da cerveja a 0°C.

#### 4.3.2.3 *Belgian Golden Strong Ale*

Em 24 litros de água a 56°C, 6,4 Kg de malte Pilsen, e 1 Kg de malte Vienna foram misturados, com um repouso inicial de 10 min a 52°C. A temperatura foi aumentada para 62°C por 45 min, 70°C por 30 min, e, finalmente, 76°C por 10 min, com o teste de iodo confirmando o final da mostura. Para a lavagem dos grãos, 22 litros de água foram aquecidos a 76°C.

Na fervura, o lúpulo SAAZ 3,15 foi acrescentado aos 5, 40, 45, 50 e 55 min do tempo total de 60 min do processo. Ao final, a densidade foi registrada em 1,067. Após a inoculação das leveduras, a fermentação foi efetuada por 10 dias, e a maturação por 4 dias.

### 4.3.3 Análises

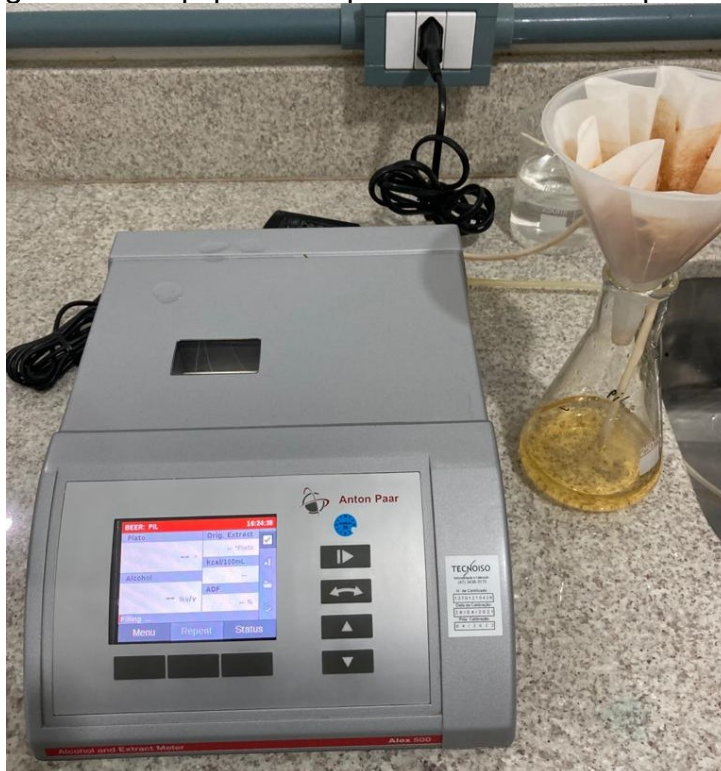
Segundo os parâmetros legais apresentados anteriormente, as análises, seguindo métodos analíticos preconizados pela European Brewing Convention (EBC), foram realizadas para enquadramento do produto fermentado nos padrões da cerveja e de um produto probiótica.

#### 4.3.3.1 *Físico-químicas*

As análises foram realizadas prezando as metodologias da EBD, no equipamento AntoPaar Alex 500, conforme Figura 26, cedido pela cervejaria Imigração, sendo elas: densidade relativa, pelo método EBC 9.43.2, encontrada no anexo A; extrato original, real e aparente, pelo método EBC 9.4, no anexo B; graduação alcoólica pelo EBC 9.2.3, visualizada no anexo C; calorias pelo EBC

9.45, observada no anexo D; pH pelo EBC 9.35, no anexo E; amargor pelo EBC 9.8, exemplificado no anexo F; e cor da cerveja pela escala visual.

Figura 26 – Equipamento para análises físico-químicas

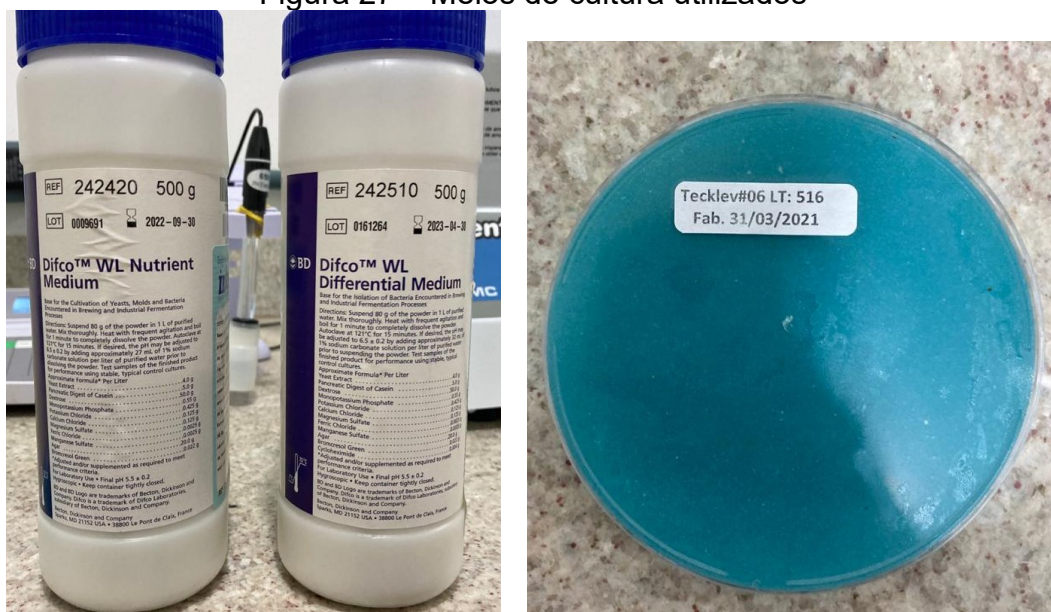


Fonte: Autor (2021)

#### 4.3.3.2 Microbiológicas

As análises foram: contagem de células e contagem de células mortas em Câmara de Neubauer, pelos métodos EBC 3.1.1.1, 3.2.1.1 e 5.1.4, nos anexos G, H e I; determinação da presença de leveduras cervejeiras viáveis, e leveduras ou microrganismos contaminantes, por metodologias propostas na Cervejaria Imigração (Figura 27).

Figura 27 – Meios de cultura utilizados



Fonte: Autor (2021)

#### 4.3.3.3 Sensoriais

Conforme o item 3.1.4 referente aos estilos que foram produzidos para o estudo, seguindo as normas apresentadas no *Beer Judge Certification Program* (BJCP), as análises sensoriais foram realizadas por uma banca de degustadores treinados, que avaliaram as características da cerveja por estilo, a fim de discriminar compreender o comportamento das diferentes linhagens de levedura no processo de elaboração de cerveja. A avaliação foi realizada por meio de tabelas encontradas nos apêndices A, B e C, que refletem a classificação do produto com relação ao aroma, à aparência, ao sabor e à sensação na boca.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os dados obtidos no equipamento AntonPaar Alex para as cervejas fermentadas com *Saccharomyces cerevisiae* ou *pastorianus* e *Saccharomyces cerevisiae var. bouldarii* estão registrados nas tabelas abaixo, categorizadas de acordo com o estilo da bebida.

#### 5.1.1 Físico-química do estilo Pilsen produzido por *Sacch. var. bouldarii* e *Sacch. pastorianus*

Tabela 2 - Comparação físico-química entre cervejas Pilsen produzida por *Sacch. cerevisiae var. bouldarii* e cerveja Pilsen produzida por *Sacch. pastorianus*

Parâmetro analisado	<i>Sacch. cerevisiae var. bouldarii</i>	<i>Sacch. pastorianus</i>
Densidade relativa (g/cm <sup>3</sup> )	1,0179	1,0083
Extrato original (% Plato)	10,78	10,73
Extrato real (% Plato)	6,14	4,16
Extrato aparente (% Plato)	5,01	2,59
Graduação alcoólica (% v/v)	3,08	4,30
Cor (EBC)	3,94 – 5,91	3,94 – 5,91
Calorias (kcal/100 mL)	38,82	38,42
Amargor (IBU)	10	8
pH	4,26	4,31

Fonte: Autor (2021)

Ao final da maturação, a densidade da cerveja medida com densímetro atingiu 1,007 para o produto fermentado com a levedura comercial, e em 1,020 para a fermentação com *Sacch. cerevisiae var. bouldarii*. Esses valores se mantem próximos aos encontrados no equipamento AntonPar.

Os resultados da Tabela 2 revelam uma diferença de densidade relativa entre as fermentações, o que pode indicar um consumo menor de açúcares por parte da *Sacch. cerevisiae var. bouldarii*. Outra possibilidade é que haja uma sobra de

Açúcares Redutores Totais, e que a linhagem *Sacch. cerevisiae var. boulardii* produza menos etanol que as linhagens comerciais por possuir um fator de conversão igual ou maior a elas. Os valores maiores de extrato aparente e real obtidos, podem significar maiores quantidades de açúcar ainda presentes no mosto, trazendo um percentual alcoólico mais baixo na “cerveja probiótica”.

Montenegro (2017), ao realizar uma fermentação de um mosto com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, visando a produção de uma cerveja sem estilo definido, observou que esta levedura é muito similar a outras espécies de baixa flocculação, como as linhagens utilizadas para uma cerveja do estilo Weissbier, que utiliza malte padrão Pilsen. Nas análises físico-químicas do autor, a graduação alcoólica foi de 4,50 (% v/v), muito similar ao resultado encontrado na fermentação com *Sacch. pastorianus* do presente estudo. Já Reitenbach *et al.* (2021), obtiveram resultados diferentes em uma fermentação mista com *Sacch. cerevisiae var. boulardii* e *Sacch. cerevisiae*. Registraram uma graduação alcoólica mais alta que na fermentação padrão para o estilo, logo, com menores valores de extrato real e aparente.

A semelhança entre os valores de extrato original nas duas fermentações corrobora com a intensão inicial do projeto, onde todos os processos, seja com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, seja com *Sacch. pastorianus*, foram realizados igualmente, partindo-se da mesma mostura e tempo de fermentação, alterando apenas a levedura.

Nos dados de cor, calorías, amargor e pH, percebe-se que a diferença entre as fermentações foi pequena. Com relação a estes aspectos, é possível utilizar *Sacch. cerevisiae var. boulardii* na produção de cervejas físico-quimicamente muito semelhantes. Resultado semelhante foi o encontrado por Reitenbach *et al.* (2021), que ao realizar uma fermentação primária em um mosto Pilsen, utilizando a linhagem *Sacch. cerevisiae* 34/70, e uma fermentação secundária com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, comparando com um mosto Pilsen fermentado apenas com *Sacch. cerevisiae*, também obtiveram valores muito similares de cor, amargor e pH.

### 5.1.2 Físico-química do estilo IPA produzido por *Sacch. var. boulardii* e *Sacch. cerevisiae*

Tabela 3 - Comparação físico-química entre cervejas IPA produzida por *Sacch. cerevisiae var. boulardii* e cerveja IPA produzida por *Sacch. cerevisiae*

Parâmetro analisado	<i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
Densidade relativa (g/cm <sup>3</sup> )	1,0216	1,0141
Extrato original (% Plato)	13,64	12,26
Extrato real (% Plato)	7,45	5,65
Extrato aparente (% Plato)	5,96	4,07
Gradação alcoólica (% v/v)	4,16	4,38
Cor (EBC)	19,70 – 27,58	19,70 – 27,58
Calorias (kcal/100 mL)	49,68	44,24
Amargor (IBU)	25	27
pH	4,18	4,26

Fonte: Autor (2021)

Depois de finalizando o processo de maturação, a densidade ficou em 1,018 para a fermentação com a levedura comercial, e 1,025 para a levedura *Sacch. cerevisiae var. boulardii*.

Assim como demonstram os resultados físico-químicos para o estilo Pilsen, o mesmo pode se verificar no estilo IPA representado pela Tabela 2, que apresentou maiores quantidades de extrato real e aparente na fermentação com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*. A densidade relativa na “cerveja probiótica” foi maior, e sua graduação alcoólica, menor.

O resultado apresentado vai ao encontro dos experimentos realizados por Moser (2017) que, ao investigar o potencial fermentativo da *Sacch. cerevisiae var. boulardii* na produção de uma cerveja com malte no estilo Pale Ale, também verificou maiores quantidades de extrato real, e menor teor alcoólico, quando comparada a uma cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae* em conjunto com a *Sacch. cerevisiae var. boulardii*. Moser (2017), com fermentação mista, obteve cores bastante distintas entre as fermentações, enquanto, no presente trabalho, a cor das cervejas se manteve similar.

Resultados diferentes foram obtidos por Mulero-Cerezo *et al.* (2019), que obtiveram um valor de pH significativamente mais baixo em fermentação com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, do que em fermentação com *Sacch. cerevisiae*, característica que seria desejada, visto que a acidificação preserva a cerveja contra contaminações, além de melhorar a estabilidade da espuma.

No estilo IPA, os lúpulos são uma característica indispensável, pois conferem o amargor desejado por meio dos  $\alpha$  e  $\beta$ -ácidos presentes na planta. No entanto, a presença destes compostos influencia o metabolismo da levedura, diminuindo seu potencial fermentativo, resultado que fica evidente nas duas fermentações se comparadas com o estilo Pilsen, pois apresentam maiores quantidades de extrato aparente e real, ou seja, mais açúcares não consumidos (SENKARCINOVA *et al.*, 2018).

### 5.1.3 Físico-química do estilo BGSA produzido por *Sacch. var. boulardii* e *Sacch. cerevisiae*

Tabela 4 - Comparação físico-química entre cervejas BGSA produzida por *Sacch. cerevisiae var. boulardii* e cerveja BGSA produzida por *Sacch. cerevisiae*

Parâmetro analisado	<i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
Densidade relativa (g/cm <sup>3</sup> )	1,0393	1,0060
Extrato original (% Plato)	16,43	16,51
Extrato real (% Plato)	11,49	3,34
Extrato aparente (% Plato)	10,28	0,25
Graduação alcoólica (% v/v)	3,44	8,82
Cor (EBC)	7,88 – 9,85	7,88 – 9,85
Calorias (kcal/100 mL)	60,65	60,40
Amargor (IBU)	16	15
pH	4,27	4,24

Fonte: Autor (2021)

A densidade logo após a maturação foi registrada, pelo densímetro, em 1,006 para a levedura comercial, e para a *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, em 1,039.

A Tabela 4 revela que, as mesmas características físico-químicas observadas para o estilo Pilsen e IPA, são também refletidos no estilo BGSA, com grande diferença de densidade relativa entre a fermentação com *Sacch. cerevisiae* var. *boulardii* e com *Sacch. cerevisiae*, dado este refletido, principalmente, na graduação alcoólica registrada. Novamente, os parâmetros de cor, amargor, calorias e pH se mantiveram muito similares entre as fermentações, indo ao encontro do observado por Montenegro (2017).

Para o estilo BGSA, por apresentar uma característica desejável e perceptível de alto teor alcoólico, um processo de mostura em rampas de temperatura de favorecimento da  $\alpha$ -amilase e da  $\beta$ -amilase foram aplicadas, a fim de gerar o máximo possível de açúcares, assim como doses de sacarose acrescidas ao final da fervura, o que explica o alto consumo de açúcares e alto teor alcoólico encontrado na fermentação com *Sacch. cerevisiae*. Os resultados da fermentação com *Sacch. cerevisiae* var. *boulardii*, mostram um baixo consumo dos açúcares presentes.

Esta informação pode ser corroborada por estudos como os de De Paula *et al.* (2020), que, no desenvolvimento de uma cerveja de trigo com *Sacch. cerevisiae* var. *boulardii*, visava técnicas de melhoramento metabólico da levedura, ajustando os procedimentos desde a mostura, com controle na concentração de malte, e aplicações de rampas de temperatura de favorecimento da  $\beta$ -amilase, para fornecer alta concentração de açúcares fermentescíveis a levedura. Os autores observaram que, com as otimizações do processo, o desempenho da *Sacch. cerevisiae* var. *boulardii* foi similar ao da levedura cervejeira convencional.

Analisando os valores de extrato aparente, observa-se que, na fermentação com *Sacch. cerevisiae*, houve um consumo quase que total dos açúcares do mosto, enquanto, a *Sacch. cerevisiae* var. *boulardii* consumiu minimamente os açúcares, resultado retratado nos altos valores de extrato aparente e real encontrados.

A baixa taxa fermentativa desenvolvida pela *Sacch. cerevisiae* var. *boulardii* no estilo BGSA, pode ser explicado também por uma repressão catabólica dos altos índices de glicose presentes neste mosto, o que levou a uma taxa mais baixa de crescimento celular. Nadai (2015), ao investigar o crescimento de *Sacch. cerevisiae* var. *boulardii* em soro de leite, mostrou que, em concentrações de glicose maiores que 220 g/L, há um decréscimo na concentração celular.

Quando analisados outros tipos de bebidas fermentadas com *Sacch. cerevisiae* var. *boulardii*, a exemplo do hidromel (ALMEIDA, 2018), ou então a



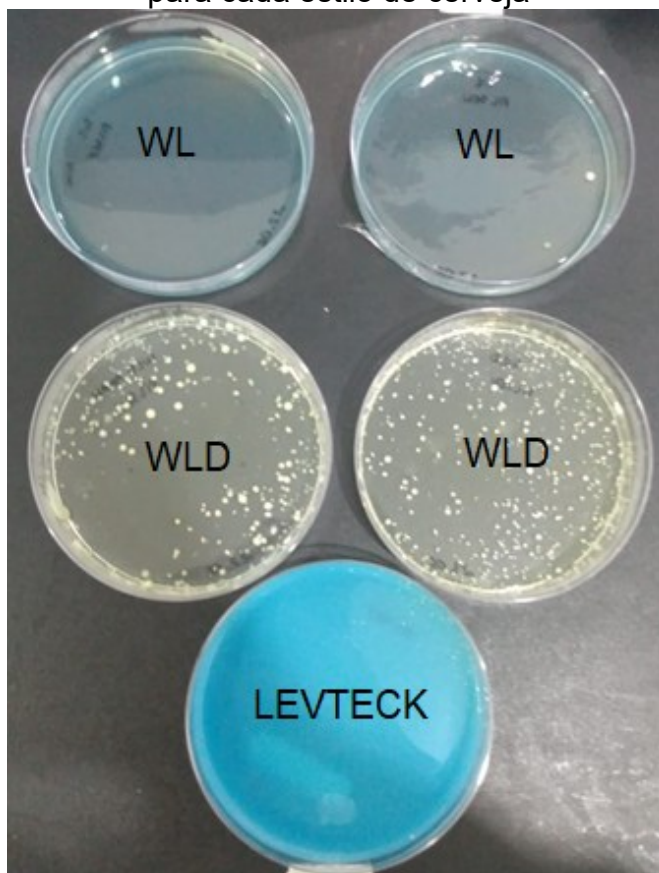
fermentação para produção de etanol puro a partir de fontes alternativas como a batata-doce (RIZZOLO, 2014), é perceptível que a levedura desempenha uma atividade metabólica similar a linhagens de *Sacch. cerevisiae*, corroborando as investigações quanto às similaridades genotípicas e fenotípicas entre as duas linhagens (BATISTA, 2015).

Na produção do hidromel, Almeida (2018) obteve valores significativamente diferentes de pH, mas sem diferença significativa de teor alcoólico na fermentação com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, em comparação com a *Sacch. cerevisiae*. Na produção de etanol a partir da batata-doce, Rizzolo (2014), contrapondo *Sacch. cerevisiae var. boulardii* com *Sacch. cerevisiae*, alcançou quantidades significativamente menores de etanol na fermentação com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, consumindo de 76 a 79% de açúcares, contra 94 a 98% em fermentação com *Sacch. cerevisiae*. Esses estudos corroboram o apresentado na presente pesquisa, onde a levedura probiótica *Sacch. cerevisiae var. boulardii* consumiu menos açúcar em todos os estilos propostos, logo, gerando produtos menos alcoólicos e com dulçor residual.

## 5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para observar possíveis contaminações, os produtos finais foram mantidos refrigerados por 6 meses, e propagados em três meios de cultura específicos. O meio WL (Figura 28) é específico para cervejas e vinhos, com características de pH e disponibilidade de nutrientes muito similares ao de um mosto de cerveja, visando exatamente o crescimento de qualquer microrganismo cervejeiro vivo, seja levedura, seja bactéria. O meio WLD (Figura 28) possui o fungicida ciclohexamida em sua composição, que é responsável por agir sobre os microrganismos cervejeiros, em especial, espécies do gênero *Saccharomyces*, não as deixando se proliferar. Neste meio de cultura, a proliferação de qualquer microrganismo, demonstra que pode ter havido contaminação da cerveja por leveduras ou bactérias não cervejeiras. Já no meio Levteck (Figura 28), há apenas o crescimento de leveduras selvagens, não *Saccharomyces*, que são espécies de leveduras ou bactérias que causam os maiores danos no produto final.

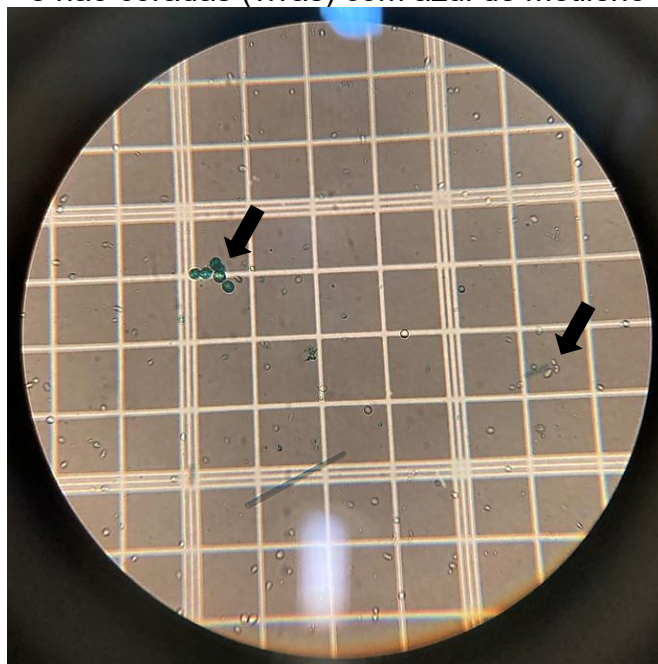
Figura 28 – Exemplo de contagem por meio de cultura realizado para cada estilo de cerveja



Fonte: Autor (2021)

Após a avaliação dos microrganismos presentes nos três estilos de cerveja, fez-se contagem em Câmara de Neubauer, corando as leveduras com azul de metileno. A Figura 29 exibe um exemplo da contagem microscópica das leveduras utilizando azul de metileno, que, quando penetra na célula, pode ou não sofrer redução. Quando não há coloração, considera-se que ele foi reduzido, se não, ele permanece azul. Isto significa que, as células coradas, não apresentam capacidade de redução do azul de metileno, enquanto as incolores, puderam reduzir o corante.

Figura 29 – Visão microscópica de leveduras coradas (mortas) e não coradas (vivas) com azul de metileno



Fonte: Autor (2021)

### 5.2.1 Microbiologia do estilo Pilsen produzido por *Sacch. var. boulardii* e *Sacch. pastorianus*

Tabela 5 - Comparação morfológica entre as colônias e microbiológica entre cervejas Pilsen produzidas por *Sacch. cerevisiae var. boulardii* e *Sacch. pastorianus*

Parâmetro analisado	<i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i>	<i>Sacch. pastorianus</i>
Contagem de células vivas /mL	43.680	12.376
Contagem de células mortas /mL	416	1352
Meio WL aeróbias (UFC/mL)	11 células Colônias alongadas	3 células Colônias alongadas
Meio WL anaeróbias (UFC/mL)	26 células Colônias alongadas	7 células Colônias alongadas
Meio WLD aeróbias (UFC/mL)	4 células Colônias alongadas	402 células Colônias amendoadas
Meio WLD anaeróbias (UFC/mL)	0	328 células Colônias amendoadas
Meio Levteck (UFC/mL)	0	46 células Colônias amendoadas

Fonte: Autor (2021)

Para o estilo Pilsen indicado pela Tabela 5, os dados demonstram um grande número de células de leveduras ainda viáveis, na faixa de  $10^4$  células vivas por mL de produto, com destaque para a cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, que demonstrou maior conservação celular que a cerveja convencional. Além disto, a análise não identificou a presença de bactérias, com crescimento apenas de leveduras.

Trabalhos que desenvolveram cervejas com a levedura *Sacch. cerevisiae var. boulardii* obtiveram contagens mais elevadas de viabilidade celular, dado os menores tempos de guarda da bebida. Aos 15 dias após o envase, Montenegro (2017), obteve resultados na casa de  $10^7$  UFC/mL, enquanto Reitenbach *et al.* (2021), aos 28 dias de armazenagem, permaneceu na faixa de  $10^6$  UFC/mL. Ambas as publicações, assim como De Paula *et al.* (2021) e o presente trabalho, alcançaram valores satisfatórios de células vivas, com quantidade suficiente para se enquadrarem em um alimento probiótico, na dose diária recomendada da bebida.

A melhor sobrevivência da levedura *Sacch. cerevisiae var. boulardii* em meios de estresse biótico, com situações como valores de pH ácido, e extremos de temperatura (SENKARCINOVA, 2019), possui como hipóteses a superexpressão de genes que sintetizam algumas proteínas de resistência (EDWARDS-INGRAM *et al.*, 2007).

Houve contaminações nas duas fermentações, com presença de células no meio WLD, onde cresceram leveduras não cervejeiras. No entanto, a fermentação com a levedura probiótica *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, apresentou um crescimento menor no meio WLD, assim como uma contagem zerada no meio Levteck, demonstrando que, de alguma maneira, a levedura controlou o crescimento de leveduras selvagens, ao contrário da cerveja fermentada com *Sacch. pastorianus*, que apresentou uma contagem elevada de leveduras selvagens no meio Levteck.

### 5.2.2 Microbiologia do estilo IPA produzido por *Sacch. var. boulardii* e *Sacch. cerevisiae*

Tabela 6 - Comparação morfológica entre as colônias e microbiológica entre cervejas IPA produzidas por *Sacch. cerevisiae var. boulardii* e *Sacch. cerevisiae*

Parâmetro analisado	<i>Sacch. cerevisiae var. boulardii</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
Contagem de células vivas (/mL)	39.832	10.500
Contagem de células mortas (/mL)	2.496	1.352
Meio WL aeróbias (UFC/mL)	4 células Colônias amendoadas	181 células Colônias amendoadas
Meio WL anaeróbias (UFC/mL)	8 células Colônias amendoadas	6 Células Colônias alongadas
Meio WLD aeróbias (UFC/mL)	0	369 células Colônias amendoadas
Meio WLD anaeróbias (UFC/mL)	0	0
Meio Levteck (UFC/mL)	0	0

Fonte: Autor (2021)

O mesmo padrão microbiológico foi observado nas cervejas de estilo IPA mostrado na Tabela 6, quanto a contagem de células de levedura viáveis, com maiores quantidades de células de *Sacch. cerevisiae var. boulardii* por mL de produto final, em comparação com as contagens registradas na cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae*. Para o presente estudo, uma contagem elevada de células de *Sacch. cerevisiae var. boulardii* é pretendida, uma vez que, para que o produto apresente o diferencial probiótico, é necessário a presença e viabilidade de um grande número de células que desempenharam esta função.

Produzindo dois estilos Pale Ale, um com fermentação mista de *Sacch. cerevisiae var. boulardii* e *Sacch. cerevisiae*, e outro fermentado apenas com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, em 60 dias após a produção da cerveja, Moser (2017), considerando um consumo de 300 mL da bebida, atingiu níveis de  $10^8$  UFC do probiótico. A autora ainda verificou que, dado o baixo grau de fermentação da *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, a quantidade de células seguiu aumentando por 45

dias após o envase da bebida, pois ainda existiam muitos açúcares presentes no mosto.

Mulero-Cerezo *et al.* (2019), com 45 dias de produção da cerveja, realizou a contagem microbiológica da levedura *Sacch. cerevisiae var. bouldarii* assim como da *Sacch. cerevisiae*, alcançando valores de  $10^6$  e  $10^5$ , respectivamente. Essa diferença celular foi facilmente percebida na comparação visual dos tubos de Falcon utilizados para a diluição seriada executada por Mulero-Cerezo *et al.* (2019), com uma turbidez acentuada no mosto fermentado com *Sacch. cerevisiae var. bouldarii*.

Ao referir-se as contagens em meio WL realizadas neste estudo, é possível identificar que há crescimento de leveduras cervejeiras, demonstrando sua presença ao final do processo. No entanto, quando se refere ao meio WLD, não é pretendida a presença de nenhuma célula, fato que ocorreu apenas na fermentação com *Sacch. cerevisiae var. bouldarii*, enquanto para a fermentação com *Sacch. cerevisiae* há uma contagem elevada de colônias, categorizando um crescimento elevado de leveduras não cervejeiras.

### 6.1.1 Microbiologia do estilo BGSA produzido por *Sacch. var. bouldarii* e *Sacch. cerevisiae*

Tabela 7 – Comparação morfológica entre as colônias e microbiológica entre cervejas BGSA produzidas por *Sacch. cerevisiae var. bouldarii* e *Sacch. cerevisiae*

Parâmetro analisado	<i>Sacch. cerevisiae var. bouldarii</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
Contagem de células vivas (/mL)	29.848	7.384
Contagem de células mortas (/mL)	208	3.016
Meio WL aeróbias (UFC/mL)	68 células Colônias arredondadas	2 células Colônias alongadas
Meio WL anaeróbias (UFC/mL)	45 células Colônias arredondadas	0
Meio WLD aeróbias (UFC/mL)	0	17 células Colônias arredondadas
Meio WLD anaeróbias (UFC/mL)	0	0
Meio Levteck (UFC/mL)	0	0

Fonte: Autor (2021)

Da mesma maneira que os resultados apresentados anteriormente, a Tabela 7 elucida que, no estilo BGSA, foi possível identificar um número maior de células vivas na cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, em comparação com a cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae*. Este fato pode ser explicado pela graduação alcoólica apresentada na cerveja fermentada com a levedura padrão, que tende a causar estresses metabólicos na levedura.

Assim como o demonstrado por inúmeros estudos já apresentados, Capece *et al.* (2018), realizando fermentação mista em mosto com malte Pilsen, utilizando cultura de *Sacch. cerevisiae var. boulardii* como starter, obtiveram um número de células viáveis da levedura entre  $10^6$  a  $10^7$  UFC por mL. Kitamura (2013) produziu biomassa utilizando melaço de cana-de-açúcar como substrato, onde alcançaram uma concentração máxima de  $3,6 \times 10^8$  UFC/mL, com um tempo de fermentação de 48 horas, o que demonstra que a *Sacch. cerevisiae var. boulardii* tem um início de crescimento tardio sob aeração, quando comparado com a *Sacch. cerevisiae*, que tem máximo potencial por volta das 28 horas de cultivo (SANTOS *et al.*, 2018). Essa informação pode explicar por que a graduação alcoólica da BGSA fermentada com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, foi tão inferior a fermentação com *Sacch. cerevisiae*, uma vez que as duas tiveram o mesmo tempo do processo.

Quando analisadas as contagens nos meios WL e WLD, é perceptível que as cervejas fermentadas com *Sacch. cerevisiae var. boulardii* não apresentaram nenhum tipo de contaminação por leveduras ou bactérias no meio WLD, e com alta contagem de colônias nos meios WL, indicando levedura cervejeira viável. Já na fermentação com *Sacch. cerevisiae*, possivelmente pelo percentual alcoólico apresentado por esta cerveja, não houve crescimento de contaminantes selvagens no meio Levteck, sendo registrada apenas baixa quantidade de colônias de leveduras não cervejeiras no meio WLD.

Não se tem total conhecimento sobre as enzimas, proteínas e compostos produzidos pela *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, mas pelas análises microbiológicas, fica evidente que a levedura parece desenvolver algum tipo de domínio sobre microrganismos contaminantes, já que em nenhum dos meios foi detectado bactérias, ou outras leveduras selvagens.

Dentre os muitos estudos referentes ao genoma da *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, Silva *et al.* (1987) e Vandenberg (1993), apontam que o probiótico pode produzir compostos inibitórios de crescimento de patógenos, tais como ácidos

orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Eles também podem reduzir o número de células patogênicas viáveis, e afetar o metabolismo microbiano, interferindo na produção de toxinas (ROLFE, 2000). Brandão *et al.* (1998) traz resultados que confirmam a produção de uma proteína de 120 kDa, que pode neutralizar o efeito de toxinas bacterianas, relacionando a capacidade dessa proteína de se ligar a um receptor que regula níveis intracelulares de adenilato ciclase, podendo inclusive aderir a toxina a sua própria membrana.

Essas informações são relacionadas, em grande parte dos casos, a ação da *Sacch. cerevisiae var. boulardii* no intestino do hospedeiro, não havendo muitos estudos referentes ao metabolismo da levedura perante a fermentação para produção de etanol, como no caso do trabalho em questão. No entanto, alguns desses dados genotípicos podem explicar parcialmente a preservação das cervejas, contra a contaminação de outras leveduras, como o obtido neste estudo.

### 6.1.2 Ingestão diária recomendada

Com os resultados de percentual alcoólico e de quantidade de leveduras viáveis em cada um dos estilos, é possível analisar as doses diárias recomendadas da cerveja, considerando as indicações de consumo de etanol e de probiótico, apresentados nos itens 3.1.3 e 3.4.2, respectivamente. Importante ressaltar que as contagens foram realizadas em produto armazenado durante 6 meses sob refrigeração, a fim de avaliar o tempo de conservação da bebida, assim como do possível potencial probiótico da cerveja.

Considerando a densidade de 0,789 g/mL do etanol, e um **consumo diário** recomendado de 15 gramas de álcool para mulheres e 30 gramas de álcool para homens, com a graduação alcoólica apresentada pelas fermentações, é possível calcular o volume recomendado de consumo para cada estilo. Já com as contagens em câmara de Neubauer, o número de leveduras vivas permite estimar quanto do microrganismo probiótico está ativo no volume recomendado de ingestão da bebida, o que indicará, ou não, o potencial probiótico, com base nas orientações de consumo diário deste alimento funcional.

O cálculo realizado é demonstrado na Fórmula 2:



$$g_{C_2H_5OH} = \frac{V_{(mL)} \cdot C_2H_5OH(\% v/v)}{100} \cdot d_{C_2H_5OH}$$

Onde “g” é a ingestão diária recomendada de etanol a cada sexo, “V” é o volume indicado de ingestão para a cerveja em questão, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH é o teor alcoólico da cerveja analisada, e “d” é a densidade do etanol. Logo, a quantidade de cerveja em mL que deve ser tomada vai depender apenas do sexo e da concentração de etanol da cerveja. A fórmula acima torna-se-ia:

$$V_{mL} = (g \cdot 100) / (d_{Etanol} \cdot \%Etanol)$$

Para a cerveja Pilsen elaborada com a linhagem *Sacch. cerevisiae var. boulandii*, por exemplo, a quantidade de cerveja para a mulher seria de:

$$15 \cdot 100 / (0.789 \cdot 3.08) = 617,25 \text{ mL}$$

Enquanto que, para homens teríamos:

$$0 \cdot 100 / (0.789 \cdot 3.08) = 1234,507 \text{ mL}$$

As Tabelas 8, 9 e 10 representam o percentual alcoólico de cada estilo de cerveja, e o número de células vivas por mL de produto, permitindo assim, calcular a ingestão diária recomendada de cada estilo de cerveja, categorizando-a por sexo.

### 6.1.2.1 Pilsen

Tabela 8 – Consumo de cervejas no estilo Pilsen produzidas por *Sacch. cerevisiae var. boulandii* e *Sacch. pastorianus*

	<b><i>Sacch. cerevisiae</i> <i>var. boulandii</i></b>	<b><i>Sacch. pastorianus</i></b>
Percentual alcoólico (% v/v)	3,08	4,30
Células viáveis (/mL)	43.680	12.376
Ingestão recomendada (mL)	♀ = 617,25 ♂ = 1.234,51	♀ = 442,13 ♂ = 884,25

Fonte: Autor (2021)

Com 43.680 células vivas presentes por mL de cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, e uma ingestão recomendada deste estilo em 617,25 mL para mulheres, e 1.234,51 mL para homens, com base em sua graduação alcoólica, as mulheres consumiriam  $2,67 \times 10^7$  UFC de probióticos nesta bebida, enquanto que os homens consumiriam  $5,39 \times 10^7$  UFC do produto.

#### 6.1.2.2 IPA

Tabela 9 – Consumo de cervejas no estilo IPA produzidas por *Sacch. cerevisiae var. boulardii* e *Sacch. cerevisiae*

	<b><i>Sacch. cerevisiae</i> <i>var. boulardii</i></b>	<b><i>Sacch. cerevisiae</i></b>
Percentual alcoólico (% v/v)	4,16	4,38
Células viáveis (/mL)	39.832	10.500
Ingestão recomendada (mL)	♀ = 457,00 ♂ = 914,01	♀ = 434,05 ♂ = 868,10

Fonte: Autor (2021)

No estilo IPA, dado a presença mais acentuada dos lúpulos, a quantidade de células vivas ficou reduzida, se fixando num total de 39.832 células vivas presentes por mL de cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*. A ingestão recomendada deste estilo é de 457 mL para mulheres, e 914 mL para homens. Por sua graduação alcoólica, as mulheres consumiriam  $1,82 \times 10^7$  UFC de probiótico na bebida, enquanto que os homens consumiriam  $3,64 \times 10^7$  UFC no produto.

#### 6.1.2.3 BGSA

Tabela 10 – Consumo de cervejas no estilo BGSA produzidas por *Sacch. cerevisiae var. boulardii* e *Sacch. cerevisiae*

	<b><i>Sacch. cerevisiae</i> <i>var. boulardii</i></b>	<b><i>Sacch. cerevisiae</i></b>
Percentual alcoólico (% v/v)	3,44	8,82
Células viáveis (/mL)	29.848	7.384
Ingestão recomendada (mL)	♀ = 552,66 ♂ = 1.105,31	♀ = 215,55 ♂ = 431,10

Fonte: Autor (2021)

A BGSA apresentou 29.848 células vivas presentes por mL de cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*. Neste estilo, baseado na graduação alcoólica que apresenta, a ingestão recomendada é de 552,66 mL para mulheres, e 1.105,31 mL para homens. Nestes volumes de cerveja, são encontradas  $1,65 \times 10^7$  UFC de probiótico na bebida para mulheres, enquanto que, para os homens, as quantidades são de  $3,30 \times 10^7$  UFC do produto.

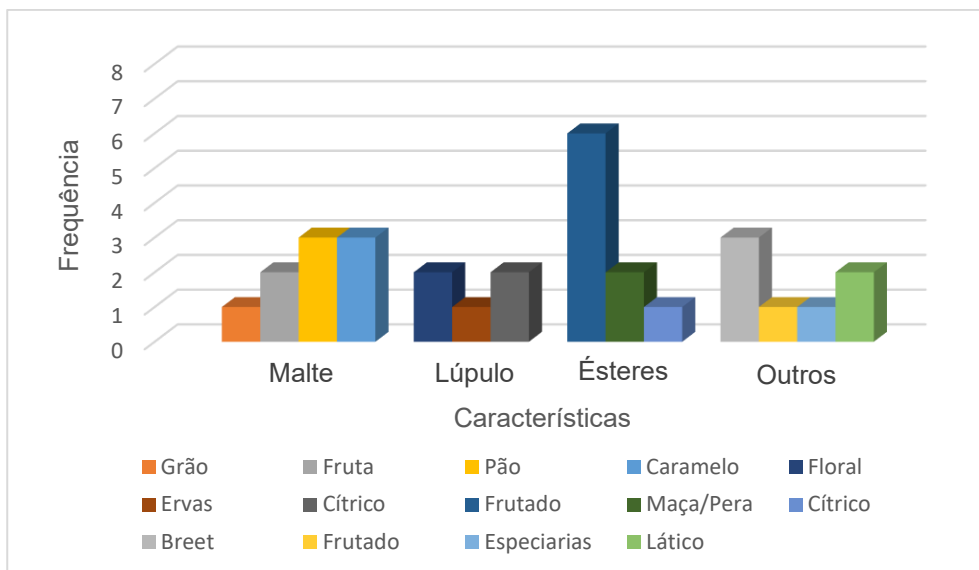
Em todos os estilos de cerveja testados, há uma grande quantidade de leveduras vivas, mesmo após 6 meses de armazenagem do produto. Para as ingestões diárias recomendadas da bebida, tanto para mulheres quanto para homens, existe levedura suficiente para prover ao produto o potencial probiótico.

## 6.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES SENSORIAIS

Com base em fichas sensoriais organizadas por estilo, um grupo de oito avaliadores treinados, detectou e registrou as características observadas quanto a diferentes parâmetros, segundo o BJCP. Os aromas do produto final foram separados em malte, lúpulo, ésteres e outros. As características do paladar dividiram-se entre malte, lúpulo, ésteres, final e outros.

### 6.2.1 Análise sensorial do estilo Pilsen produzido por *Sacch. var. boulardii* e *Sacch. pastorianus*

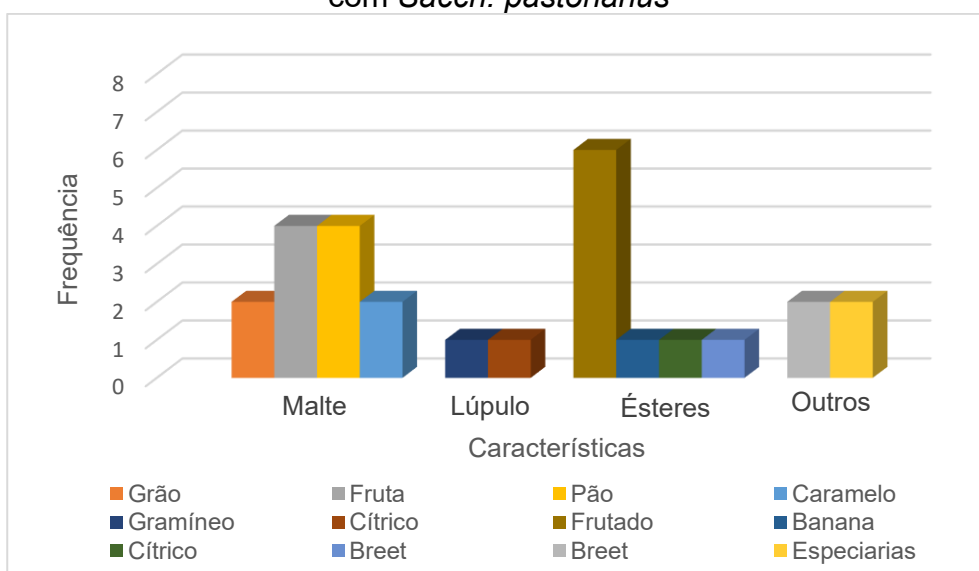
Gráfico 1 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo Pilsen com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*



Fonte: Autor (2021)

Considerando as definições do BJCP para uma cerveja Pilsen, aromas de milho e floral são os esperados, enquanto nesta fermentação, foram destacados aromas de pão e caramelo, assim como o frutado. Isto fica evidente no Gráfico 1, que registra as maiores percepções dos avaliadores para o estilo Pilsen com *Sacch. cerevisiae* var. *boulardii*.

Gráfico 2 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo Pilsen com *Sacch. pastorianus*



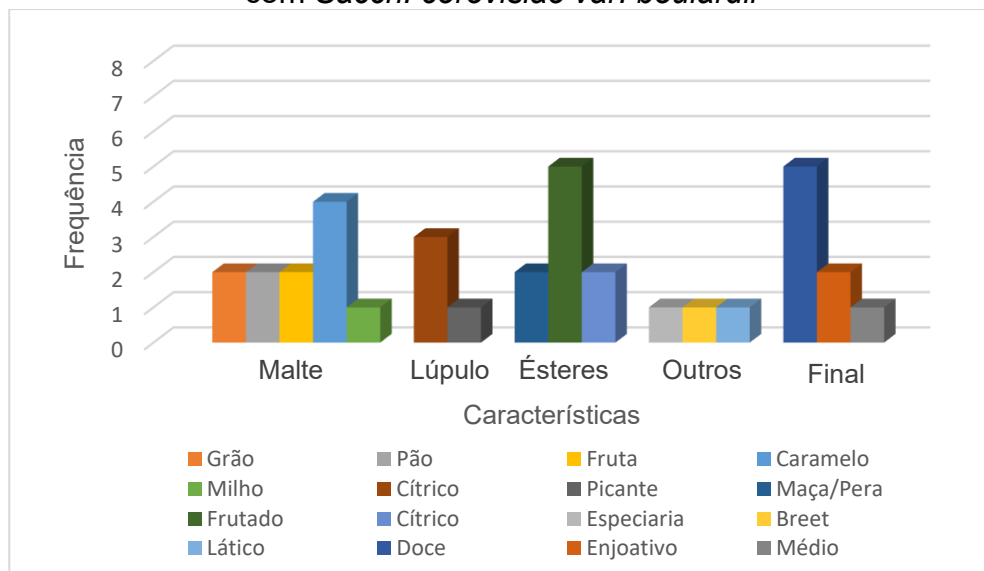
Fonte: Autor (2021)

Avaliando o proposto pelo BJCP para uma Pilsen, a fermentação convencional também não se enquadrou eficientemente no estilo, como mostra o Gráfico 2. No entanto, quando comparadas as fermentações com a levedura

convencional *Sacch. pastorianus* e a levedura probiótica *Sacch. cerevisiae var. boullardi*, muitas similaridades foram observadas pelos avaliadores.

Na comparação, os aromas advindos do malte de grão, fruta, pão e caramelo foram igualmente observadas, ficando evidente para um número maior de avaliadores na fermentação com *Sacch. pastorianus*. Já para a característica aromática do lúpulo, a fermentação com *Sacch. cerevisiae var. boullardi* gerou aromas distintos e mais destacados. Se tratando dos ésteres, seis avaliadores detectaram o aroma frutado nas duas fermentações, também com registro do aroma cítrico em comum. Além destes, foram igualmente sentidos aromas de especiarias e *Breetanomyces*, porém, este tipo de contaminação não foi observada nas análises microbiológicas da cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae var. boullardi*.

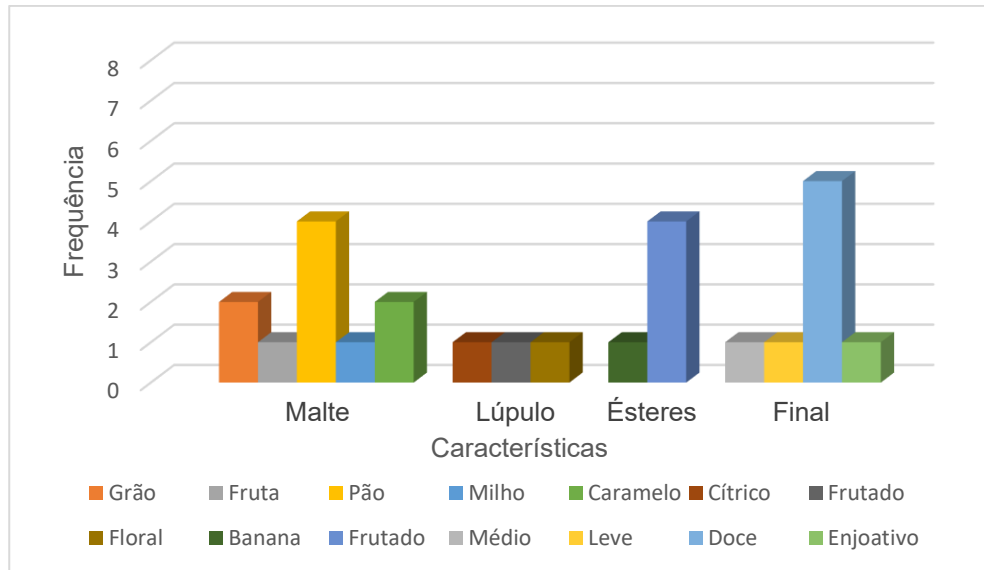
Gráfico 3 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo Pilsen com *Sacch. cerevisiae var. boullardi*



Fonte: Autor (2021)

Seguindo as características aromáticas observadas pelos avaliadores, o Gráfico 3 demonstra que, ao paladar, está fermentação também não se enquadrava no estilo proposto pelo BJCP. Esperando-se sabores de granulado, milho, condimento e floral, ficou bastante evidente aos avaliadores os sabores de caramelo, cítrico, frutado e doce, este último pretendido ao estilo.

Gráfico 4 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo Pilsen com *Sacch. pastorianus*



Fonte: Autor (2021)

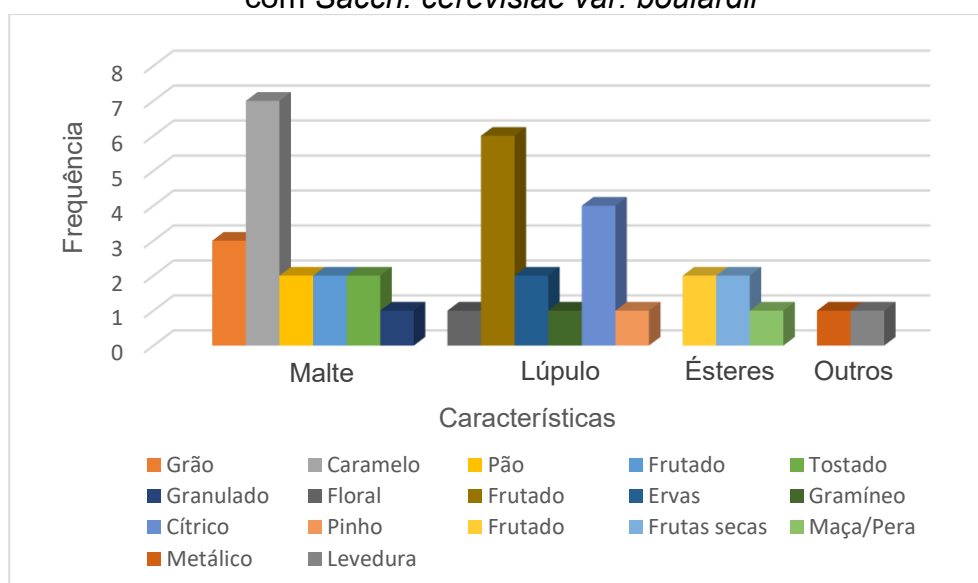
Na fermentação com a levedura convencional, o Gráfico 4 revela que o mesmo foi observado, com destaque ao paladar para o pão, frutado e doce, também se categorizando fora do estilo por seis avaliadores, quando considerados critérios estabelecidos pelo BJCP. Entre as fermentações, semelhanças foram novamente detectadas.

Na categoria do malte, foram sentidos os mesmos sabores de grão, fruta, pão, milho e caramelo, assim como um sabor cítrico advindo do lúpulo. Ésteres frutados também foram detectados nas duas fermentações. Quando examinado o final ao paladar, o doce prevaleceu para cinco avaliadores tanto para a cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae var. boullardii*, quanto para a cerveja fermentada com *Sacch. pastorianus*.

Para os oito avaliadores, a fermentação com *Sacch. cerevisiae var. boullardii* não se enquadrou dentro do estilo Pilsen, e para seis avaliadores, a fermentação com *Sacch. pastorianus* também não se categoriza como uma Pilsen, o que não significando baixa qualidade do produto, principalmente quando comparado as características sensoriais observadas entre as fermentações. Para maiores intensidades de aromas e sabores já identificados com *Sacch. cerevisiae var. boullardii*, novos tempos de fermentação devem ser analisados, pois estes dados demonstram bom potencial fermentativo para a levedura probiótica estudada na presente pesquisa, quando considerada as similaridades aromáticas e sensoriais apresentadas nas duas cervejas, mesmo que ambas tenham se apresentado fora do estilo proposto.

### 6.2.2 Análise sensorial do estilo IPA produzido por *Sacch. var. boulardii* e *Sacch. cerevisiae*

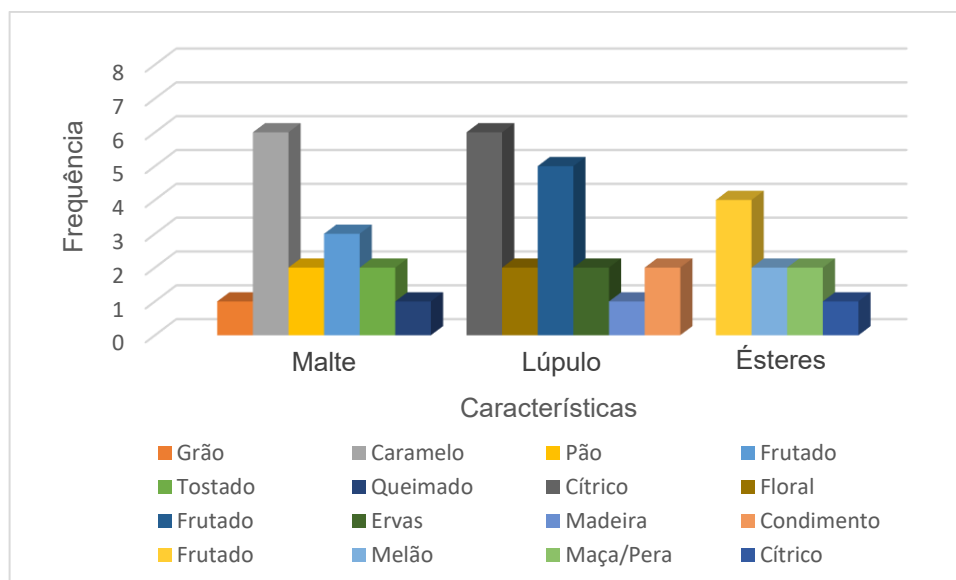
Gráfico 5 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo IPA com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*



Fonte: Autor (2021)

No aroma do estilo IPA, é esperado a presença acentuada de lúpulos com notas de cítrico, floral, pinho, condimento e frutado, sendo que os avaliadores não registraram o condimento, mas puderam detectar notas de gramíneo e ervas, não pretendidos ao estilo, como indica o Gráfico 5, demonstrando que a utilização da *Sacch. cerevisiae var. boulardii* não produz uma IPA aromática característica.

Gráfico 6 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo IPA com *Sacch. cerevisiae*



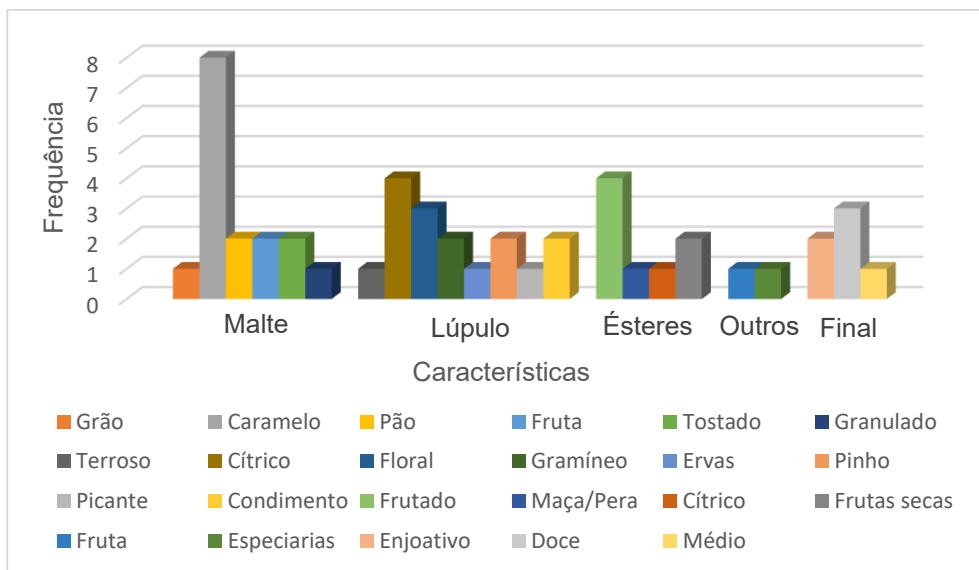
Fonte: Autor (2021)

Já o Gráfico 6 aponta que, para esta levedura convencional ao estilo IPA, alguns avaliadores puderam detectar o aroma de condimento, além de evidenciarem o aroma cítrico. No malte, fortemente identificado está o aroma de caramelo, sendo que, para se enquadrar como uma IPA, o desejado seria o destaque de granuloso. Nesta fermentação apenas dois avaliadores consideraram a receita fora do estilo.

Quando as fermentações são comparadas entre si, novamente são verificadas diversas semelhanças. O aroma de caramelo foi observado por sete avaliadores na cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, enquanto seis avaliadores também o registraram na cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae*. Os aromas de grão, pão, frutado e tostado, advindos do malte, também foram reconhecidos, assim como a variedade aromática de lúpulos, com identificações de cítrico, floral, frutado e ervas nas duas fermentações. Tratando-se de ésteres, os aromas em comum foram os de frutado e maçã/pera, demonstrando real semelhança aromática entre as fermentações.

Gráfico 7 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo IPA com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*

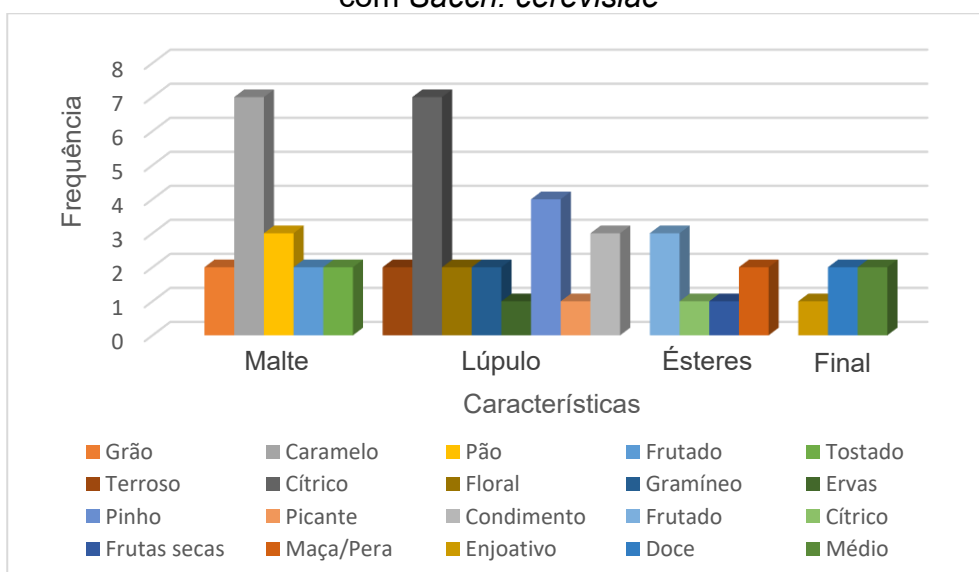




Fonte: Autor (2021)

Ao paladar, os avaliadores puderam detectar sabores não pretendidos no estilo, como de gramíneo e frutado, com destaque para o caramelo, sendo suavemente esperado, mas fortemente sentido pelos oito avaliadores, segundo o observado no Gráfico 7. Ainda pode ser percebido uma complexa gama de lúpulos, com sabores de cítrico, floral, pinho e condimento detectados pelos avaliadores, e pretendidos ao estilo. No entanto, o dulçor residual notado por alguns avaliadores, também corrobora as irregularidades nesta cerveja, a categorizando fora do estilo IPA.

Gráfico 8 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo IPA com *Sacch. cerevisiae*



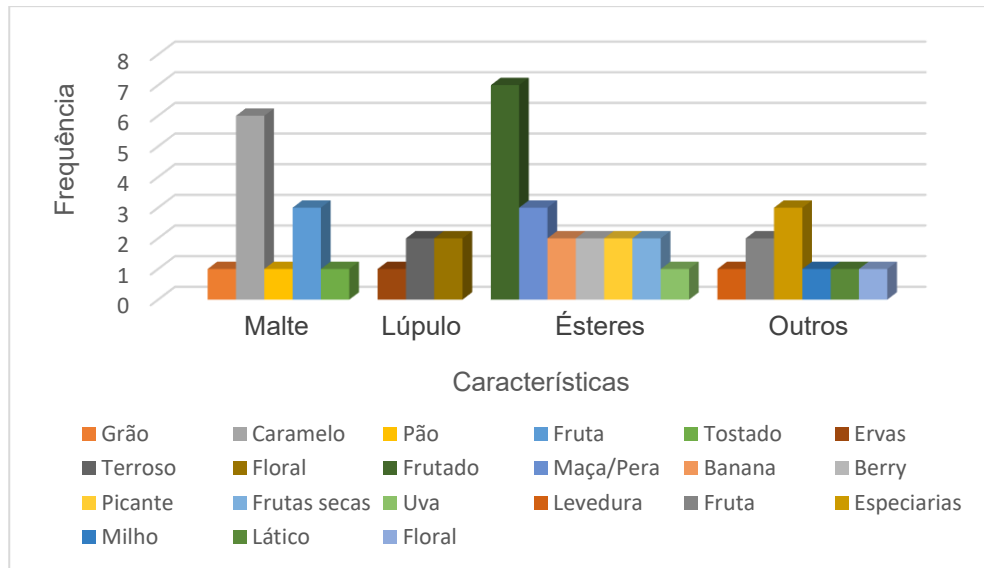
Fonte: Autor (2021)

Com a levedura padrão para uma cerveja IPA, o Gráfico 8 aponta os sabores observados pelos avaliadores, que condizem melhor com o esperado para o estilo. Mesmo com fortes identificações de malte caramelo e lúpulo frutado, sabores não quistos no estilo, seis avaliadores consideraram está fermentação como uma IPA característica. Há a presença de uma complexidade de lúpulos que são indispensáveis para uma IPA, como as notas de floral e condimento. Da mesma maneira que o observado na fermentação com a *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, a fermentação de uma IPA com esta linhagem de *Sacch. cerevisiae* também deixou um dulçor residual no produto, característica não desejada no estilo.

Novamente, entre as fermentações foram reveladas várias semelhanças, como o caramelo advindo do malte, que foi fortemente detectado. Os avaliadores ainda puderam encontrar sabores de pão, frutado e tostado de malte nas duas fermentações. Nos lúpulos, é possível identificar que alguns avaliadores constataram os mesmos sabores, com maior destaque para a fermentação com *Sacch. cerevisiae*, onde um maior número de avaliadores identificou sabores mais complexos de lúpulo. O final da cerveja também apresentou um corpo médio com dulçor residual para as duas fermentações, dados que demonstram que, nas condições deste experimento, uma cerveja IPA produzida com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, apresentara muitas semelhanças sensoriais com uma cerveja fermentada com *Sacch. cerevisiae*, podendo se enquadrar no estilo se dado o tempo para fermentação e maturação adequados desta levedura.

### 6.2.3 Análise sensorial do estilo BGSA produzido por *Sacch. var. boulardii* e *Sacch. cerevisiae*

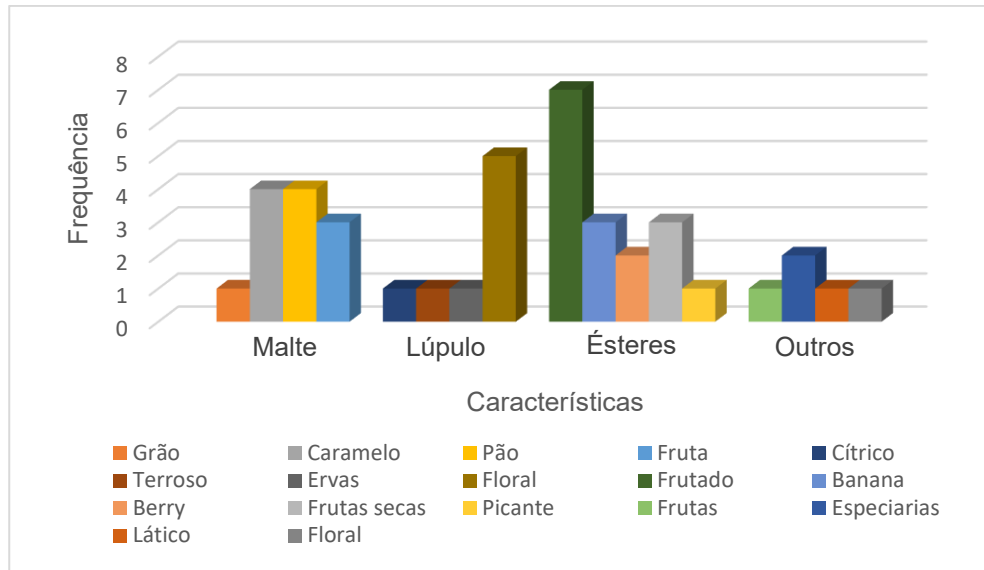
Gráfico 9 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo BGSA com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*



Fonte: Autor (2021)

Dentro do estilo Belgian Golden Strong Ale, uma complexidade de aroma é esperada, como um granulado doce advindo do malte, encontrado por apenas um avaliador. O destaque registrado pelo Gráfico 9 está no caramelo e nos ésteres de pera e maçã, identificados por três avaliadores, o que indica suavidade nesta característica, e lúpulo floral, com apenas dois avaliadores o registrando. Como individualidade do estilo, os álcoois devem ser perceptíveis desde o aroma, atributo que não foi notado pelos avaliadores na fermentação com esta linhagem de levedura.

Gráfico 10 – Características sensoriais aromáticas detectadas no estilo BGSA com *Sacch. cerevisiae*

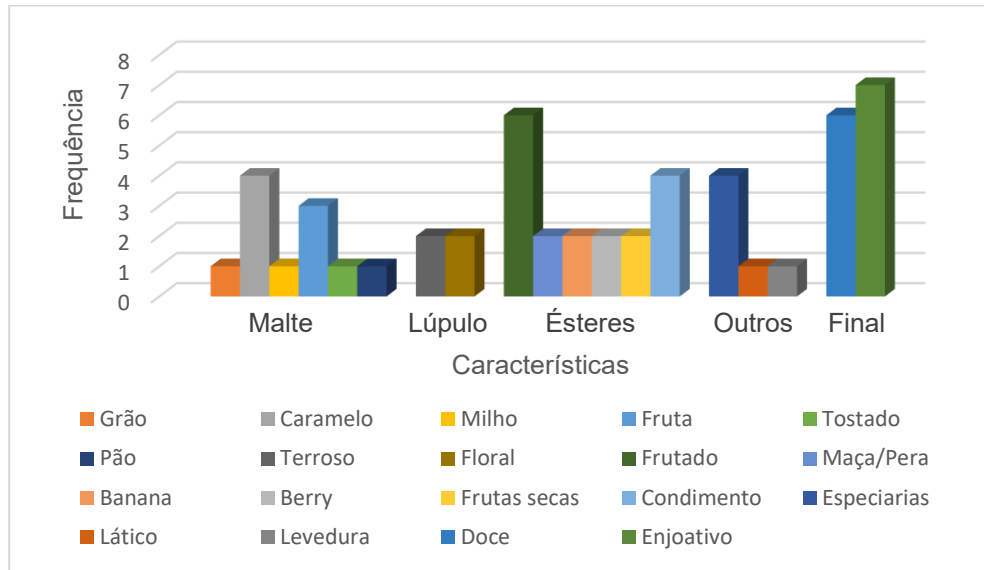


Fonte: Autor (2021)

O Gráfico 10 demonstra perfis aromáticos desejados no estilo BGSA, como o lúpulo floral e o éster frutado, fatos que foram observados pelos avaliadores, sendo que todos categorizaram está Belgian dentro do estilo proposto.

Quando comparada as qualidades aromáticas registradas nas duas fermentações, também foram observadas algumas semelhanças, mesmo que a *Sacch. cerevisiae var. boulardii* não tenha demonstrado grande competência na produção de uma BGSA. Nos aromas de malte, a fermentação padrão registrou destaque no caramelo e no pão, enquanto que na fermentação com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*, o mais perceptível foram os aromas de caramelo e fruta. Para os lúpulos, exigidos em complexidade para o estilo, as duas fermentações apontaram as similaridades do floral, de ervas e de terroso. O éster frutado é um aroma muito procurado neste estilo, sendo detectado fortemente nas duas fermentações, assim como os aromas de frutas vermelhas, frutas secas, e até o picante.

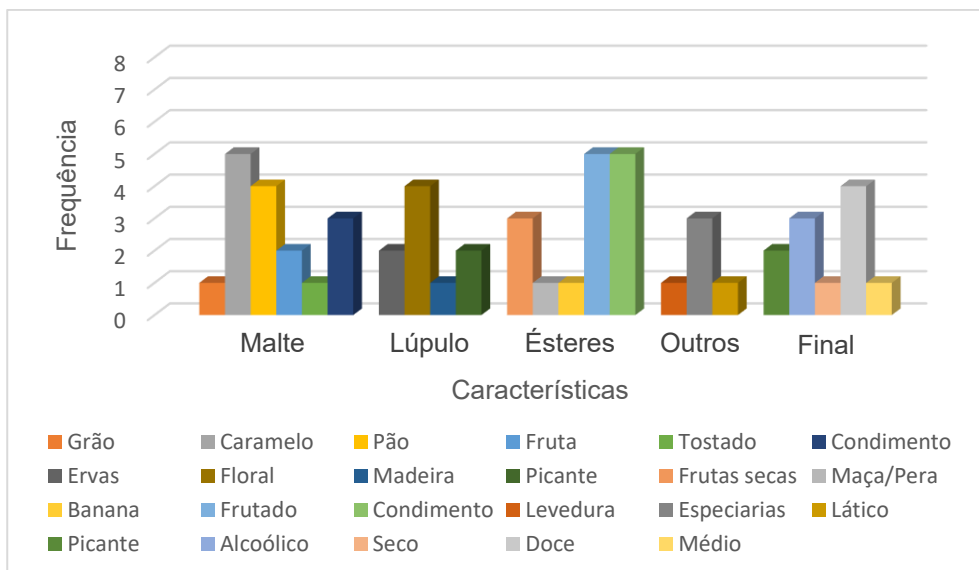
Gráfico 11 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo BGSA com *Sacch. cerevisiae var. boulardii*



Fonte: Autor (2021)

Segundo o ilustrado no Gráfico 11, os avaliadores perceberam ao paladar os maltes de caramelo e de fruta, os ésteres frutado e de condimento, especiarias, pouquíssimo álcool e um final enjoativo, dado a quantidade de açúcar simples presente na receita, e não metabolizado eficientemente pela *Sacch. cerevisiae var. boulardii*. Pela falta de atributos perante o BJCP, todos os avaliadores consideraram que esta fermentação não gerou um estilo característico de Belgian Golden Strong Ale.

Gráfico 12 – Características sensoriais ao paladar detectadas no estilo BGSA com *Sacch. cerevisiae*



Fonte: Autor (2021)

A fermentação com *Sacch. cerevisiae* gerou sabores padrões de uma BGSA, como o malte de caramelo, o lúpulo floral, os ésteres de frutado e de condimento, e um final suavemente doce e alcoólico, características apontadas no Gráfico 12. Todos os oito avaliadores consideraram esta fermentação com a levedura padrão, dentro do estilo proposto.

Em uma análise sensorial geral, a fermentação com *Sacch. cerevisiae var. boulandii* gerou uma cerveja fora do estilo Belgian Golden Strong Ale, porém, igualmente como observado para os outros estilos, as características sensoriais das duas fermentações foram muito semelhantes, mas os aromas e sabores ficaram melhor destacados na fermentação com *Sacch. cerevisiae*.

Nos aromas advindos do malte, os avaliadores identificaram grão, caramelo, fruta, tostado e pão em comum, mas a fermentação com *Sacch. cerevisiae var. boulandii* não conseguiu trazer o sabor destacado do condimento. Sobre os lúpulos, a fermentação com *Sacch. cerevisiae* conferiu maiores complexidades, trazendo as ervas, o floral, a madeira e o picante, enquanto a levedura não comercial apresentou apenas o terroso e o floral, mas em baixa intensidade. Quanto aos ésteres, houve alguma discrepância, pois, a fermentação com a levedura *Sacch. cerevisiae var. boulandii* destacou os aromas de maçã/pera, banana e berry, pouco ou nada identificados na fermentação com *Sacch. cerevisiae*, mas em comum, gerou grande aroma de frutado e condimento. O final doce também foi grandemente reconhecido nas duas fermentações, no entanto, a *Sacch. cerevisiae var. boulandii* gerou pouquíssimo álcool, um ponto muito negativo já que, uma característica

imprescindível ao estilo, é a forte presença alcóolica, percebida satisfatoriamente na fermentação com uma característica imprescindível ao estilo *Sacch. cerevisiae*.

Por se tratar de um processo caseiro, logo sem pasteurização, existem maiores chances de contaminações, como registrado nas cervejas fermentadas com as leveduras padrões. Isto pode explicar porque houveram algumas discrepâncias entre o padrão estabelecido pelo BJCP, e as cervejas produzidas na pesquisa. No entanto, pode-se observar que as fermentações com as leveduras padrões geraram um sensorial muito próximo do padrão para os estilos propostos. Em contrapartida, a fermentação com a *Sacch. cerevisiae var. boulardii* gerou uma complexidade sensorial, assim como pretendido nos estilos, porém em toques mais suaves, o que pode significar que, a *Sacch. cerevisiae var. boulardii* possui um potencial fermentativo interessante na produção de cervejas artesanais, mas necessita de maiores tempos de fermentação e maturação, para assim gerar mais destaque aos aromas e sabores já identificados.

Mulero-Cerezo *et al.* (2019), ao realizar análises sensoriais de uma cerveja produzida a base de malte Pale Ale, fermentado com *Sacch. cerevisiae var. boulardii* e com *Sacch. cerevisiae*, avaliaram os parâmetros de aparência, aroma, sabor e amargura, obtendo produtos muito similares na avaliação de 10 especialistas, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre as fermentações.

Senkarcinova *et al.* (2019) testaram a taxa específica de crescimento da levedura em diferentes condições de fontes de açúcar, temperatura, teores de etanol e concentrações de lúpulo, e ao final do estudo, realizou uma avaliação sensorial com 10 profissionais, que identificaram traços de frutado, cravo e ácido.

Na fermentação mista, 50 avaliadores não treinados foram recrutados, sendo que a avaliação se fez por escala hedônica de 9 pontos para os atributos de aparência, aroma, sabor, corpo, acidez e cor (REITENBACH *et al.*, 2021). A análise estatística realizada pelos autores mostrou que a cerveja produzida com adição de *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, teve a menor aceitação pelos consumidores, ficando com pontuação mais baixa em relação a cervejas comerciais.

Além de análises sensoriais padrão, alguns autores apresentam a geração de compostos fenólicos pela *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, os quais são distintos dos compostos produzidos por linhagens cervejeiras. Alguns desses compostos, além de influenciarem principalmente no aroma das cervejas, ainda podem atuar como inibidores do crescimento de alguns microrganismos

(HOFFMANN *et al.*, 2012; STANGARLIN *et al.*, 2010). Mulero-Cerezo *et al.* (2019), utilizando cromatografia para identificar perfis de fenóis normalmente encontrados nas cervejas comerciais, buscou comparar esses padrões com os obtidos da fermentação com *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, obtendo resultados muito semelhantes entre os perfis. Os autores ainda identificaram um aumento da atividade redox na cerveja produzida com *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, vinculando esta propriedade a fenóis produzidos, mas não caracterizados.

Dadas as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais obtidas nos diferentes estilos de cerveja, a linhagem de *Sacch. cerevisiae var. boulardii* pode ser categorizada em uma Ale Fenólica, típica de cervejas ales belgas e weizen alemãs (WHITE; ZAINASHEFF, 2020).



## 7 RECURSOS

Para o desenvolvimento deste projeto, foram necessários recursos materiais, financeiros, humanos, e científicos, como exemplificado tópicos 5.1, 5.2 e 5.3.

### 7.1 RECURSOS HUMANOS

A participação na elaboração do projeto envolveu uma doutora da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, que orientou e auxiliou no entendimento de cada etapa da pesquisa, um doutor que contribuiu na formulação inicial do tema, e um mestre cervejeiro que ficou responsável pela produção de todas as cervejas.

Também presentes estavam dois professores doutores da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul remediando a parte experimental, uma mestranda da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul e funcionária da Cervejaria Imigração, que participou integralmente da realização das análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, com o grupo de degustadores convocado por ela.

### 7.2 RECURSOS CIENTÍFICOS

As análises físico-químicas foram necessárias para identificar se há correlação entre os parâmetros encontrados nas cervejas fermentadas, com leveduras convencionais e com a *Sacch. cerevisiae var. boulardii*.

Na parte microbiológica, análises foram cruciais para comprovar o potencial probiótico da cerveja, através da detecção da viabilidade metabólica da *Sacch. var. boulardii*.

Já na questão sensorial, o objetivo foi avaliar, através de degustadores treinados, se a *Sacch. cerevisiae var. boulardii* consegue fermentar cervejas que se enquadrem nos parâmetros de estilos propostos pelo BJCP.

### 7.3 RECURSOS MATERIAIS E FINANCEIROS

Elucidados nas Tabelas 11 e 12, os recursos materiais e financeiros foram categorizados entre os ingredientes da receita de cada estilo de cerveja, e os utensílios necessários no processo.

Tabela 11 – Custos em insumos cervejeiros

Insumos cervejeiros	Quantidades	Valores
Malte tipo Pilsen	11.400 gramas	R\$ 86,60
Malte tipo Vienna	1.000 gramas	R\$ 8,40
Malte tipo Pale Ale	6.700 gramas	R\$ 63,35
Malte tipo CaraAroma	100 gramas	R\$ 1,89
Lúpulo SAAZ 3,5% a. a.	196 gramas	R\$ 66,90
Lúpulo Mosaic	64 gramas	R\$ 31,60
Levedura cervejeira S-04	11 gramas	R\$ 22,90
Levedura cervejeira US-05	11 gramas	R\$ 24,50
Levedura cervejeira Diamond	11 gramas	R\$ 30,40
Floratil	11 gramas	R\$ 119,70
Água	+/- 150 litros	-
Whirflooc	1,5 gramas	R\$ 0,80
Pimenta Seeds of Paradise	5 gramas	R\$ 9,89
Açúcar	700 gramas	-
Coentro	5 gramas	R\$ 2,97
<b>Total</b>		<b>R\$ 469,90</b>

Fonte: Autor (2021)

Tabela 12 – Custos em equipamentos de produção de cervejas

Materiais cervejeiros	Quantidades	Valores
Moedor de grãos	1 un.	R\$ 182,60
Panela de brasagem/clarificação	1 un.	+/- R\$ 515,00
Panela de fervura	1 un.	+/- R\$ 380,00
Colher cervejeira	2 un.	R\$ 62,00
Fogareiro	2 un.	+/- R\$ 295,00
Termômetros	2 un.	R\$ 85,60
Serpentina	1 un.	+/- R\$ 90,50

AirLock	1 un.	R\$ 19,90
Fermentador com torneira	1 un.	R\$ 89,90
Garrafas	150 un.	R\$ 6,85
		(conclusão)

Materiais cervejeiros	Quantidades	Valores
Tampas	150 un.	R\$ 11,60
Tubos	3 metros	R\$ 49,20
Proveta	1 un.	R\$ 13,90
Erlenmeyer	3 un.	R\$ 166,20
Densímetro	1 un.	R\$ 64,80
<b>Total</b>		<b>R\$ 2.152,05</b>

Fonte: Autor (2021)

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O microrganismo *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* demonstrou resistência as diferentes condições ambientais presentes nos três estilos propostos, podendo conferir potencial probiótico ao produto;
- Por não haver análise estatística, não é possível concluir se há ou não diferença significativa entre as fermentações, mas os houve semelhanças numéricas entre os dados físico-químicos, microbiológicos e sensoriais nos estilos Pilsen e Indian Pale Ale, porém, no estilo Belgian Golden Strong Ale, houve muita discrepância entre os dados, especialmente na graduação alcoólica, e nos resultados sensoriais;
- Pelas análises físico-químicas, as cervejas se encaixam nos parâmetros legais, no entanto, microbiologicamente, há necessidade de maior investigação;
- Os cálculos de ingestão diária recomendada de etanol e de probiótico, demonstraram que as doses indicadas das cervejas conferiria os benefícios pretendidos ao produto;
- Apesar de demonstrar qualidade sensorial semelhante as cervejas fermentadas com leveduras convencionais, as cervejas produzidas com *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* precisam de aperfeiçoamento, antes de sua introdução no mercado;

### 8.1 Perspectivas

Como pode ser percebido pelos resultados, a *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* aparenta fermentar mais lentamente que as linhagens convencionais cervejeiras, sendo necessário adaptações do processo, como maiores tempos de fermentação, mostura, ou fervura, por exemplo.

Além disso, para compreender melhor se houve ou não diferença significativa entre as fermentações, seria necessário produzir mais bateladas de cada estilo, pois repetições permitiriam uma análise estatística que comprovaria a similaridades entre a fermentação com as linhagens convencionais, e com a *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*.

Um maior controle contra contaminações também é necessário, já que as análises microbiológicas registraram presença de leveduras não cervejeiras e

selvagens, o que pode ser comum em um processo caseiro, como na presente pesquisa. No entanto, quanto maior o controle, mais preciso serão os resultados microbiológicos referentes ao potencial da *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*.

Com um tempo de estocagem de 6 meses, é interessante realizar contagens da *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* em menores tempos de guarda da bebida, a fim de compreender em quanto tempo há uma máxima densidade celular, o que auxiliaria também no aperfeiçoamento do tempo de fermentação.

Alimentos como os grãos de cevada, utilizados na produção da cerveja, possuem compostos conhecidos como prebióticos, substâncias não digeríveis que estão presentes em alguns alimentos, e afetam benéficamente o hospedeiro. Esses prebióticos estimulam a proliferação e atividade de bactérias desejáveis ao indivíduo, e devem ser estudados quanto a sua contribuição na ação probiótica da *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, quando tratando-se da presente pesquisa.

## 9 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que é possível produzir cervejas de diferentes estilos utilizando a levedura probiótica *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*.

## REFERENCIAL

ALMAGUER, C. et al. *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 66, n. 1, p. 35–50, 2014.

ALMEIDA, J.M. **Acompanhamento da fermentação na produção de hidromel com utilização de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii***. 2018. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas, Rio Pomba, 2018.

ALMEIDA-PITITO, B.; MORAES, A.C.F.; FERREIRA, S.R.G. O lado saudável do consumo de bebida alcoólica. **Revista USP**, n. 96, 28 fev. p. 55-68, 2013. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revusp/article/view/52257>. Acesso em: 25 set. 2021.

ANDERSON, R.G. History of Industrial Brewing. *In*: PRIEST, F.; STEWART, G. **Handbook of Brewing**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. p. 1-37.

ANDRADE, A. G.; OLIVEIRA, L. C. Principais Consequências em Longo Prazo Relacionadas ao Consumo Moderado de Álcool. *In*: ANDRADE, A. G; ANTHONY, J. C.; SILVEIRA, C. M. **Álcool e suas Consequências, uma Abordagem Multiconceitual**. Barueri: Manole, 2009, pp. 37-66.

ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. 2008. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 16 out. 2021.

ARNOLD, J. P. **Origin and History of Beer and Brewing: From Prehistoric Times to the Beginning of Brewing Science and Technology**. Cleveland, Ohio: Reprint Edition by BeerBooks, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA. **Saúde**. 2018. Disponível em: <[http://www.cervbrasil.org.br/novo\\_site/saude/](http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/saude/)>. Acesso em: 25 set. 2021.

AZEVEDO, D.P.L. **Atividade antagônica da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA -1015 sobre *Escherichia coli***:2005. Estudo do Potencial Probiótico. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

BAMFORTH, C. W. **Brewmaster's art: the history and science of beermaking**. Prince Frederick, MD: Recorded Books, 2009.

BASSO, R. F. **Caracterização de leveduras não convencionais para a produção de cervejas**. 2019. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia e Alimentos, Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, p. 28-37, 2019.

BATISTA, T.M. **Genômica comparativa de leveduras probióticas: *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 e cepas de *Saccharomyces boulardii***. 2015. Tese (Pós-graduação em Bioinformática) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

BJCP. **Beer Judge Certification Program**. Tradução de Mauro Manzali Bonaccorsi. [S.l.: s.n.], 2015.

BLOCH, C., BONFIM, T. M. B., DA SILVA, G. A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Appl Microbiol Biotechnol, Laboratório de Microbiologia Aplicada**, EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, Brazil., Laboratório de Microbiologia Aplicada, EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, Brazil., 2014, v. 98, p. 5645-5654

BRANDÃO, R.L. *et al.* Intracellular signal triggered by cholera toxin *In: Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 564-568, 1998.

BRASIL. **Consultas - Anvisa**. 2019. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351134035201919/>. Acesso em: 23 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 9.902 de 8 de julho de 2019**. Altera o Anexo ao Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 jun. de 2019. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2019-2022/2019/Decreto/D9902.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2019-2022/2019/Decreto/D9902.htm). Acesso em: 13 maio 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 65 de 10 de dezembro de 2019**. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 dez. de 2019, ed. 239, sec. 1, pg. 31. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-65-de-10-de-dezembro-de-2019.pdf>. Acesso em: 13 maio 2021.

CARVALHO, T.O. Qual a recomendação de ingestão de probióticos para adultos e crianças?. **Nutritotal**. 11 maio 2016. Disponível em: <https://nutritotal.com.br/pro/qual-a-recomendaa-a-o-de-ingesta-o-de-probia-ticos-para-adultos-e-criana-as/>. Acesso em: 23 dez. 2021.



CANANI, R. B.; CIRILLO, P.; TERRIN, G.; CESARANO, L.; SPAGNUOLO, M. I.; VINCENZO, A.; ALBANO, F.; PASSARIELLO, A.; MARCO, G.; MANGUSO, F.; GUARINO, A. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. **British Medical Journal**, London, v. 335, n. 7614, p. 340, 2007.

CAPECE, A. *et al.* Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. **International Journal of Food Microbiology**, n. 284, 2 out. 2018, p. 22-30.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1ª parte- As leveduras. **Revista Analítica**. São Paulo, n. 25, p. 36-42, out./nov. 2006.

CATHARINA SOUR. **A história**. 2021? Disponível em: <http://catharinasour.com.br/a-historia/>. Acesso em: 24 set. 2021.

CELEMI, L.G.A.; GARCIA, A.C.L.; SOUZA, J.C. Análise de prontuários segundo à prevalência do consumo de alimentos ricos em probióticos. **Revista Saúde UniToledo**, Araçatuba, v. 01, n. 02, 15 out. 2021, p. 96-109, set./nov. 2017.

CENTRO DE TECNOLOGIA SENAI - ALIMENTOS E BEBIDAS. **Fervura e Tratamento do Mosto**. 2021? Disponível em: [https://www.agraria.com.br/extranet\\_2016/uploads/AgromalteArquivo/04\\_fervura\\_e\\_t ratamento\\_jornada\\_8h\\_1601583396918.pdf](https://www.agraria.com.br/extranet_2016/uploads/AgromalteArquivo/04_fervura_e_t ratamento_jornada_8h_1601583396918.pdf). Acesso em: 2 nov. 2021.

CERVEJA DA CASA. **O quão boas são as safras de lúpulos de anos anteriores?**. 2018. Disponível em: <https://cervejadacasa.wordpress.com/2018/07/05/o-quao-boas-sao-as-safras-de-lupulos-de-anos-anteriores/>. Acesso em: 2 nov. 2021.

CONCERVEJA. **Teste do iodo: como, quando e qual a importância?**. 2016. Disponível em: <https://concerveja.com.br/teste-iodo/>. Acesso em: 2 nov. 2021.

CONSUMIDOR MODERNO. **Hábitos alimentares: o que é tendência para 2021**. 2020. Disponível em: <https://www.consumidormoderno.com.br/2020/12/30/habitos-alimentares-o-que-e-tendencia-para-2021/>. Acesso em: 14 out. 2021.

COSTA, J. C. H. da. **Projeto de um laboratório na Cerveja com História**, Lda. [S.l.], 2016. Disponível em: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsrca&AN=rcaap.com.repositorium.1822.47365&lang=pt-br&site=eds-live>. Acesso em: 15 maio 2021.

CZERUCKA, D; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces bouardii* on diarrheal pathogens. **Microbes Infect.**, v.. 4, n.7, p. 733-739, 2002.

DELWEN, S. Archaeology of Ancient Egyptian Beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 54, p. 3-13, 1996.

DE PAULA, B.P. et al. Technological features of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* for potential probiotic wheat beer development. **ScienceDirect**, v. 135, jan 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110233>. Acesso em: 30 out. 2021.

DINSLAKEN, D. **Como calcular IBU**, 2016. Disponível em: <https://concerveja.com.br/calcular-ibu/>. Acesso em: 15 set. 2021

DON ALCIDES. **Tipos de Malte na Composição da Cerveja**. 2018. Disponível em: <https://blog.donalcides.com.br/tipos-de-malte-na-composicao-da-cerveja/>. Acesso em: 2 Nov. 2021.

EDWARDS-INGRAM, L.; GITSHAM, P.; BURTON, N.; WARHURST, G.; CLARKE, I.; HOYLE, D.; OLIVER, S.G.; STATEVA, L. **Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae***. Appl. Environ. Microbiol. 2007.

EL MARTES, G. La Liga Hanseática. **Historiedades**. 26 fev. 2008. Disponível em: <https://historiedades.blogspot.com/2008/02/la-liga-hansetica.html>. Acesso em: 2 nov. 2021.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Colour of Beer. Spectrophotometric Method (IM). In: **ANALYTICA EBC**. Nürnberg: Fachverlag hans Carl, 2010. Section 9. mth 9.6, p. 1-1

EUROPEAN COMMISSION CONCERTED ACTION ON FUNCTIONAL FOOD SCIENCE IN EUROPE. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. **Br. J. Nutr.**, v.81, n.4, suppl.1, p.S1-S27, 1999.

GARDENAL, I. Ingestão de probióticos é benéfica para portador de doença intestinal. **Hospital de Clínicas da Unicamp**. 27 jul. 2010. Disponível em: <https://hc.unicamp.br/ingestao-de-probioticos-e-benefica-para-portador-de-doenca-intestinal/>. Acesso em: 11 abr. 2021.

GIBSON, B.R., & LITI, G. *Saccharomyces pastorianus*: genomics insights inspiring innovation for industry. **Yeast**, 32, p. 17-27, 2015.

GUIMARÃES, N.S.; NEMER, A.S.A.; FAUSTO, M.A. Influência do consumo de álcool nas alterações antropométricas: uma revisão sistemática. **Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria**, n. 33, p. 68-76, 2013. Disponível em: <https://revista.nutricion.org/PDF/333sernizon.pdf>. Acesso em: 13 set. 2021.

HENDGES, D.H.; HENDGES, A.P.P.K. **Química Cervejeira**. Maringá: [S.n.], 2019

HENKER, J.; LAASS, M.; BLOKHIN, B. M.; BOLBOT, Y. K.; MAYDANNIK, V. G.; ELZE, M.; WOLFF, C.; SCHULZE, J. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle

1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 166, n. 4, p. 311–318, 2007.

HOFFMANN, M.R.B. et al. Controle do crescimento bacteriano comum por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* e óleo essencial de laranja em feijoeiro suscetível e moderadamente resistente. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 5, n. 4, p. 8-23, 2012. Disponível em: [https://www.fag.edu.br/upload/revista/cultivando\\_o\\_saber/511cc0757fc7d.pdf](https://www.fag.edu.br/upload/revista/cultivando_o_saber/511cc0757fc7d.pdf). Acesso em: 30 out. 2021.

HOMINI LÚPULO. **Tudo o que você precisa saber sobre pH e água para produção da sua cerveja**. 2018. Disponível em: <https://www.hominilupulo.com.br/ph-e-agua/>. Acesso em: 18 set. 2021.

HOUGH, J. S., E HUDSON, J. R., Influence of Yeast Strain on Loss of Bittering Material During Fermentation, **Journal of the Institute of Brewing**, v. 67, p. 241, 1961.

HOWARD, G. A. Estimation of the bitterness of beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 74, p. 249–251, 1968.

HUNT, B. Refrigeration. **Beer & Brewing**. Disponível em: <https://beerandbrewing.com/dictionary/eKBCxd4GBx/>. [20--] Acesso em: 23 dez. 2021.

INSTITUTO DA CERVEJA DO BRASIL. **Infográfico - Mercado Brasileiro de Cervejarias Artesanais**. 2016. Disponível em: <https://www.institutodacerveja.com.br/blog/n114/novidades/infografico-mercado-brasileiro-de-cervejarias-artesanais>. Acesso em: 24 set. 2021.

ISOLAURI, E. Probiotics for infectious diarrhoea. **Gut**, London, v. 52, n. 3, p. 436–437, 2003.

JORNAL DA USP. **Levedura brasileira resulta em cerveja especial de alta qualidade**. 2017. Disponível em: <https://jornal.usp.br/ciencias/ciencias-agrarias/levedura-brasileira-resulta-em-cerveja-especial-de-alta-qualidade/>. Acesso em: 24 set. 2021.

JUNIOR, A. A. D.; VIEIRA, A. G.; FERREIRA, T. P. Processo de produção de cerveja. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 6, p. 61-71, 2009.

KEGELE, F.C.O; DUARTE, R.S; MIGOWSKI, E. *Saccharomyces boulardii*: novas perspectivas para a terapêutica em diarreia aguda. **Revista Brasileira de Medicina**, vol. 67, p. 32-37, 2010.

KENDALL A. S. **Louis Pasteur, the father of immunology?**. 2012. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00068/full>. Acesso em: 2 ago. 2021.

KITAMURA, D.H. **Produção de biomassa probiótica e enriquecida com selênio de *Saccharomyces boulardii* utilizando melão de cana-de-açúcar**. 2013. Bissertação (Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.3, p.329-347, 2008.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1984. p.1082.

KUHLE, A.V.D.A; JESPERSEN, L. The Taxonomic Position of *Saccharomyces boulardii* as Evaluated by Sequence Analysis of the D1/D2 Domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region and the Mitochondrial Cytochrome-c Oxidase II Gene. **Systematic and Applied Microbiology**, ano 26, n. 4, 2003, p. 564-571.

LABGRÃOS. **Estrutura e composição dos cereais**. 2021? Disponível em: <<http://labgraos.com.br/manager/uploads/arquivo/estrutura-e-composicao-de-graos--prof--nathan.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2021.

LAVINSCKY, M. C. Trajetória e Sentidos da Cerveja: das origens europeias à formação do Brasil moderno. **Revista Mosaico**, v. 10, p. 173-182, 2017.

LAWS, D. R. J.; MCGUINNESS, J. D.; RENNIE, H. The losses of bitter substances during fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 78, p. 314–321, 1972.

LEE, Y.K., NOMOTO, K., SALMINEN, S., GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.

LINCOLN, A.; DORNBUSCH, H. **Law**. The Oxford Companion to Beer, [201-]. Disponível em: <https://beerandbrewing.com/dictionary/1bjGJR3uRH/>. Acesso em: 28 maio 2021.

LIONG, M. T.; SHAH, N. P. Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotics by using a response surface method. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 4, p. 1745–1753, 2005.

LOPES, T.R; PINTO, M.A.O. Aplicação terapêutica de *Saccharomyces boulardii* em diarreias: uma revisão. **HU Revista**, v. 36, n.2, p. 107-122, 2010.

MAIA, A.S.P. **Pasteurização**: Estudo do efeito de Parâmetros Físico Dimensionamento Doutor Valentim M.B. Nunes Projecto apresentado para cumprimento dos requisitos necessários Escola Superior de Tecnologia de Tomar Ana Sofia Pico Maia Pasteurização: Estudo do efeito de Parâmetros Físico-químicos na C. 2012. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Instituto Politécnico de Tomar.

MALDI-TOF MS. Supplementary database for species identification employing the yeast diversity encountered on southern Brazil grapes **Folia Microbiologica**, Springer, 2018, on line, p. 1-9.

MARK, J. J. **Beer In the Ancient History Encyclopedia**. 2011. Disponível em: <https://www.worldhistory.org/article/223/beer-in-the-ancient-world/>. Acesso em: 24 abril 2021.

MARQUES, T. C. N. **A Cerveja e a Cidade do Rio de Janeiro: de 1888 ao início dos anos 1930**. Jundiaí: Paco Editorial; Brasília: EdUNB, 2014.

MARTINS, F.S.; BARBOSA, F.H.F; NICOLI, J.R. O probiótico *Saccharomyces boulardii*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, ano 9, n. 2, 2009, p. 171-182.

MEUSSDOERFFER, F. G. A comprehensive history of beer brewing. **Handbook of brewing: Processes, technology, markets**, ed. Hans M.Esslinger. New York: Wiley & Sons, 2009.

MCFARLAND, L.V.; SURAWICZ, C.M.; GREENBERG, R.N.; FEKETY, R.; ELMER, G.W.; MOYER, K.A.; MELCHER, S.A.; BOWEN, K.E.; COX, J.L.; NOORANI, Z. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 271, 1994, p. 1913-1918.

MACFARLAND, L. *Saccharomyces boulardii* Is Not *Saccharomyces cerevisiae*. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 1996, n. 22, p. 200-201.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Anuário da cerveja**. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/anuario-da-cerveja-2019>>. Acesso em: 10 abr. 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Anuário da cerveja**. 2020. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/com-crescimento-de-14-4-em-2020-numero-de-cervejarias-registradas-no-brasil-passa-de-1-3-mil/anuariocerveja4.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2021.

MONTENEGRO, K.P.B. **Viabilidade de produção de cerveja artesanal utilizando *Saccharomyces boulardii***. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

MOSER, A.L. **Avaliação do potencial de *Saccharomyces boulardii* na produção de cerveja probiótica**. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina) - Centro Universitário Católica de Santa Catarina em Joinville, Joinville, 2017.

MORADO, R. **Larousse da cerveja: A história e as curiosidades de uma das bebidas mais populares do mundo**. São Paulo: Alaúde, 2017.

MORITZ, E. R.; MORRIS, G. H. **A Text-book of the Science of Brewing**, E. & F. N. Spon, 1981.

MULERO-CEREZO, J.; BRIZ-REDÓN, A.; SERRANO-AROCA, A. *Saccharomyces Cerevisiae* Var. *Bouardii*: Valuable Probiotic Starter for Craft Beer Production, **Applied Sciences**, v. 9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app9163250>. Acesso em: 30 out. 2021.

MULLER, A. **Cerveja**. Canoas: Ed. ULBRA, 2002.

MULLER, J. L. **Cultivo de *Saccharomyces bouardii* em biorreator tipo air-lift e em frascos agitados mecanicamente**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006. Disponível em: <https://siaiap39.univali.br/repositorio/bitstream/repositorio/1439/1/Jose%20Luis%20Muller.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021

MUXEL, A. **Fundamentos de fabricação de cerveja: Dia de brassagem**. Blumenau, SC. 3 out. 2016. Apresentação de Power Point. 94, 95 slides. color. Disponível em: [https://amuxel.paginas.ufsc.br/files/2017/03/Brassagem\\_SNCT\\_alunos.pdf](https://amuxel.paginas.ufsc.br/files/2017/03/Brassagem_SNCT_alunos.pdf). Acesso em: 3 set. 2021.

NADAI, B.L. **Efeito da suplementação de nutrientes e da concentração de permeado de soro de leite no crescimento de *Saccharomyces bouardii* em sistema descontínuo**. 2015. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. São Paulo: Sarvier, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. São Paulo: Artmed, 2014.

NELSON, M. **The Barbarian's Beverage: A History of Beer in Ancient Europe**. Abingdon, Oxon: Routledge. p. 1, 2005.

OLIVEIRA, L. **Probióticos, prebióticos e simbióticos: definição, benefícios e aplicabilidade industrial: Benefícios e aplicabilidade na indústria**. Minas Gerais: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 2017.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, jan./mar., 2002.

OLIVEIRA, N.A.M. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja**. 2011. Monografia (Pós-graduação em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

OLIVER, G. The history of beer. **The Oxford Companion to Beer**, 2011?. Disponível em: <https://beerandbrewing.com/dictionary/UqfrcsPoAl/>. Acesso em: 27 maio 2021.

PALMER, J.J. **How to Brew**: Everything you need to know to brew great beer every. ed. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2017.

POELMANS, E.; SWINNEN, J. **A brief economic history of beer**. The Economics of Beer. Oxford, 2011.

PRIEST, F.G. Microbiology and Microbiological Control in the Brewery. *In*: PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. **Handbook of Brewing**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. p. 607-627.

REID, G.; HAMMOND, J. Probiotics: some evidence of their effectiveness. **Canadian Family Physicians**, Mississauga, v. 51, p. 1487-1493, 2005.

REITENBACH, A.F.; IWASSA, I.J.; BARROS, B.C.B. Production of functional beer with the addition of probiotic: *Saccharomyces boulardii*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12211>. Acesso em: 30 out. 2021.

RIBEIRO, M.V.S. **Bioquímica Cervejeira**. Maringá: [S.n.], 2020.

RIZZOLO, J.A. **Estudos para o aproveitamento biotecnológico de variedades de batata-doce [ipomoea batatas (L.) lam] na fermentação alcoólica para a produção de etanol combustível e aguardente**. 2014. Tese (Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

RODRIGUES, M.A.; MORAES, J.S.; DE CASTRO, J.P.M (Eds.). **Jornadas de lúpulo e cerveja: novas oportunidades de negócio**. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2015.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 2, p. 396-402, 2000.

ROSA, N.A.; AFONSO, J.C. A Química da Cerveja. **Química e Sociedade**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 98-105, maio 2014. Disponível em: [http://qnesc.s bq.org.br/online/qnesc37\\_2/05-QS-155-12.pdf](http://qnesc.s bq.org.br/online/qnesc37_2/05-QS-155-12.pdf). Acesso em: 19 set. 2021.

ROSEDO, T.G. **Louis Pasteur – Um Humanista do Século XIX**. Repositório Institucional da Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/5518>. Acesso em: 29 maio 2021.

ROSS, R.P.; DESMOND, C.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **J. Appl. Microbiol.**, v.98, p.1410-1417, 2005.

SÁ, C.A.T.de. As Relações entre a Dinamarca e a Liga Hanseática. **Historiador Especial**, ano 03, n. 01, jul. 2010, p. 113-120. Disponível em: <http://www.historialivre.com/revistahistoriador/espum/carlosa.pdf>. Acesso em: 27 maio 2021.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, n. 1, v. 42, mar. 2006.

SANTOS, S.F.M. *et al.* Análise Cinética da Fermentação das Leveduras Comerciais S-04 e S-33; **Revista Saúde e Ciência online**, v. 7, n. 2, p. 197-208, maio/ago 2018. Acesso em: 30 out. 2021.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. **Revista Científica do ITPAC**, v. 4, n. 1, 2011.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.73, n.2, p.361S-364S, 2001.

SENKARCINOVA, B. *et al.* Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Food Science and Technology**, Praga, p. 362-367, 25 out 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.082>>. Acesso em: 30 out. 2021.

SIQUEIRA, P. B; BOLINI, H. M. A.; MACEDO, G. A. O Processo de Fabricação da Cerveja e Seus Efeitos na Presença De Polifenóis. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, ano 4, p. 491-498, 2008. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/49599952\\_O\\_PROCESSO\\_DE\\_FABRICA\\_CAO\\_DA\\_CERVEJA\\_E\\_SEUS\\_EFEITOS\\_NA\\_PRESENCIA\\_DE\\_POLIFENOS](https://www.researchgate.net/publication/49599952_O_PROCESSO_DE_FABRICA_CAO_DA_CERVEJA_E_SEUS_EFEITOS_NA_PRESENCIA_DE_POLIFENOS). Acesso em: 25 set. 2021.

SILVA, G. A. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Itálico grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1996, v. 46, p. 112-121

SILVA, G. A., TONIETTO, J., GUERRA, C. C. (Eds.). **Evidência de uma linhagem de levedura com característica killer, neutra e sensível**. Anais do IX Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Embrapa Uva e Vinho, 1999, p.169.

SILVA, G. A. *et al.* Production of functional killer protein in batch cultures upon a shift from aerobic to anaerobic conditions **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2011, v. 54, p. 601-612.

SILVA, G. A. *et al.* **São Francisco Valley Region and the autochthonous yeast of the Brazilian Northeast**. 34th World Congress of Vine and Wine, 2011-a.

SILVA, G. A., DE MELO, B. C., TONIETTO, J. **Autochthonous yeast populations from different Brazilian geographic indications**. *BIO Web of Conferences - 39<sup>th</sup> World Congress of Vine and Wine*, 2016, v. 7, p. 1-10

SILVA, S.H.; VIEIRA, E.C.; DIAS, R.S.; NICOLI, J.R. Antagonism against *Vibrio cholerae* by diffusible substances produced by bacterial components of the human faecal microbiota. **J. Med. Microbiol.** v. 50, p. 161-164, 2001.



STANGARLIN, J.R. et al. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 91-98, jan./mar. 2010. Acesso em: 30 out. 2021.

STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos – Artigo de Revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 16-33, 2008.

STRAUSS, C.; KOCK, J.; VAN WYK, P.; LODOLO, E.; POHL, C. & BOTES, P. Bioactive Oxylipins in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Inst. Brew.**, 2005, 111, 304-308.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C.L.L. (Org.). **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Rio de Janeiro: Rubio, 2018. p. 19-36.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA. **Teste do Iodo**. 2017. Disponível em: <<http://plone.ufpb.br/ldb/contents/paginas/teste-do-iodo>>. Acesso em: 2 out. 2021.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2017.

UOL. **Produção de lúpulo no país salta 110%, com mercado de cervejas artesanais**. 2021. Disponível em: <https://economia.uol.com.br/noticias/redacao/2021/08/08/producao-de-lupulo-no-pais-salta-110-com-mercado-de-cervejas-artesanais.htm#:~:text=O%201%C3%BApulo%20%C3%A9%20uma%20das,em%202020%2C%20segundo%20o%20levantamento>. Acesso em: 24 set. 2021.

VANDENBERG, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 221-238, 1993.

VANDENPLAS, Y.; BRUNSER, O.; SZAJEWSKA, H. *Saccharomyces boulardii* in childhood. **European Journal of Pediatrics**, 24 fev. 2009. 168, p. 253-265.

VAN-RIJ, N. J. W. K. **The yeasts a taxonomic study**. Elsevier - Amsterdam, The Netherlands, 1984, p. 1082.

VERONESE, R. **Entenda como funciona a coloração das cervejas**. 2017. Disponível em: <<http://blog.cervejarialeopoldina.com.br/entenda-como-funciona-a-coloracao-das-cervejas/>>. Acesso em: 12 set. 2021.

WENDLAND, J. Lager yeast comes of age. **Eukaryot Cell**, v. 13, p. 1256–1265, 2014.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Levedura: Guia prático para a fermentação de cerveja**. Tradução de Bianca Telini e Marcelo Menoncin. Porto Alegre: Krater, 2020.

YUSUF, S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control

study. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation**, Ontario, n. 364, 11 set. p. 937-952, 2004.

ZIEMER, C.J., GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.473-479, 1998.



## APÊNDICE A – Ficha técnica de avaliação sensorial para o estilo Pilsen

### FICHA TÉCNICA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL American Lager – Pilsen

Avaliador \_\_\_\_\_

**INSTRUÇÕES:** marque X nas características percebidas, circule as esperadas no estilo, mas não detectadas.

AROMA					Malte	Lúpulo	Ésteres	Outros
Aspecto	Ø	B	M	A				
Malte					Grão	Cítrico	Frutado	Levedura
Lúpulo					Caramelo	Terroso	Maça/Pera	Fruta
Esteres					Pão	Floral	Banana	Lático
Fenóis					Fruta	Gramíneo	Berry	Fumaça
Alcool					Tostado	Ervas	Cítrico	Especiaria
Dulçor					Torrado	Pinho	Frutas secas	Vinho
Condimento					Queimado	Madeira	Uva	Madeira
								Floral

APARÊNCIA					Cerveja	Colar	Outros
Aspecto	Ø	B	M	A			
Turbidez					Palha	Branco	
Tamanho colar					Amarelo	Marfim	
Retenção colar					Ouro	Creme	
					Ambar	Bege	

SABOR					Malte	Lúpulo	Ésteres	Outros
Aspecto	Ø	B	M	A				
Malte					Grão	Cítrico	Frutado	Leveduras
Lúpulo					Caramelo	Terroso	Maça/Pera	Fruta
Esteres					Pão	Floral	Banana	Lático
Fenóis					Fruta	Gramíneo	Berry	Fumaça
Alcool					Tostado	Ervas	Cítrico	Especiaria
Dulçor					Torrado	Pinho	Frutas secas	Vinho
Amargor					Queimado	Madeira	Uva	
Acidez					Milho	Picante		Equilíbrio
Aspereza								Malte
								Lúpulo
								Equilibrado

BOCA					Falhas	Final
Aspecto	Ø	B	M	A		
Corpo					Choca	Enjoativo
Carbonatação					Gusher	Doce
Calor					Quente	Médio
Creiosidade					Aspero	Seco
Adstringência						Picante

FALHAS (marque x quando presente)			
<input type="checkbox"/> Acetaldeído	<input type="checkbox"/> Sabor	<input type="checkbox"/> Sensação na boca	<p>Precisão do estilo</p> <p>Exemplo característico <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> Fora do estilo</p> <p>Mérito técnico</p> <p>Sem falhas <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> Falhas graves</p> <p>Impressão geral</p> <p>Excelente receita <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/><input type="checkbox"/> Não beberia novamente</p>
<input type="checkbox"/> Adstringente	<input type="checkbox"/> Alcoólico	<input type="checkbox"/> Alcoólico	
<input type="checkbox"/> Diacetil	<input type="checkbox"/> Adstringente	<input type="checkbox"/> Adstringente	
<input type="checkbox"/> Dimetilsulfureto	<input type="checkbox"/> Diacetil	<input type="checkbox"/> Medicinal	
<input type="checkbox"/> Esterificado	<input type="checkbox"/> Dimetilsulfureto	<input type="checkbox"/> Metálico	
<input type="checkbox"/> Gramíneo	<input type="checkbox"/> Esterificado	<input type="checkbox"/> Azedo	
<input type="checkbox"/> Metálico	<input type="checkbox"/> Gramíneo	<input type="checkbox"/> Vinagre	
<input type="checkbox"/> Mofo	<input type="checkbox"/> Medicinal		
<input type="checkbox"/> Oxidado	<input type="checkbox"/> Metálico		
<input type="checkbox"/> Azedo	<input type="checkbox"/> Oxidado		
<input type="checkbox"/> Fumaça	<input type="checkbox"/> Azedo		
<input type="checkbox"/> Enxofre	<input type="checkbox"/> Enxofre		
<input type="checkbox"/> Vinagre	<input type="checkbox"/> Vegetal		
<input type="checkbox"/> Levedura	<input type="checkbox"/> Vinagre		
	<input type="checkbox"/> Levedura		

## APÊNDICE B – Ficha técnica de avaliação sensorial para o estilo IPA

### FICHA TÉCNICA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL American Lager – Indian Pale Ale

Avaliador \_\_\_\_\_

**INSTRUÇÕES:** marque X nas características percebidas, circule as esperadas no estilo, mas não detectadas.

AROMA					Malte	Lúpulo	Ésteres	Outros
Aspecto	Ø	B	M	A				
Malte					Grão	<input type="checkbox"/> Cítrico	<input type="checkbox"/> Frutado	<input type="checkbox"/> Levedura
Lúpulo					Caramelo	<input type="checkbox"/> Frutado	<input type="checkbox"/> Maça/Pera	<input type="checkbox"/> Especiaria
Esteres					Pão	<input type="checkbox"/> Floral	<input type="checkbox"/> Banana	<input type="checkbox"/> Lático
Fenóis					Fruta	<input type="checkbox"/> Gramíneo	<input type="checkbox"/> Berry	<input type="checkbox"/> Fumaça
Alcool					Tostado	<input type="checkbox"/> Ervas	<input type="checkbox"/> Cítrico	<input type="checkbox"/> Vinho
Dulçor					Torrado	<input type="checkbox"/> Pinho	<input type="checkbox"/> Frutas secas	_____
					Queimado	<input type="checkbox"/> Madeira	<input type="checkbox"/> Uva	_____
					Granulado	<input type="checkbox"/> Condimento	<input type="checkbox"/> Melão	<input type="checkbox"/>

APARÊNCIA					Cerveja	Colar	Outros
Aspecto	Ø	B	M	A			
Turbidez					Palha	<input type="checkbox"/> Branco	<input type="checkbox"/>
Tamanho colar					Amarelo	<input type="checkbox"/> Marfim	<input type="checkbox"/>
Retenção colar					Ouro	<input type="checkbox"/> Creme	<input type="checkbox"/>
					Ambar	<input type="checkbox"/> Bege	<input type="checkbox"/>
					Avermelhado	_____	_____

SABOR					Malte	Lúpulo	Ésteres	Outros
Aspecto	Ø	B	M	A				
Malte					Grão	<input type="checkbox"/> Cítrico	<input type="checkbox"/> Frutado	<input type="checkbox"/> Leveduras
Lúpulo					Caramelo	<input type="checkbox"/> Terroso	<input type="checkbox"/> Maça/Pera	<input type="checkbox"/> Fruta
Esteres					Pão	<input type="checkbox"/> Floral	<input type="checkbox"/> Banana	<input type="checkbox"/> Lático
Fenóis					Fruta	<input type="checkbox"/> Gramíneo	<input type="checkbox"/> Berry	<input type="checkbox"/> Fumaça
Alcool					Tostado	<input type="checkbox"/> Ervas	<input type="checkbox"/> Cítrico	<input type="checkbox"/> Especiaria
Dulçor					Torrado	<input type="checkbox"/> Pinho	<input type="checkbox"/> Frutas secas	<input type="checkbox"/> Vinho
Amargor					Queimado	<input type="checkbox"/> Madeira	<input type="checkbox"/> Uva	_____
Acidez					Milho	<input type="checkbox"/> Picante	_____	<input type="checkbox"/> Equilíbrio
Aspereza					Granulado	<input type="checkbox"/> Condimento	_____	<input type="checkbox"/> Malte
								<input type="checkbox"/> Lúpulo
								<input type="checkbox"/> Equilibrado

BOCA					Falhas	Final
Aspecto	Ø	B	M	A		
Corpo					Choca	<input type="checkbox"/> Enjoativo
Carbonatação					Gusher	<input type="checkbox"/> Doce
Calor					Quente	<input type="checkbox"/> Médio
Creiosidade					Aspero	<input type="checkbox"/> Seco
Adstringência					_____	<input type="checkbox"/> Picante
					_____	_____

FALHAS (marque x quando presente)			
<b>Aroma</b> <input type="checkbox"/> Acetaldeído <input type="checkbox"/> Adstringente <input type="checkbox"/> Diacetil <input type="checkbox"/> Dimetilsulfureto <input type="checkbox"/> Esterificado <input type="checkbox"/> Gramíneo <input type="checkbox"/> Metálico <input type="checkbox"/> Mofo <input type="checkbox"/> Oxidado <input type="checkbox"/> Azedo <input type="checkbox"/> Fumaça <input type="checkbox"/> Enxofre <input type="checkbox"/> Vinagre <input type="checkbox"/> Levedura _____	<b>Sabor</b> <input type="checkbox"/> Acetaldeído <input type="checkbox"/> Alcoólico <input type="checkbox"/> Adstringente <input type="checkbox"/> Diacetil <input type="checkbox"/> Dimetilsulfureto <input type="checkbox"/> Esterificado <input type="checkbox"/> Gramíneo <input type="checkbox"/> Medicinal <input type="checkbox"/> Metálico <input type="checkbox"/> Oxidado <input type="checkbox"/> Azedo <input type="checkbox"/> Enxofre <input type="checkbox"/> Vegetal <input type="checkbox"/> Vinagre <input type="checkbox"/> Levedura	<b>Sensação na boca</b> <input type="checkbox"/> Alcoólico <input type="checkbox"/> Adstringente <input type="checkbox"/> Diacetil <input type="checkbox"/> Medicinal <input type="checkbox"/> Metálico <input type="checkbox"/> Azedo <input type="checkbox"/> Vinagre <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	<b>Precisão do estilo</b> Exemplo característico <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Fora do estilo  <b>Mérito técnico</b> Sem falhas <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Falhas graves  <b>Impressão geral</b> Excelente receita <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Não beberia novamente

## APÊNDICE C – Ficha técnica de avaliação sensorial para o estilo BGSA

### FICHA TÉCNICA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL American Lager – Belgian Golden Strong Ale

Avaliador \_\_\_\_\_

**INSTRUÇÕES:** marque X nas características percebidas, circule as esperadas no estilo, mas não detectadas.

AROMA					Malte	Lúpulo	Ésteres	Outros	
Aspecto	Ø	B	M	A					
Malte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Grão	<input type="checkbox"/>	Cítrico	<input type="checkbox"/>	Levedura
Lúpulo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Caramelo	<input type="checkbox"/>	Terroso	<input type="checkbox"/>	Fruta
Esteres	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pão	<input type="checkbox"/>	Floral	<input type="checkbox"/>	Lático
Fenóis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fruta	<input type="checkbox"/>	Gramíneo	<input type="checkbox"/>	Fumaça
Alcool	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tostado	<input type="checkbox"/>	Ervas	<input type="checkbox"/>	Especiaria
Dulçor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Torrado	<input type="checkbox"/>	Pinho	<input type="checkbox"/>	Vinho
Condimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Queimado	<input type="checkbox"/>	Madeira	<input type="checkbox"/>	Madeira
								<input type="checkbox"/>	Floral

APARÊNCIA					Cerveja	Colar	Outros	
Aspecto	Ø	B	M	A				
Turbidez	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Palha	<input type="checkbox"/>	Branco	<input type="checkbox"/>
Tamanho colar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Amarelo	<input type="checkbox"/>	Marfim	<input type="checkbox"/>
Retenção colar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ouro	<input type="checkbox"/>	Creme	<input type="checkbox"/>
					Ambar	<input type="checkbox"/>	Bege	<input type="checkbox"/>

SABOR					Malte	Lúpulo	Ésteres	Outros	
Aspecto	Ø	B	M	A					
Malte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Grão	<input type="checkbox"/>	Cítrico	<input type="checkbox"/>	Leveduras
Lúpulo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Caramelo	<input type="checkbox"/>	Terroso	<input type="checkbox"/>	Fruta
Esteres	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pão	<input type="checkbox"/>	Floral	<input type="checkbox"/>	Lático
Fenóis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fruta	<input type="checkbox"/>	Gramíneo	<input type="checkbox"/>	Fumaça
Alcool	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tostado	<input type="checkbox"/>	Ervas	<input type="checkbox"/>	Especiaria
Dulçor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Torrado	<input type="checkbox"/>	Pinho	<input type="checkbox"/>	Vinho
Amargor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Queimado	<input type="checkbox"/>	Madeira	<input type="checkbox"/>	
Acidez	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Milho	<input type="checkbox"/>	Picante	<input type="checkbox"/>	Equilíbrio
Aspreza	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Condimento	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Malte
								<input type="checkbox"/>	Lúpulo
								<input type="checkbox"/>	Equilibrado

BOCA					Falhas	Final	
Aspecto	Ø	B	M	A			
Corpo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Choca	<input type="checkbox"/>	Enjoativo
Carbonatação	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Gusher	<input type="checkbox"/>	Doce
Calor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Quente	<input type="checkbox"/>	Médio
Creiosidade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Aspero	<input type="checkbox"/>	Seco
Adstringência	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Picante

FALHAS (marque x quando presente)		Precisão do estilo	
<input type="checkbox"/> Acetaldeído	<input type="checkbox"/> Sabor	<input type="checkbox"/> Exemplo característico	<input type="checkbox"/> Fora do estilo
<input type="checkbox"/> Adstringente	<input type="checkbox"/> Acetaldeído	<input type="checkbox"/> Sem falhas	<input type="checkbox"/> Mérito técnico
<input type="checkbox"/> Diacetil	<input type="checkbox"/> Alcoólico	<input type="checkbox"/> Excelente receita	<input type="checkbox"/> Falhas graves
<input type="checkbox"/> Dimetilsulfureto	<input type="checkbox"/> Adstringente		<input type="checkbox"/> Impressão geral
<input type="checkbox"/> Esterificado	<input type="checkbox"/> Diacetil		<input type="checkbox"/> Não beberia novamente
<input type="checkbox"/> Gramíneo	<input type="checkbox"/> Dimetilsulfureto		
<input type="checkbox"/> Metálico	<input type="checkbox"/> Esterificado		
<input type="checkbox"/> Mofo	<input type="checkbox"/> Gramíneo		
<input type="checkbox"/> Oxidado	<input type="checkbox"/> Medicinal		
<input type="checkbox"/> Azedo	<input type="checkbox"/> Metálico		
<input type="checkbox"/> Fumaça	<input type="checkbox"/> Oxidado		
<input type="checkbox"/> Enxofre	<input type="checkbox"/> Azedo		
<input type="checkbox"/> Vinagre	<input type="checkbox"/> Enxofre		
<input type="checkbox"/> Levedura	<input type="checkbox"/> Vegetal		
	<input type="checkbox"/> Vinagre		
	<input type="checkbox"/> Levedura		

## ANEXO A - Método EBC 9.43.2



### 9.43.2 SPECIFIC GRAVITY OF BEER USING A DENSITY METER – 2004

#### ABSTRACT

The measurement of the specific gravity (SG) and the defined density derived values of a beer at 20 °C using digital density meters of the oscillation type.

Refer to Section 0 (Safety) for relevant warning and safety precautions.

#### 1 SCOPE

The measurement of the specific gravity (SG) and the defined density derived values of a beer at 20 °C using digital density meters of the oscillation type.

#### 2 FIELD OF APPLICATION

The method can be applied to all beers.

#### 3 REFERENCES

3.1 [EBC Method 1.6 \(Care and Adjustment of Apparatus: Care and Adjustment of Apparatus: Density Meters\)](#).

3.2 [EBC Method 8.2.2 \(Wort: Specific Gravity of Wort using a Density Meter\)](#).

#### 4 PRINCIPLE

The specific gravity of beer is determined using a density meter.

#### 5 REAGENTS

See EBC Method 1.6.

#### 6 APPARATUS

See EBC Method 1.6.

## 7 PREPARATION OF SAMPLES

7.1 Remove excess carbon dioxide by shaking about 200 ml of beer in a 500 ml flask at a temperature of  $20 \pm 1$  °C. Shake gently at first and then vigorously, until gases no longer escape from the beer. During shaking the flask must be loosely closed.

7.2 Filter the beer through a dry folded filter paper into a second conical flask. Discard the first 20 ml.

7.3 Repeat this shaking and filtering step to be sure that the beer is completely degassed. About 50 ml of filtered sample is required.

7.4 Equilibrate the filtered sample to  $20 \pm 1$  °C in a water bath.

## 8 PROCEDURE

See EBC Method 1.6.

## 9 EXPRESSION OF RESULTS

### 9.1 Calculation

9.1.1 Record the chosen display values as specific gravity or other density related values to 5 or 4 decimal places (6 figure and 5 figure instruments, respectively).

9.1.2 For expression of the apparent extract or other specific gravity/density values, if they are not shown on the display, see the table of Goldiner, Klemann, Block and Kämpf.

### 9.2 Precision

9.2.1 See EBC Method 1.6.

9.2.2 The precision values given below as specific gravity were determined from the data of a collaborative trial carried out by the IOB Analysis Committee in 1995. Twenty three laboratories analysed beer samples at 3 levels.

Instruments with a 5 figure display (SG) (n = 4):

Range (SG)	$r_{95}$ (SG)	$R_{95}$ (SG)
0,9991 to 1,0170	0,0001	0,0008

Instruments with a 6 figure display (SG) (n = 14):

Range (SG)	$r_{95}$ (SG)	$R_{95}$ (SG)
0,9991 to 1,0170	0,0008	0,00032

where n = number of participating laboratories.

## 10 BIBLIOGRAPHY

10.1 Goldiner, F., Klemann, H., Block, R. and Kämpf, W., Rohrzucker-, Alkohol-, Stammwürze- und Korrekstionstafel (1995), Institut für Gärungsgewerbe, Berlin, Germany.

10.2 See EBC Method 8.2.2.



## ANEXO B - Método EBC 9.4



### 9.4 ORIGINAL, REAL AND APPARENT EXTRACT AND ORIGINAL GRAVITY OF BEER – 2004

#### ABSTRACT

The calculation of original, real and apparent extract and original gravity of beer from specific gravity determinations obtained on the beer and on the alcoholic distillate and beer residue after distillation.

Refer to Section 0 (Safety) for relevant warning and safety precautions.

#### 1 SCOPE

The calculation of original, real and apparent extract and original gravity of beer from specific gravity determinations obtained on the beer and on the alcoholic distillate and beer residue after distillation.

#### 2 FIELD OF APPLICATION

2.1 The method can be applied to pale and dark beers, but not to alcohol free beers or beers with low alcohol content.

2.2 A correction has to be made for acidic beers because of the error due to the presence of volatile acids in the alcoholic distillate. If the acid is present as part of the character of the product then the correction should be made according to the method of De Clerck [see 3.4]. If microbiological contamination of the beer has occurred (e.g. in a beer sample returned by a customer) and the acid is present as a result of conversion of the beer alcohol to acid by beer spoilage organisms the correction should be made according to EBC method 9.2.5.

#### 3 REFERENCES

3.1 International Standard, Water for analytical laboratory use – Specification and test methods, ISO 3696:1987 [E].

3.2 [EBC Method 9.43.2 \(Beer: Specific Gravity of Beer using a Density Meter\)](#) or [EBC Method 9.43.1 \(Beer: Specific Gravity of Beer using a Pycnometer\)](#).

3.3 Goldiner, F., Klemann, H., Block, R. and Kämpf, W., Rohrzucker-, Alkohol-, Stammwürze- und Korrektionsstapel (1996), Institut für Gärungsgewerbe, Berlin, Germany.

3.4 De Clerck, J., Cours de Brasserie, 2nd ed. (1963) Vol. 2, 690.

- 1 -

*This document or any of its parts cannot be altered, reproduced, sold, transferred or distributed without the explicit consent of The Brewers of Europe / EBC. The use of this document shall comply with the General Terms and Conditions available [here](#).*

3.5 [EBC Method 9.2.1 \(Beer: Alcohol in Beer by Distillation\)](#).

3.6 Pawlowski-Schild, Die Brautechnische Untersuchungsmethoden, 8th ed. (1961), Verlag H. Carl, Nürnberg, Germany, 261, 262, 534.

3.7 [EBC Method 9.2.5 \(Beer: Correction for Volatile Acidity\)](#).

## 4 PRINCIPLE

---

4.1 The specific gravity 20 °C/20 °C of the beer is determined.

4.2 The beer is distilled by direct heating.

4.3 The specific gravity 20 °C/20 °C of the alcoholic distillate and the distillation residue are determined after making them back up to their original weight with water.

4.4 The real extract % (m/m) of the beer is calculated from the specific gravity of the distillation residue.

4.5 The apparent extract % (m/m) of the beer is calculated from the specific gravity of the beer.

4.6 The original extract (% Plato) and the original gravity (° Sacch.) are calculated from the specific gravity of the distillation residue and the specific gravity of the beer distillate.

## 5 REAGENTS

---

See EBC Method 9.2.1.

## 6 APPARATUS

---

See EBC Method 9.2.1.

## 7 PREPARATION OF SAMPLES

---

See Method EBC 9.2.1.

## 8 PROCEDURE

---

8.1 Proceed as given for EBC Method 9.2.1, subclauses 8.1 to 8.3 to obtain the specific gravity of the distillate,  $SG_d$ , and the specific gravity of the filtered beer  $SG_{be}$  to five decimal places.

8.2 Cool the residue in the 500 ml distillation flask to 20 °C. Make the contents of the flask to  $100,0 \pm 0,1$  g and mix thoroughly. Measure the specific gravity 20 °C/20 °C of this residue solution,  $SG_{re}$  to five decimal places using a pycnometer or electronic density meter (see 3.2).

## 9 EXPRESSION OF RESULTS

### 9.1 Calculation

#### 9.1.1 Real extract

9.1.1.1 Convert the specific gravity of the residue,  $SG_{\text{rk}}$  (from 8.2) to the corresponding real extract content, ER as % Plato, in accordance with table 1 of Goldiner, Klemann, Block and Kämpf (see 3.3) by using the polynomial:

$$E_r (\% \text{ Plato}) = -460,234 + 662,649 SG_{\text{rk}} - 202,414 SG_{\text{rk}}^2$$

9.1.1.2 Report the result to two decimal places.

#### 9.1.2 Apparent extract

9.1.2.1 Convert the specific gravity of the filtered beer  $SG_{\text{fk}}$  (from 8.1) to the corresponding apparent extract, EA as % Plato, in accordance with table 1 of Goldiner, Klemann, Block and Kämpf by using the polynomial:

$$E_a (\% \text{ Plato}) = -460,234 + 662,649 SG_{\text{fk}} - 202,414 SG_{\text{fk}}^2$$

9.1.2.2 Report the result to two decimal places.

#### 9.1.3 Alcohol as % (m/m)

9.1.3.1 Calculate the alcohol content of the beer as % (m/m) as given in EBC Method 9.2.1, sub-clause 9.1.1.

9.1.3.2 Report the result to two decimal places.

#### 9.1.4 Original extract

9.1.4.1 Calculate the original extract (% Plato) of the beer using the following formula:

$$p (\% \text{ Plato}) = \frac{(2,0665 \cdot A) + E_r}{100 + (1,0665 \cdot A)} \cdot 100$$

where

$E_r$  = real extract of the beer in % Plato

$A$  = alcohol content of the beer in % (m/m)

$p$  = original wort extract in % Plato

9.1.4.2 Report the result to one decimal place.

9.1.4.3 The original extract can also be calculated using the formulae:

$$p = \frac{A}{b} + E_r$$

$$p = \frac{E_a - E_r}{q} + E_r$$

where  $b$  and  $q$  are correction factors published by Pawlowski-Schild (see 3.6).

### 9.1.5 Original gravity (° Sacch.)

9.1.5.1 Calculate the spirit indication (S) from the specific gravity of the distillate  $SG_d$  (from 8.1) using the formula:

$$\text{Spirit indication (S)} = 1000 \times (1,00000 - SG_d)$$

9.1.5.2 Calculate the corresponding degrees of gravity lost (D) from the spirit indication (S) using one of the following formulae:

Spirit indication (S)	Degrees of gravity lost (D)
< 2	$S \times 4,24$
> = 2 and < 4	$S \times 4,38441 - 0,32055$
> = 4 and < 5	$S \times 4,4812 - 0,70952$
> = 5 and < 6	$S \times 4,5051 - 0,81757$
> = 6 and < 7	$S \times 4,54437 - 1,05608$
> = 7 and < 8	$S \times 4,55892 - 1,16411$
> = 8 and < 9	$S \times 4,57624 - 1,30303$
> = 9 and < 10	$S \times 4,5982 - 1,50526$
> = 10 and < 11	$S \times 4,71954 - 2,72814$
> = 11 and < 12	$S \times 4,8358 - 4,2204$
> = 12 and < 13	$S \times 4,9327 - 5,1375$
> = 13 and < 14	$S \times 4,9442 - 5,2861$
> = 14 and < 15	$S \times 5,0030 - 6,0788$
> = 15 and < 16	$S \times 5,0630 - 6,97582$
> = 16	$S \times 5,07 - 7,08$

9.1.5.3 Calculate the residue gravity (RG) from the specific gravity of the residue  $SG_{res}$  (from 8.2):

$$\text{Residue Gravity (RG)} = 1000 \times (SG_{res} - 1,00000)$$

9.1.5.4 Calculate the original gravity using the formula:

$$\text{Original Gravity (° Sacch.)} = \text{Gravity Lost (D)} + \text{RG}$$

9.1.5.5 Report the result to one decimal place.

## 9.2 Precision

9.2.1 The precision values obtained for real, original and apparent extract (% Plato) were determined from the data of a collaborative trial carried out by the EBC Analysis Committee in 1996. Thirteen laboratories analysed beer samples at 6 levels.

### 9.2.1.1 Real extract, % Plato

Range (% Plato)	$r_{95}$ (% Plato)	$R_{95}$ (% Plato)
2,9 to 6,0	0,02	0,02 m

where m is the mean value.

### 9.2.1.2 Original extract, % Plato

Range (% Plato)	$r_{95}$ (% Plato)	$R_{95}$ (% Plato)
7 to 12	0,07	0,19
19	0,15	0,38

### 9.2.1.3 Apparent extract, % Plato

Range (% Plato)	$r_{95}$ (% Plato)	$R_{95}$ (% Plato)
1,5 to 3,0	0,018	0,080

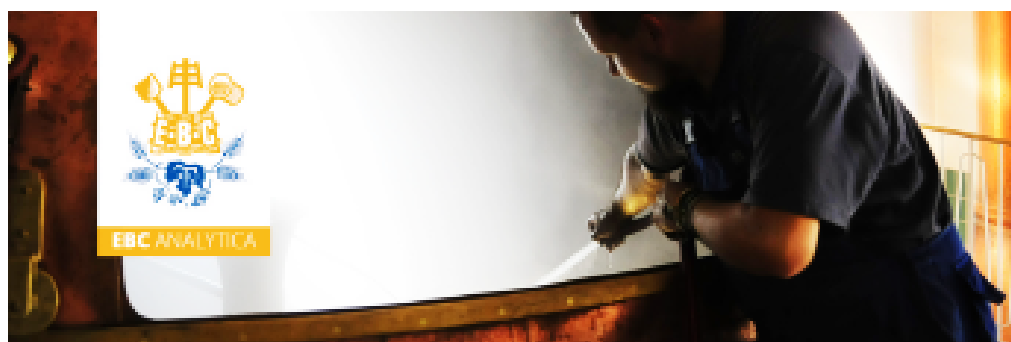
9.2.2 The precision values for original gravity (°Scch.) were determined from the data of collaborative trials carried out by the IOB Analysis Committee in 1975. Eleven laboratories analysed beer samples at 10 levels.

Range (° Scch.)	$r_{95}$ (° Scch.)	$R_{95}$ (° Scch.)
31 to 34	0,53	1,11

## 10 BIBLIOGRAPHY

- 10.1 Rosendal, I. and Schmidt, F., The Alcohol Table for Beer Analysis and Polynomials for Alcohol and Extract, *Journal of The Institute of Brewing*, 1987, 93, 373.
- 10.2 Bénéard, M., *Journal of The Institute of Brewing*, 2000, 106, 135.
- 10.3 Hudson, J.R., *Journal of The Institute of Brewing*, 1975, 81, 318.
- 10.4 Institute of Brewing *Methods of Analysis*, 1997, Method 9.6 [Beer: Original Gravity of Beer: Distillation Method].

## ANEXO C - Método EBC 9.2.3



### 9.2.3 ALCOHOL IN BEER BY REFRACTOMETRY – 2007

#### ABSTRACT

The determination of the alcohol content of beer by refractometry.

Refer to Section 0 (Safety) for relevant warning and safety precautions.

#### 1 SCOPE

The determination of the alcohol content of beer by refractometry.

#### 2 FIELD OF APPLICATION

2.1 The method can be applied to all beers. Quantified precision values were obtained over the range 0,82 to 7,37 % (v/v).

2.2 The method provides a rapid procedure for the determination of alcohol.

#### 3 REFERENCES

3.1 [EBC Method 9.2.1 \(Beer: Alcohol in Beer by Distillation\)](#).

3.2 [EBC Method 9.43.1 \(Beer: Specific Gravity of Beer using a Pycnometer\)](#) or [9.43.2 \(Beer: Specific Gravity of Beer using a Density Meter\)](#).

3.3 Instruction Manual for the equipment used (e.g. Bellingham and Stanley, Carl Zeiss, Metler Toledo or equivalent).

3.4 International Standard, Water for analytical laboratory use – Specification and test methods, ISO 3696:1987.

## 4 PRINCIPLE

4.1 The beer is degassed, avoiding loss of alcohol content from evaporation, whilst ensuring that all carbon dioxide is removed such that it cannot interfere in the analysis.

4.2 The degassed and filtered sample is transferred into the measurement prism of the refractometric equipment either manually or by means of a semiautomatic or an automatic sampling device.

4.3 The refractive index at 20 °C, based on the critical angle of the total reflected light of the liquid (beer), is measured.

4.4 The specific gravity of the beer is determined and the alcohol content is obtained from the specific gravity and refractive index using a regression equation.

4.5 Universal regression equations have been obtained for a wide range of beers [see 11.1, 11.2 and 11.3]. However, if required, breweries can derive an equation of greater accuracy for their own use.

## 5 REAGENTS

5.1 Use water of at least grade 3 as defined in ISO 3696:1987.

5.2 Standard reference refractive index solution, e.g. from R.P. Cargille Laboratories, Inc., USA.

## 6 APPARATUS

### 6.1 Refractometers

6.1.1 Analogic refractometer with immersion prism (dipping type) (complete with beakers and mirror, etc.) or thermoprism (flow through type), No.1 for refractive index 1,3254 to 1,3664 and calibrated using the Zeiss Pulfrich Scale (Bellingham and Stanley, Carl Zeiss or equivalent).

6.1.1.1 Light source, sodium spectral lamp NaE or other light source as recommended for the refractometer used.

6.1.1.2 Water bath, 20,0 ± 0,05 °C.

6.1.2 Digital refractometers with prism in a measuring cell for refractive index 1,32 to 1,58 measured at D-line of sodium (wavelength of 589,3 nm) to 4 or better 5 decimal places (Mettler Toledo or equivalent).

6.1.2.1 Light source, diode (LED) type or the equivalent recommended for the equipment used.

6.1.2.2 Temperature control, Peltier built-in thermostat to ± 0,01 °C or the equivalent recommended.

6.2 Filter funnels.

6.3 Clock glasses and/or Petri dishes.

6.4 Filter papers, folded and dry (Whatman No. 1, S&S 5600 or equivalent).

6.5 Conical flasks, 150 ml and 300 ml.

6.6 Water bath, thermostatically regulated, kept at 17 to 20 °C.

## 7 PREPARATION OF SAMPLES

7.1 Remove excess carbon dioxide by shaking, by hand, 100 to 200 ml of beer in a 300 ml conical flask at a temperature of 17 to 20 °C. Shake gently at first and then vigorously until gases no longer escape from the beer. During shaking keep the flask closed.

7.2 Filter the beer through a dry filter paper in a funnel, covered with a clock glass, into a second flask. Reject the first 20 ml of filtrate.

7.3 Repeat this shaking and filtering step until the beer is completely degassed.

## 8 PROCEDURE

### 8.1 Derivation of a regression equation

8.1.1 To convert the scale reading of the refractometer to alcohol content it is necessary to derive a regression equation from measurements of alcohol content by the reference distillation method, refractive index and specific gravity.

8.1.2 Select about 10 to 20 samples of beer similar to the sample to be analysed.

8.1.3 Determine, from the degassed beer samples, the alcohol content by the reference distillation method (see 3.1), the refractive index and the specific gravity (see 3.2).

8.1.4 Calculate the constants a, b and c employed in the following equation, using a multiple linear regression statistical programme:

$$A \text{ (‰ (m/m) or ‰ (V/V))} = a \text{ (BR - WR)} - b \text{ (PG)} - c$$

where

A = alcohol of degassed beer obtained by distillation, in ‰ (m/m) or ‰ (V/V)

BR = refractometer reading of degassed beer at 20 °C

WR = refractometer reading of water at 20 °C

PG = present gravity of degassed beer which is obtained from the specific gravity according to:  $1000 (SG_{20} - 1,00000)$

$SG_{20}$  = specific gravity of degassed beer at 20 °C/20 °C to 5 decimal places

### 8.2 Determination

#### 8.2.1 Using an immersion prism

8.2.1.1 Temperate the beer samples in a water bath at  $20,0 \pm 0,05$  °C. Include a sample of water to act as a blank.

8.2.1.2 Switch on the light source of the refractometer and temperate the prism to 20 °C at least 10 min before use by immersing the prism in a beaker of water at 20 °C.

8.2.1.3 Ensure that the border line of the scale is well defined with a sharp edge. If a coloured band is visible, adjust the colour compensator to minimise the effect.

8.2.1.4 Record the scale reading of the refractometer for water at 20 °C. The scale reading for water at 20 °C should be 14,50 for prism E and 85,50 for prism T. Minor deviations from these values will not significantly affect the results.



8.2.1.5 Record the refractometer reading for the beer samples at 20 °C. Clean and dry the prism after each sample.

#### 8.2.2 Using a thermoprism

8.2.2.1 Proceed according to sub-clause 8.2.1 from 8.2.1.1 to 8.2.1.5 with the following exception.

8.2.2.2 Open the prism, pour water (at 20 °C) over the prism and then close. Wait for 1 to 2 min before taking a reading. Then replace the water with the beer sample avoiding foam and bubble formation.

#### 8.2.3 Using a digital refractometer

8.2.3.1 Start up, condition, adjust, calibrate and use the instrument according to the manufacturer's operating instructions.

8.2.3.2 Use – if it is available – the troubleshooting menu commands to ensure that the equipment is in good working order.

8.2.3.3 After turning on the instrument allow at least 30 min for the instrument to warm up and stabilize before performing any adjustment.

8.2.3.4 Open the cover lid and clean the measurement cell (prism) thoroughly with water and acetone to remove any organic residue. Wipe it dry with a soft tissue or equivalent.

8.2.3.5 Daily check the working condition with a zero point adjustment with air and with a water adjustment ( $n_{D,20} = 1,33299$ ). The instrument is now ready for sample measurements.

8.2.3.6 Establish a manual or automatic sample sequence: sampling, draining, rinsing, purging, drying.

8.2.3.7 Introduce the sample until the cell is covered. Allow air and CO<sub>2</sub> bubbles to escape avoiding alcohol evaporation. Record the refractive index value displayed.

8.2.3.8 When all the samples have been analysed, drain, clean and dry the measurement cell (and connecting tubing if any).

8.2.3.9 Periodically check the accuracy of the instrument with a standard, certified reference solution e.g. from R.P. Cargille Laboratories, Inc., USA or with a standard prepared in-house and the temperature with a reference thermometer.

8.2.3.10 The instrument should be always checked at the measuring temperature (20 °C) to ensure correct measurement.

8.3 Measure the specific gravity (SG<sub>W</sub>) of the degassed beer samples at 20 °C/20 °C to 5 decimal places using a pycnometer or a density meter (see 3.2).

## 9 CALCULATION AND EXPRESSION OF RESULTS

### 9.1 Calculation

9.1.1 Obtain the alcohol content either as % (V/V) or % (m/m) by inserting the refractometric values obtained for the beer and water and the specific gravity of the degassed beer (8.3) into the regression equation.

9.1.2 Express the results as alcohol either as % (m/m) or % (V/V) to 2 decimal places.

## 9.2 Precision

The precision values given below were determined from the data of a collaborative trial carried out by the EBC Analysis Committee in 1995/1996 in which 7 to 9 laboratories analysed (using their own formula) 12 beer samples at 6 levels in the range 0,82 to 7,37 % (V/V).

Range [% (V/V)]	$r_{95}$ [% (V/V)]	$R_{95}$ [% (V/V)]
0,82 to 7,37	0,045	0,168

## 10 BIBLIOGRAPHY

10.1 Berglund, V., Emington, W. and Rasmussen, K.O., *Wochenschrift für Brauerei*, 1934, 51, 233.

10.2 Schild, E. and Irgang, G., *Brauwissenschaft*, 1956, 9, 1314 and 1957, 10, 19.

10.3 Brown, D.G.W., *Journal of The Institute of Brewing*, 1977, 83, 41.

## ANEXO D - Método EBC 9.45



### 9.45 ENERGY VALUE OF BEER BY CALCULATION – 2005

#### ABSTRACT

A mathematical procedure to calculate the energy value of beer from the sum of the energy values of the significant beer components as determined by other methods.

#### 1 SCOPE

A mathematical procedure to calculate the energy value of beer from the sum of the energy values of the significant beer components as determined by other methods.

#### 2 FIELD OF APPLICATION

2.1 The method can be applied to all beers.

2.2 The method is the official method for calculation of energy value (in kilocalories or kilojoules; 1 kcal = 4,1868 kJ) (ASBC = 4,184, IOB 4,1855 and if you apply the kcal and kJ calculation formula, as example for a beer pilsner type, the ratio between the two results can be 4,182, because the ratio kJ/kcal is different for each sum's component: so for alcohol 29/7 = 4,143, for carbohydrates 7/4 = 4,250 and for protein 17/4 = 4,250) for labelling of beverages to meet the requirements of the EC Directive 90/496/EBC, Nutritional Labelling Rules, definition of Energy Value.

2.3 The kilocalorie in nutritional science is commonly referred to as the calorie or "large" calorie and is based on the 15 °C calorie.

2.4 It should be noted that EBC Method 9.26 does not include a full contribution from any pentosans present.

2.5 If it is thought that the product contains significant quantities of polyols (e.g. glycerol) then EBC Method 9.33 is available and the EC factors below for converting polyols must be used and the energy added to the total obtained in 6.1

Energy E (kcal/100 ml) = glycerol (g/100 ml) x 2,4 Energy E (kJ/100 ml) = glycerol g/100 ml) x 10

### 3 REFERENCES

- 3.1 [EBC Method 9.2.1 \(Beer: Alcohol in Beer by Distillation\)](#).
- 3.2 [EBC Method 9.2.4 \(Beer: Ethanol in Beer by Gas Chromatography\)](#).
- 3.3 [EBC Method 9.26 \(Beer: Total Carbohydrate in Beer by Spectrophotometry\)](#).
- 3.4 [EBC Method 9.9.1 \(Beer: Total Nitrogen in Beer: Kjeldahl Method\)](#).
- 3.5 EC Directive (90/496/EEC) Nutritional Labelling Rules.
- 3.6 Rosendal, L. and Schmidt, F., The Alcohol Table for Beer Analysis and Polynomials for Alcohol and Extract, Journal of The Institute of Brewing, 1987, 93, 373.
- 3.7 International Organization of Legal Metrology, International Recommendation No. 22, Alcoholometry "International alcoholometric tables", Table Va, First edition, Paris 1973.

### 4 PRINCIPLE

The energy value is calculated from the sum of the energy values of the significant beer components: alcohol, total carbohydrate and protein. These determinations are made using EBC methods 9.2.1 or 9.2.4, 9.26 and 9.9.1 respectively.

### 5 PROCEDURE

5.1 Determine the alcohol content of the beer as % (m/m) by the appropriate EBC Method 9.2.1 or 9.2.4 for the determination of alcohol.

5.1.1 Recalculate the alcohol content of the beer in % (m/m) according to the formula below and express the result as alcohol A in g/100 ml.

$$\text{Alcohol A [g/100 ml]} = \text{alcohol [\% (m/m)]} \times \rho$$

where  $\rho$  is the density of the beer at 20 °C (see 3.5 and 3.6).

5.2 Determine the total carbohydrate content of the beer in g/100 ml as glucose by EBC Method 9.26.

5.3 Determine the total nitrogen content of the beer in mg/litre by EBC Method 9.9.1.

5.3.1 For conversion to protein use the formula:

$$\text{Protein [g/100 ml]} = (\text{Total N [mg/litre]} \times 6,25) / 10000 = \text{Total N [mg/litre]} \times 6,25 \times 10^{-4}$$

### 6 EXPRESSION OF RESULTS

6.1 Calculation

The energy value can be calculated either in kilocalories (kcal) or in kilojoules (kJ) using factors prescribed in EC Directive (90/496/EEC):

- Energy E (kcal/100 ml) = (A x 7) + (C x 4) + (P x 4)

- 2 -

- Energy E (kJ/100 ml) = (A x 29) + (C x 17) + (P x 17)

or using the total nitrogen content of the beer as a measure of the protein content:

- Energy E (kcal/100 ml) = (A x 7) + (C x 4) + (N x 0,0025)
- Energy E (kJ/100 ml) = (A x 29) + (C x 17) + (N x 0,0106)

where

A = alcohol, in g/100 ml

C = carbohydrate, in g/100 ml as glucose

P = protein, in g/100 ml

N = total N, in mg/litre

6.2 Report the result in kcal or kJ to one decimal place.

6.3 As an alternative to the official EC method an estimated energy value can be calculated from the alcohol and real extract values of the beer (see 7.3).

$$\text{Energy value E (kcal/100 ml)} = \text{density of the beer (g/ml)} \times (3,5 \times E_r + 7 \times A)$$

or

$$\text{Energy value E (kJ/100 ml)} = \text{density of the beer (g/ml)} \times (15 \times E_r + 29 \times A)$$

where

$E_r$  = real extract, in % m/m

A = alcohol, in % m/m

6.4 Precision

6.4.1 The precision of the determination of the energy value by calculation has been evaluated by application of "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement" (see 7.4). The reported uncertainty (U) (see 7.2) is an expanded uncertainty calculated using a coverage factor of 2 which gives a level of confidence of approximately 95 %.

6.4.1.1 For repeatability

$$U \text{ (kcal/100 ml)} = 2 \times \{ [5,625 \cdot 10^3 + 1,875 \cdot 10^3 \times A + 1,56 \cdot 10^4 \times A^2] + [3,265 \cdot 10^3 + 3,265 \cdot 10^3 \times C + 8,16 \cdot 10^3 \times C^2] + [3,906 \cdot 10^3 + 1,339 \cdot 10^3 \times N + 1,148 \cdot 10^{10} \times N^2] \}^{1/2}$$

or

$$U \text{ (kJ/100 ml)} = 2 \times \{ [9,65 \cdot 10^3 + 0,0322 \times A + 2,68 \cdot 10^4 \times A^2] + [5,8976 \cdot 10^3 + 5,8976 \cdot 10^3 \times C + 1,47 \cdot 10^3 \times C^2] + [7,02 \cdot 10^3 + 2,407 \cdot 10^3 \times N + 2,063 \cdot 10^9 \times N^2] \}^{1/2}$$

And then, the reporting energy content should be made as:

$$E \pm U \text{ in kcal/100 ml or kJ/100 ml}$$

## 6.4.1.2 For reproducibility

$$U \text{ (kcal/100 ml)} = 2 \times \{[5,625 \cdot 10^{-8} + 7,5 \cdot 10^{-8} \times A + 2,5 \cdot 10^{-8} \times A^2] + [1,27 \cdot 10^{-4} \times C^2] + [7,97 \cdot 10^{-8} + 7,97 \cdot 10^{-7} \times N + 1,99 \cdot 10^{-8} \times N^2]\}^{1/2}$$

or

$$U \text{ (kJ/100 ml)} = 2 \times \{[0,0965 + 0,1237A + 0,0429A^2 + 2,3037 \times C^2 + 1,433 \cdot 10^{-8} + 1,433 \cdot 10^{-7} \times N + 3,98 \cdot 10^{-8} \times N^2]\}^{1/2}$$

And then, the reporting energy content should be made as:

$$E \pm U \text{ in kcal/100 ml or kJ/100 ml}$$

6.4.2 Precision values (U) calculated from the errors of the component analysis are dependent for normal beers mainly upon the level of carbohydrate in the beer.

6.4.3 As a guide, in an IOB Analysis Committee collaborative trial (see 7.1), where 10 laboratories made single determinations on 4 beers in kcal/100 ml, the mean precision values were:

Beer Type	Carbohydrate (g/100 ml)	U
Diet/Lite	0,7	2,02
Premium lager/pale ale	3 - 5	3,06

## 7 BIBLIOGRAPHY

- 7.1 Martin, P.A., Journal of The Institute of Brewing, 1982, 88, 320.
- 7.2 Appendix 1 to EBC Method 9.45 – Quantifying Uncertainty of Beer Energy Value (see at [www.ebc-nl.com](http://www.ebc-nl.com)).
- 7.3 MEBAK Band II, 2002, Method 2.12, Physiologischer Brennwert.
- 7.4 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, EURACHEM/CITAC Guide, Second Edition 2000.
- 7.5 Institute of Brewing Methods of Analysis, 1997, Method 9.30, Beer: Energy Value of Beer (Calculation).
- 7.6 EBC Method 9.33 (Beer: Glycerol in Beer: Enzymatic Method).

## ANEXO E - Método EBC 9.35



### 9.35 PH OF BEER (FORMERLY PUBLISHED AS IOB METHOD 9.42) – 2004

#### ABSTRACT

The determination of pH at 20 °C of decarbonated beer using a pH meter.

Refer to Section 0 (Safety) for relevant warning and safety precautions.

#### 1 SCOPE

The determination of pH at 20 °C of decarbonated beer using a pH meter.

#### 2 FIELD OF APPLICATION

The method can be applied to all beers. Complete degassing of samples must be achieved.

#### 3 REFERENCE

[EBC Method 1.5 \(Care and Adjustment of Apparatus: Care and Adjustment of Apparatus: pH Meters\).](#)

#### 4 PRINCIPLE

The pH of beer is estimated using a pH meter and a suitable electrode system.

#### 5 REAGENTS

Use the reagents as specified in EBC Method 1.5.

#### 6 APPARATUS

6.1 Filter funnels.

6.2 Medium fast qualitative folded filter paper e.g. Schleicher and Schuell 597 1/2 or equivalent.

6.3 Conical flasks.

- 1 -

*This document or any of its parts cannot be altered, reproduced, sold, transferred or distributed without the explicit consent of The Brewers of Europe/ EBC. The use of this document shall comply with the General Terms and Conditions available [here](#).*

6.4 Water bath, attempered to  $20 \pm 1$  °C.

Further refer to EBC Method 1.5.

## 7 PROCEDURE

### 7.1 Sample preparation

Remove excess carbon dioxide by shaking about 200 ml of beer in a 500 ml flask at a temperature of  $20 \pm 1$  °C. Shake gently at first and then vigorously, until gases no longer escape from the beer. During shaking the flask is kept closed by hand. Filter the beer through a dry folded filter paper in a funnel into a second conical flask. Repeat this shaking and filtering step to be sure that the beer is completely degassed.

*Note:* a single shaking and filtering is sometimes not sufficient to obtain a stable pH end-value. Furthermore, inadequate degassing will result in residual CO<sub>2</sub> contributing to an unstable pH reading. Double shaking and filtering is the best degassing procedure for measuring pH of degassed beer.

### 7.2 Analysis

Proceed according to the instructions given in EBC Method 1.5, clause 7.

## 8 EXPRESSION OF RESULTS

8.1 Report the pH result to two decimal places at 20 °C. pH has no units of measurement but is expressed at 20 °C.

8.2 Precision values determined by IOB Analysis Committee in 1997 when 42 laboratories analysed 2 beers are given below as a guideline (a variety of different degassing techniques were used by the participants).

Range	$r_{95}$	$R_{95}$
3,94 to 4,42	0,025	0,133

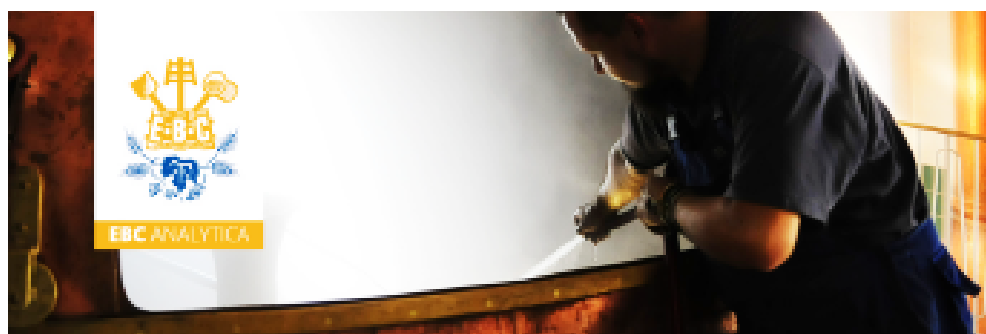
## 9 BIBLIOGRAPHY

9.1 Harrison, H.R., *Journal of The Institute of Brewing*, 1998, 104, 123.

9.2 For further bibliography see EBC Method 1.5.



## ANEXO F - Método EBC 9.8



### 9.8 BITTERNESS OF BEER (IM)- 2004

#### ABSTRACT

The determination of the bitter substances in beer, which are mainly iso- $\alpha$ -acids.

Refer to Section D (Safety) of EBC Methods for relevant warning and safety precautions.

#### 1 SCOPE

The determination of the bitter substances in beer, which are mainly iso- $\alpha$ -acids.

#### 2 FIELD OF APPLICATION

2.1 The method can be applied to all types of filtered beers. Turbid beers must be clarified by centrifugation.

2.2 The results are only valid if the beer does not contain the following compounds: n-heptyl-4-hydroxybenzoate, saccharin, salicylic acid, sorbic acid. These compounds are extracted by iso-octane and absorbed at 275 nm, but their presence can be detected because they change the shape of the absorption curve.

#### 3 REFERENCE

International Standard, Water for analytical laboratory use – Specification and test methods, ISO 3696:1987 (E).

#### 4 PRINCIPLE

The bitter substances are extracted from acidified beer with iso-octane. After centrifugation, the absorbance of the iso-octane layer is measured at 275 nm, against a reference of pure iso-octane.

## 5 REAGENTS

5.1 Unless otherwise stated, use only reagents of recognised analytical grade and only water of at least grade 3 as defined in ISO 3696:1987 [E].

5.2 Iso-octane (2,2,4-trimethyl pentane) for UV spectroscopy. The absorbance of this solvent must be below 0,010 when measured at 275 nm in a 10 mm cuvette against a reference of distilled water.

5.3 Hydrochloric acid, c(HCl) is 6 M.

## 6 APPARATUS

6.1 UV spectrophotometer, with a slit width of less than 2 mm.

6.2 Silica cuvettes, 10 mm optical path length.

6.3 Centrifuge, operating speed 3000 rpm.

6.4 Rotary shaker, amplitude 2-3 cm.

6.5 Shaker, wrist action or platform type.

6.6 Glass balls.

6.7 Centrifuge tubes, 35 ml with screw thread necks and plastic caps for the tubes with polypropylene inserts to render them solvent tight.

6.8 Glass conical flasks, 50 ml and stoppers.

6.9 Pipettes, 0,5 ml, 10 ml and 20 ml or, alternatively, 0,5 ml and 20 ml volumetric dispensers.

## 7 PREPARATION OF SAMPLES

7.1 Degas all beer samples without loss of foam and attemperate to approximately 20 °C before analysis. Gentle stirring with a magnetic stirrer on a low speed to avoid foaming is recommended. The addition of degassing agents or degassing by filtration may result in a decrease in bitterness and is therefore not recommended. Plastic containers must not be used.

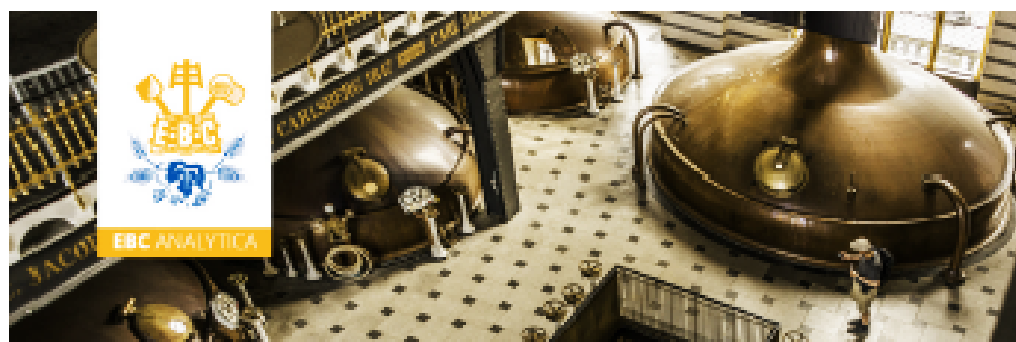
7.2 Iso- $\alpha$ -acids adsorb onto glass. For every clean glass surface (new glass flasks and/or thoroughly cleaned glass flasks) in which iso- $\alpha$ -acids are exposed, there will be a drop in the measured bitterness. Therefore it is recommended to rinse thoroughly cleaned and/or new glassware first with an iso-octane beer extract before use.

## 8 PROCEDURE

8.1 Pipette exactly 10 ml of degassed beer into a 35 ml centrifuge tube or a 50 ml conical flask. Add 0,5 ml of hydrochloric acid followed by 20 ml of iso-octane. Place 2 to 3 glass balls in the centrifuge tube.

8.2 Screw a cap with a polythene insert onto the centrifuge tube or stopper the flask and ensure a solvent tight seal.

## ANEXO G - Método EBC 3.1.1.1



### 3.1.1.1 HAEMOCYTOMETRY – 2011

#### ABSTRACT

Determination of the yeast cell concentration in stored pitching yeast, fermenting or stored beer.

Descriptors: Haemocytometry, counting chamber, counting chambers (Thoma, Malassez, Bürker-Türk, Neubauer), counting area

#### SCOPE

Determination of the yeast cell concentration in stored pitching yeast, fermenting or stored beer.

#### PRINCIPLE

A drop of the yeast cell suspension is placed on a slide with a counting chamber. The counting chamber has a well defined volume and is subdivided into squares on the bottom surface. Counting is effected under a microscope and viable as well as dead cells are counted. A high yeast cell concentration is needed ( $10^8$  cell/ml minimum).

#### EQUIPMENT

- Microscope with bright field or phase contrast illumination and about 500x magnification
- Haemocytometer cover slip
- Pipettes, fine tip, 1 and 10 ml volume.
- Volumetric flask, 100 ml
- Beaker, 250 ml
- Magnetic plate and stirring bar
- Haemocytometer, double chamber with clips, preferably

Haemocytometers are available with different counting chambers (Thoma, Malassez, Bürker-Türk, Neubauer). Confirm the identity and volume of the counting chamber to be used.

Thoma Chamber and Neubauer or Neubauer improved are the preferred types.

Thoma Chamber large square is equivalent to the central square of a Neubauer or Neubauer improved Chambers (figure 2a, 2b). Depth and area of the large square being equal (0.1 mm deep and  $1 \text{ mm}^2$  area) so the volume is  $0.0001 \text{ ml}$  ( $10^{-4} \text{ ml}$  or  $10^{-3} \text{ mm}^3$ ). Therefore any count on this area has to be multiplied by  $10^4$  to calculate the cell concentration by ml.

- 1 -

*This document or any of its parts cannot be altered, reproduced, sold, transferred or distributed without the explicit consent of The Brewers of Europe / EBC. The use of this document shall comply with the General Terms and Conditions available [here](#).*

Characteristics :

	NEUBAUER	THOMA	NEUBAUER improved
Depth	0.1 mm	0.1 mm	0.1 mm
Number of large squares	9	1	9
Large sq. area	1 mm <sup>2</sup>	1 mm <sup>2</sup>	1 mm <sup>2</sup>
Number of medium squares per large sq.	16 (9 med. sq. in triple line area, apart)	16 (9 med. sq. in triple line area, apart)	25 (half of triple line area included in each med. sq.)
Side of medium sq.	0.2 mm	0.2 mm	0.2 mm
Number of small sq. per medium sq.	16	16	16
Side of small sq.	0.05 mm	0.05 mm	0.05 mm
Small sq. area	0.0025 mm <sup>2</sup>	0.0025 mm <sup>2</sup>	0.0025 mm <sup>2</sup>
Total small sq.	256	256	400

Follow the manufacturer's instructions to carry out the cell count.

As an example, for Neubauer improved Chamber, take 25 medium squares (25 x 16 = 400 small squares, or one large square) as the counting area, using the central line of triple lines as boundaries. This will give a total counting area of 1 mm<sup>2</sup>.

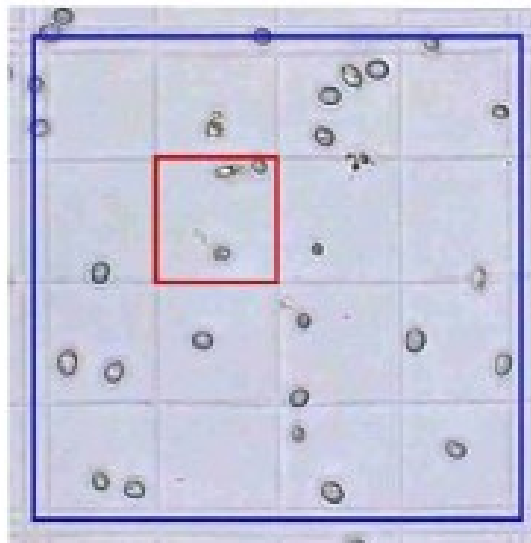


Figure 1. Neubauer improved haemocytometer showing medium size square in blue (0.2 mm side) and small square in red (0.05 mm side). (Courtesy of Grupo Mahou-San Miguel)

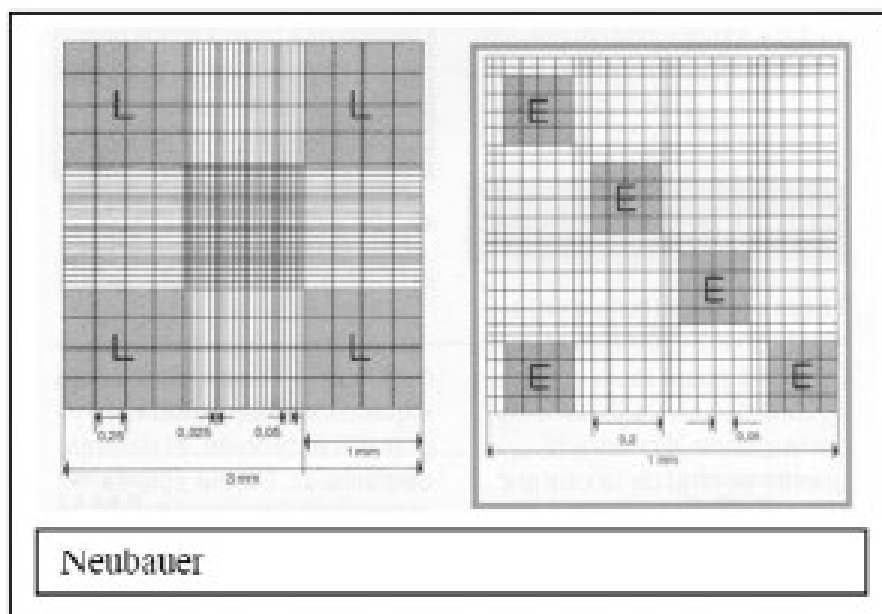


Figure 2a. Different types of counting chambers (Courtesy of BRAND, Wertheim, Germany)

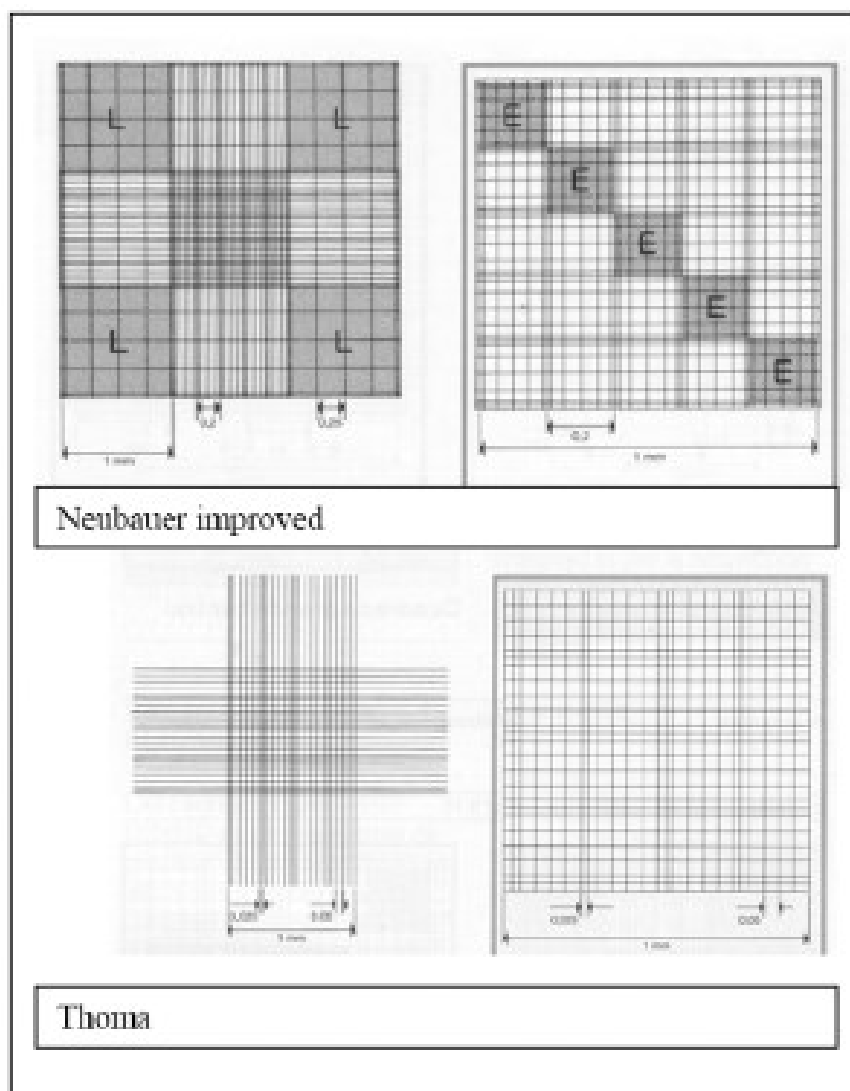


Figure 2b. Different types of counting chambers (Courtesy of BRAND)

## REAGENTS

- Sulphuric acid

## PROCEDURE

### Cleaning the counting chamber

The counting chamber and cover slip must be clean and dry before use. It may be necessary to scrub the ruled area. Clean with tap water and dry with soft paper. Dirty counting chambers may influence the volume of sample over the counting area.

The rigid cover slip should be placed over the counting chamber in a way that both counting sections are equally covered. Use the clips to press the cover slip against the support areas until "Newton's Rings" appear (iridescence lines). When there are no clips, be careful not to move the cover slip when filling the Chamber.

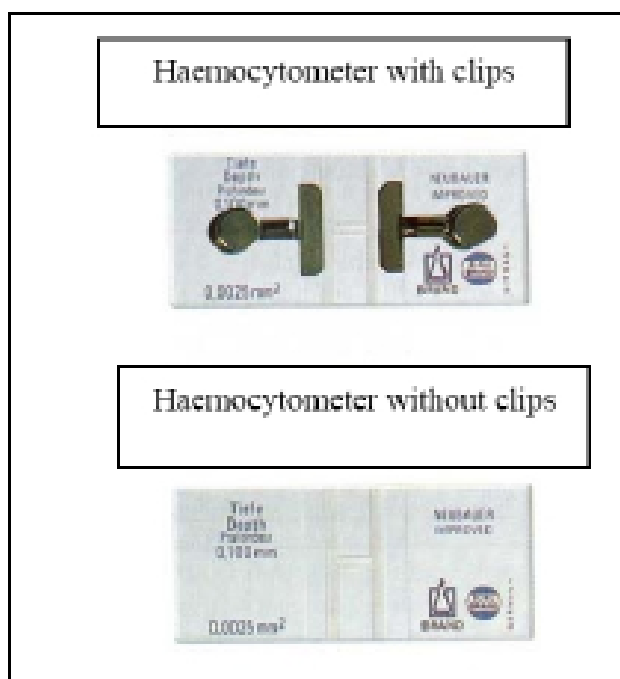


Figure 3. Haemocytometer with/without clips and cover slip (Courtesy of BRAND, Wertheim, Germany)

#### Preparation of the Sample

The sample of beer or yeast suspension has to be well mixed, degassed and diluted if necessary. If dilution is necessary use only volumetric glassware. 0.5 % sulphuric acid can be used as the diluent to avoid flocculation. The final dilution should provide a 100 ml sample at approximately pH 2.5. Take 100 ml of sample and mix for a minimum of 5 min using a magnetic stirrer.

Yeast cells in fermenting beer may normally be counted directly. Pitching yeast must be diluted 10-50 times (depending on the thickness of the yeast slurry). Yeast samples from a storage tank can be prepared by weight and fluidised by addition of 0.2 ml 7N sulphuric acid per 50 ml of slurry.

#### Filling the Haemocytometer

The positioning of the cover slip in relation to the counting chamber determines the volume of the counting chamber. It is extremely important to fill the haemocytometer correctly as sedimentation of cells during this process is the main source of errors in cell counts. The sample is constantly stirred immediately prior to counting. A portion of the sample is taken up in a fine-tip pipette after which the tip of the pipette is wiped dry. After expelling three or four drops of solution away from the Chamber, allow a small drop of sample to flow between the haemocytometer and the cover slip. Do the same in the other part of the Chamber. The counting area should be completely filled but no liquid should extend into the most.

Let the prepared slide stand for 1 to 3 minutes for the yeast cells to settle, and place it under the microscope.

#### Counting

Count all cells in the big central square (25 medium size squares) and in both chambers.

- 5 -

*This document or any of its parts cannot be altered, reproduced, sold, transferred or distributed without the explicit consent of The Brewers of Europe / EBC. The use of this document shall comply with the General Terms and Conditions available [here](#).*

To eliminate the possibility of counting some yeast cells twice, it is necessary to standardise the counting technique. See Fig. 1, blue boundary lines. Cells touching or resting on the top and right boundary lines are not counted. Cells touching or resting on the bottom or left boundary lines are counted. Yeast cells that are budded are counted as one cell if the bud is less than one-half the size of the mother cell. If the bud is equal to or greater than one-half the size of the mother cell, both cells are counted.

To obtain accurate cell counts, it is advisable to count no fewer than 10 cells per medium square on the entire 1 mm<sup>2</sup> ruled area. If the concentration of cells is more than 50 cells per medium square, the sample should be diluted as necessary. If a dilution is used, the dilution factor must be used in the calculation.

Counts from both sides of the slide should agree within 10 %.

## EXPRESSION OF RESULTS

Number of cells/ml = (number of cells in the total area of 1 mm<sup>2</sup>) x (dilution factor) x 10<sup>4</sup>

Example for a Neubauer improved chamber :

Amount of cells in a big square (25 medium squares as in Fig. 1).

29	27	33	22	28
26	28	31	37	25
31	31	30	30	30
24	27	24	30	25
34	32	21	24	33

Total cells in 1 mm<sup>2</sup> area of one chamber is 712. Count the other chamber for example, 756 cells and take the average of the 2, that is 734.

In case no dilution of the original sample is made, calculate as follows.

Yeast cells per ml = 734 x 10<sup>4</sup> = 7.3 x 10<sup>8</sup> cells / ml

In case of dilution, multiply result by dilution factor.

## NOTE

For best statistical results, repeat the counting by preparing new slides.

In Germany there is a requirement to use only chambers calibrated according to the requirements of the German gauging office.

In this method, viability can also be analysed if the final diluted sample is well mixed at equal volumes with the staining solution, taking care not to go under lower limit for counting. Remember not to use phase contrast for viability counts.

In case of acidified samples, viability may be affected by the change of pH and it is strongly recommended to study the influence of this treatment on the viability result.



## ANEXO H - Método EBC 3.2.1.1



### 3.2.1.1 METHYLENE BLUE / VIOLET STAIN – 2011

#### ABSTRACT

Rapid estimation of the percentage of "viable" yeast cells by counting dead cells. The method is applicable to all samples containing yeast.

Descriptors: Methylene Blue / Violet Stain, ratio between total and dead cells

#### SCOPE

Rapid estimation of the percentage of "viable" yeast cells by counting dead cells. The method is applicable to all samples containing yeast.

#### PRINCIPLE

Viable yeast cells will reduce methylene blue or methylene violet dye to a colourless stage. Dead yeast cells with no enzymatic activity will be stained blue / violet. Viability is calculated from the ratio between total and dead cells.

#### EQUIPMENT

- Bright field microscope, 400x magnification
- Microscope slides and cover slips
- Test tube and stirring rod
- Filter paper

#### REAGENTS

- Dissolve 0.01 g Methylene Blue or Methylene Violet 3RAX and 2.0 g sodium citrate dihydrate in a small volume (10 ml approx.) of distilled water
- Filter and make up the filtrate to 100 ml with distilled water
- Store at  $4 \pm 1$  °C for up to one month

## PROCEDURE

---

Thoroughly mix the sample containing yeast and make a suitable dilution with sterile saline to give approximately  $10^7$  cells/ml. After mixing 1:1 with the methylene blue or methylene violet stain, this will give about 100 cells in a microscope field. Place a small drop of well mixed suspension on a microscope slide and cover with a cover slip. Examine microscopically using a magnification of approximately 400x after 1-5 minutes contact with the stain.

There is evidence that dilution of the original sample in distilled water instead of saline (NaCl 0.9 %) will result in slightly lower viabilities.

Count a total of at least 500 cells, noting the number that are dead. Cells staining blue or violet are considered to be dead, along with broken shrivelled and plasmolysed cells. Yeast cells that are budding are counted as one cell if the bud is less than one half the size of the mother cell. If the bud is equal or greater than one half the size of the mother cell, both cells are counted. Live cells are colourless.

## EXPRESSION OF RESULTS

---

% viability by Methylene Blue or Methylene Violet =  $100 - \% \text{ dead cells}$

## NOTE

---

The best method to determine the percentage of viable cells in a population is the traditional plate viable count or the equivalent slide culture technique. Unfortunately, this method is not applicable to chain forming or too flocculent yeasts, as they provide an under-estimation of viability. It also takes too long to be of practical use in the brewery.

Methylene blue has been reported to overestimate the "real" viability in samples containing less than 80 % viable cells. The methylene violet 3 RAX dye distinguishes live and dead cells with less ambiguity. Little variation in colour intensity is observed in dead and dying populations (which is not the case with methylene blue), eliminating potential operator subjectivity and assuring differentiation between stained and unstained cells.

## BIBLIOGRAPHY

---

Smart, K.A., Chambers, K.M., Lambert, I. and Jenkins, C., *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57(1): 18 (1999).

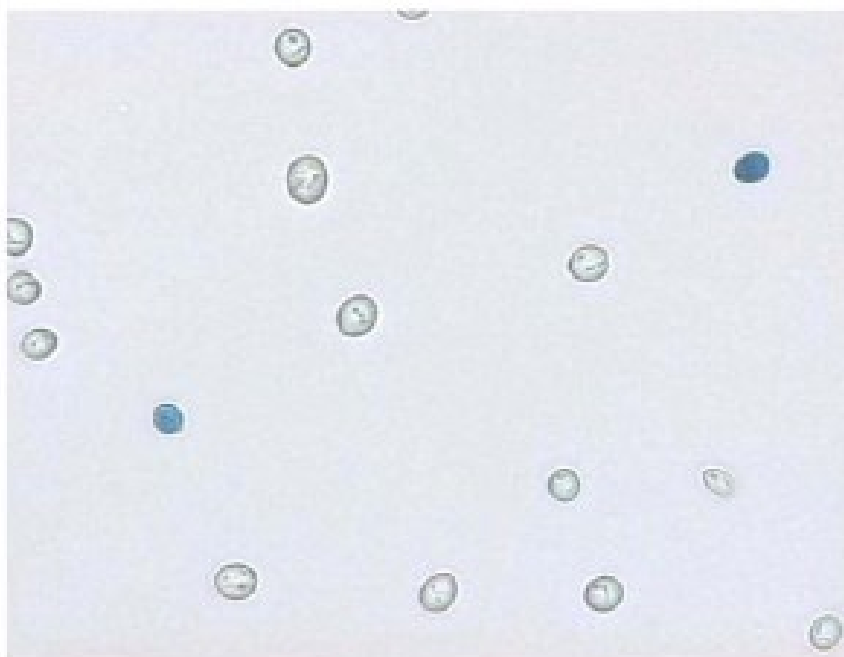


Figure 3.2.1.1a Methylene Blue stained yeast cells (courtesy of Grupo Mahou-San Miguel)

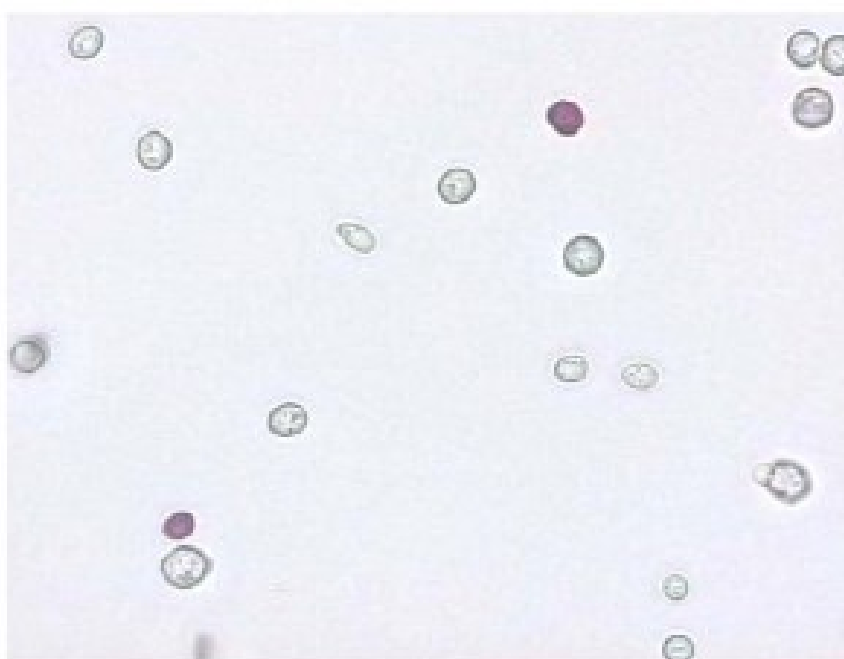


Figure 3.2.1.1b Methylene Violet stained yeast cells (courtesy of Grupo Mahou-San Miguel)

## ANEXO I - Método EBC 5.1.4



### 5.1.4 REAGENTS IN BREWERY MICROBIOLOGY – 2011

#### 5.1.4.11- 8 ANS

1-naphthalene-8-anilino sulphonic acid, Mg salt,

add 3 g to 1000 ml demineralised, sterilised water.

Dispense in dark bottles.

This solution can be stored for 7 days at 4 °C.

#### 5.1.4.2 PHYSIOLOGICAL SALINE

NaCl	g/litre
	9.0
Demineralised water to	1000 ml

#### 5.1.4.3 GRAM STAIN REAGENTS

1. Ammonium oxalate crystal violet.

- Solution A: Dissolve 2 g crystal violet in 20 ml 96 % ethanol.
- Solution B: Dissolve 0.8 g ammonium oxalate in 80 ml deionized water. Mix the two solutions. Prepare this reagent fresh each week.

2. Iodine solution.

- Lugol's solution (modified by Gram).
- Dissolve 2 g KI in 10 ml deionized water, add 1 g iodine, dissolve and make up to 300 ml with deionized water. Prepare this reagent fresh each week.

3. Safranin-O.

- Dissolve 0.25 g safranin in 10 ml 96 % ethanol and make up to 100 ml with deionized water.

4. 96 % v/v ethanol.

- 1 -

*This document or any of its parts cannot be altered, reproduced, sold, transferred or distributed without the explicit consent of The Brewers of Europe / EBC. The use of this document shall comply with the General Terms and Conditions available [here](#).*

## WARNING

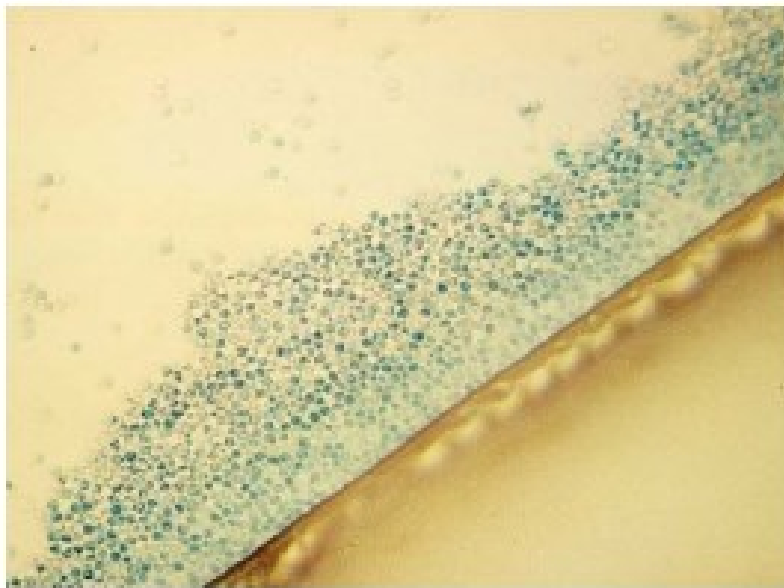
Crystal violet and iodine solutions are harmful, while saffranin is an irritant.

### 5.1.4.4 METHYLENE BLUE

1. Solution A: Methylene blue distilled water solution, 0.1 g/500 ml.
2. Solution B:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  distilled water solution, 13.6 g/500 ml.
3. Solution C:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  distilled water solution, 2.4 g/100 ml.
4. Solution D: 498.75 ml solution B + 1.25 ml solution C.
5. Solution E: Mix the 500 ml of solution D with 500 ml solution A to give final buffer methylene blue solution, with pH approx. 4.6.

## WARNING

Methylene blue solution is harmful.



Photograph 4.2 Brewing Yeast Cells Stained with Methylene Blue (supplied by K. Smart, C. Powell and S. Van Zandycke, Oxford Brookes University)