

IRATAN JORGE DOS SANTOS

**CINÉTICA DE FERMENTAÇÕES E ESTUDO DE METABÓLITOS E  
ENZIMAS INTRACELULARES ENVOLVIDAS NA FERMENTAÇÃO  
ALCOÓLICA CERVEJEIRA CONDUZIDAS COM LEVEDURAS  
DE ALTA E BAIXA FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES  
COMPOSIÇÕES DE MOSTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237c  
2005

Santos, Iratan Jorge dos, 1965-  
Cinética de fermentações e estudo de metabólitos e  
enzimas intracelulares envolvidas na fermentação alcoólica  
cervejeira conduzidas com leveduras de alta e baixa  
fermentação em diferentes composições de mosto / Iratan  
Jorge dos Santos. – Viçosa : UFV, 2005.  
xvi, 121f. : il. ; 29cm.

Orientador: Paulo Henrique Alves da Silva.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 109-121.

1. Fermentação. 2. Cinética enzimática. 3. Leveduras -  
Metabolismo. 4. Metabólitos. 5. Cerveja - Indústria.  
6. Cerveja - Composição. 7. Cerveja - Avaliação sensorial.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

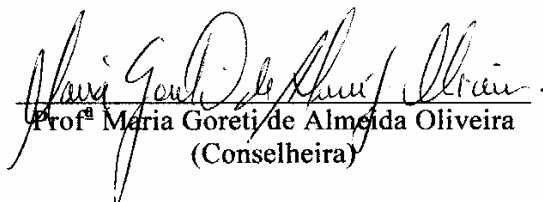
CDD 22.ed. 663.13

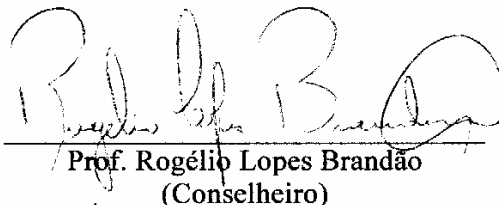
IRATAN JORGE DOS SANTOS

**CINÉTICA DE FERMENTAÇÕES E ESTUDO DE METABÓLITOS E  
ENZIMAS INTRACELULARES ENVOLVIDAS NA FERMENTAÇÃO  
ALCOÓLICA CERVEJEIRA CONDUZIDAS COM LEVEDURAS  
DE ALTA E BAIXA FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES  
COMPOSIÇÕES DE MOSTO**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Curso de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, para  
obtenção do título de *Doctor  
Scientiae*.

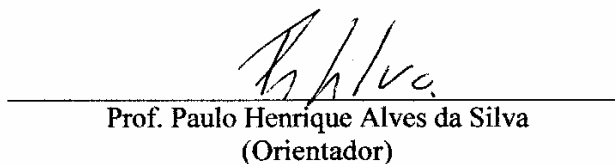
APROVADA: 29 de março de 2005.

  
Prof<sup>ª</sup> Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Conselheira)

  
Prof. Rogélio Lopes Brandão  
(Conselheiro)

  
Prof<sup>ª</sup> Flávia Maria Lopes Passos

  
Prof<sup>ª</sup> Mônica Ribeiro Pirozi

  
Prof. Paulo Henrique Alves da Silva  
(Orientador)

Aos meus pais,  
João Orestes dos Santos (*in memoriam*) e  
Eleonice Nunes dos Santos.

Aos meus irmãos.  
Aos meus sobrinhos.  
Aos meus padrinhos.

À Nátari Isla Macêdo dos Santos, minha filha

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, o nosso verdadeiro doutor, digno de receber glória, honra e poder, por ter criado todas as coisas; por sua vontade elas foram criadas e ainda existem.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À empresa Malteria do Vale, pelo apoio técnico e pela doação do malte utilizado no experimento.

Ao professor Paulo Henrique Alves da Silva, pela orientação, pelo apoio e pela amizade no transcorrer do curso e pela oportunidade de realizar o trabalho nesta área.

Ao professor Rogélio Lopes Brandão, pelas sugestões e pelo direcionamento deste trabalho.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pelas oportunas sugestões.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelas informações cedidas durante o curso.

Aos colegas do curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo companheirismo e agradável convívio.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em particular aos do laboratório de fermentações, pela prestatividade.

Aos engenheiros de alimentos Henrique, Abraão e Guilherme, pelo empenho e pela dedicação no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas da Rua Santana e do time 9 de julho, pela agradável e inesquecível convivência.

Ao Antônio Gomes da Silva, Osvaldo D. Nascimento, à Marinalva Rocha, à Maria de Fátima Souza Macêdo e aos amigos de Canavieiras-BA, que sempre torceram por mim.

À Silvânia Soares da Silva, pelo apoio e incentivo quando dizia “vai dar certo”.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

IRATAN JORGE DOS SANTOS, filho de João Orestes dos Santos e Elenice Nunes dos Santos, nasceu em Canavieiras, Bahia, no dia 2 de julho 1965.

Em 1984, formou-se em Tecnologia de Alimentos (2<sup>o</sup> Grau) pela EMARC – Escola Média de Agropecuária Regional da Ceplac.

De 1985 a 1986, trabalhou na Joalca Agroindústria Ltda., como técnico de Alimentos.

Em 1986 a 1990, trabalhou na CIBEB – Companhia de Bebidas da Bahia (Brahama), como aprendiz de mestre cervejeiro.

Em setembro de 1996, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

Em março de 1999, defendeu tese de Mestrado em Engenharia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2003, foi admitido na Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, em Barbacena-MG, como professor adjunto I-A do curso de Biotecnologia e Farmácia, passando a ser professor titular no primeiro período de 2005.

## CONTEÚDO

	<b>Página</b>
ABREVIACÕES .....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Tecnologia de produção de cerveja.....	3
2.2. Levedura .....	11
2.3. Metabólitos.....	12
2.4. Enzimas .....	19
2.5. Aspecto físico-químico de cervejas .....	24
CAPÍTULO 1 .....	28
TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	28
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
2.1. Matéria-prima .....	30
2.2. Agente fermentativo .....	31

	<b>Página</b>
2.3. Processo de fabricação de cerveja.....	31
2.3.1. Moagem do malte .....	31
2.3.2. Mosturação .....	31
2.3.3. Filtração.....	34
2.3.4. Cocção do mosto e adição de lúpulo .....	34
2.3.5. Resfriamento do mosto e correção do °Brix.....	34
2.3.6. Fermentação e maturação .....	35
2.3.7. Engarrafamento e carbonatação .....	36
2.4. Avaliação da mosturação.....	36
2.4.1. Teor de extrato do mosto primário e mosto misto.....	36
2.4.2. Massa de mosto misto .....	37
2.4.3. Rendimento da mosturação .....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
3.1. Avaliação da mosturação.....	38
3.2. Teor de extrato do mosto primário .....	38
3.3. Teor de extrato do mosto misto .....	39
3.4. Massa de mosto misto.....	40
3.5. Rendimento da mosturação .....	41
4. CONCLUSÕES.....	43
CAPÍTULO 2 .....	44
METABÓLITOS EM CERVEJA.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	46
2.1. Determinação de metabólitos extracelulares.....	46
2.1.1. Determinação de etanol .....	46
2.1.2. Determinação de glicerol .....	47
2.1.3. Determinação de acetato .....	49
2.1.4. Determinação de glicose .....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
3.1. Determinação do etanol .....	52
3.2. Determinação do glicerol.....	54
3.3. Determinação do acetato.....	56

	<b>Página</b>
3.4. Consumo de glicose.....	58
4. CONCLUSÕES.....	60
CAPÍTULO 3.....	62
ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM CERVEJA.....	62
1. INTRODUÇÃO.....	62
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1. Dosagem de proteínas.....	64
2.2. Ensaio enzimáticos.....	65
2.2.1. Preparo de extratos celulares.....	65
2.2.2. Determinação da atividade da álcool desidrogenase.....	66
2.2.3. Determinação da atividade da piruvato desidrogenase.....	66
2.2.4. Determinação da atividade da isocitrato liase.....	67
2.2.5. Determinação da atividade da fosfofrutoquinase.....	67
2.2.6. Determinação da atividade da glutamato oxaloacetato transaminase.....	68
2.2.7. Determinação da atividade da diacetil redutase.....	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
3.1. Álcool desidrogenase.....	70
3.2. Piruvato desidrogenase.....	73
3.3. Isocitrato liase.....	76
3.4. Fosfofrutoquinase.....	79
3.5. Glutamato oxaloacetato transaminase.....	83
3.6. Diacetil redutase.....	86
4. CONCLUSÕES.....	90
CAPÍTULO 4.....	92
ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DAS CERVEJAS.....	92
1. INTRODUÇÃO.....	92
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	94
2.1. Análises físico-químicas do processo fermentativo.....	94

2.1.1. Contagem de células .....	94
2.1.2. Determinação de pH .....	94
2.1.3. Atenuação.....	95
2.1.4. Extrato aparente.....	95
2.2. Análise sensorial .....	95
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	97
3.1. Análises físico-químicas .....	97
3.1.1. Contagem de células .....	97
3.1.2. pH.....	99
3.1.3. Atenuação.....	101
3.1.4. Extrato aparente (°Brix).....	103
3.1.5. Análise sensorial .....	105
4. CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

## ABREVIACOES

ADH	=	álcool desidrogenase
ADP	=	adenosina difosfato
ARA	=	arroz (ajunto) <i>ale</i> (levedura)
ARL	=	arroz (ajunto) <i>lager</i> (levedura)
ATP	=	adenosina trifosfato
Pi	=	fosfato inorgânico
CAA	=	cana (ajunto) <i>ale</i> (levedura)
CAL	=	cana (ajunto) <i>lager</i> (levedura)
CoA	=	coenzima A
DAR	=	diacetil redutase
GOT	=	glutamato oxaloacetato transaminase
ICL	=	isocitrato liase
MAA	=	maltose (ajunto) <i>ale</i> (levedura)
MAL	=	maltose (ajunto) <i>lager</i> (levedura)
MIA	=	milho (ajunto) <i>ale</i> (levedura)
MIL	=	milho (ajunto) <i>lager</i> (levedura)
NADH	=	nicotinamida adenina dinucleotideo (reduzida)
NAD <sup>+</sup>	=	nicotinamida adenina dinucleotideo (oxidado)
PFK	=	Fosfofrutoquinase
PYDH	=	piruvato desidrogenase
CV	=	coeficiente de variação

## RESUMO

SANTOS, Iratan Jorge, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2005.  
**cinética de fermentações e estudo de metabólitos e enzimas intracelulares envolvidas na fermentação alcoólica cervejeira conduzidas com leveduras de alta e baixa fermentação em diferentes composições de mosto.**  
Orientador: Paulo Henrique Alves da Silva. Conselheiros: Rogélio Lopes Brandão e Maria Goreti Almeida Oliveira.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar experimentalmente o crescimento de diferentes tipos de leveduras cervejeiras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*) em diferentes tipos de mosto (substratos), contendo arroz, milho, sorgo, maltose e cana como adjunto do malte em composição. Objetivou-se, assim, verificar se tais composições alteram a cinética de fermentação e a atividade de algumas enzimas durante o processo fermentativo em uma temperatura constante. Acompanhou-se também a presença de alguns metabólitos extracelulares (etanol, acetato e glicerol) e glicose, as características físico-químicas e microbiológicas (pH, atenuação, contagem de células, °Brix e densidade) e a qualidade sensorial das cervejas produzidas nas diferentes condições de substratos e leveduras relatadas anteriormente. Durante o preparo dos substratos foram determinados os teores de extrato dos mostos primários e mostos mistos, a massa dos mostos mistos e o rendimento da mosturação. Os processamentos das cervejas foram realizados pelos processos de

duas massas e infusão. O mosto foi inoculado com leveduras de alta e baixa fermentação. A fermentação transcorreu a 12°C, sendo encerrada quando 80% do extrato fermentável foi consumido pelas leveduras. Amostras do caldo fermentativo foram coletadas em 0, 12, 24, 36, 60, 84, 108, 132, 156 e 180 horas, no transcorrer da fermentação. Por centrifugação, as células foram separadas e posteriormente lisadas com pérolas de vidro e congeladas até o momento de análise. A quantificação enzimática (álcool desidrogenase, piruvato desidrogenase, isocitrato liase, fosfofrutoquinase, glutamato oxaloacetato transaminase e diacetil redutase) e dos metabólitos (etanol, glicerol e acetato) mais a glicose foram realizadas em testes de colorimetria em aparelho Cobas Fara. Na mosturação, o uso dos adjuntos açucarados (cana e xarope de *high maltose*) apresentou maior teor de mosto primário, maior teor de mosto misto, maior massa de mosto e maior rendimento, que represente a eficiência da mosturação e a taxa de hidrólise do amido em açúcares. Nas análises físico-químicas, o pH foi significativo para as variáveis individuais e não-significativo nas interações. Existiu diferença entre as leveduras na contagem de células, atenuação e extrato aparente. A formação de glicerol e etanol apresentou tendência de aumento ao longo do processo e a produção de acetato foi variável, com bastante oscilações. Constatou-se que o consumo de glicose inicia-se efetivamente após 60 horas. A atividade da álcool desidrogenase apresentou maiores picos de produção em cultivos com a levedura *ale*, em relação à levedura *lager*, o que não influenciou os níveis de etanol para as duas leveduras. As melhores atividades da piruvato desidrogenase no cultivo da levedura *ale*, foi nos substratos maltose, sorgo e cana e para *lager* nos substratos cana xarope de *high maltose* e arroz. Os maiores picos de produção da glutamato oxaloacetato transaminase foram detectados na levedura *ale* em cultivo em caldo de cana, xarope de *high maltose* e milho e na levedura *lager*, nos substratos caldo de cana, arroz e milho. A fosfofrutoquinase teve, para as duas leveduras, maiores atividades em cultivos no substratos arroz. As maiores atividades da isocitrato liase para levedura *ale* foi em cultivo nos substratos caldo de cana e sorgo e para levedura *lager* nos substratos arroz e xarope de *high maltose*. A maior atividade

da diacetil redutase foi no cultivo em substrato sorgo e na levedura *lager*, no cultivo em substrato arroz. Os adjuntos açucarados apresentaram extratos superiores aos dos amiláceos. Entre os cereais não houve diferença significativa, o complexo amilolítico da levedura agiu igualmente para os três adjuntos. Todos os adjuntos testados são capazes de produzir meios adequados para produção de cerveja. Não há destaque na produção de etanol entre as leveduras, estando na faixa ideal para produção de cerveja. O glicerol não apresenta grandes variações, sendo ligeiramente superior na levedura *ale*. O acetato, até o final da fermentação (80% de consumo de açúcares), teve tendência de produzir cervejas mais ácidas, mas com possibilidade de diminuição caso a fermentação evoluísse até o final. Os substratos com diferentes constituições químicas influenciaram o comportamento enzimático nas duas leveduras. A atividade da álcool desidrogenase foi baixa, mas não influenciou a produção de etanol. A piruvato desidrogenase apresentou maiores atividades na levedura de alta fermentação, o que caracteriza uma possível maior disponibilidade de intermediário do ciclo de Krebs. Apesar de baixa, houve diferença nas atividades da isocitrato liase entre as duas leveduras, em substratos diferentes, o que deixa claro que maiores atividades em alguns substratos caracteriza a presença de metabólitos oriundos do desvio do ciclo do glioxalato, que pode, em certas situações, determinar uma via glicolítica mais fraca. A atividade da glutamato oxaloacetato transaminase está fortemente relacionada nesses testes com a formação de precursores (aminoácidos) de substâncias essenciais ao sabor da cerveja, em que a atividade apresenta-se mais baixa nas amostras de menor aceitação, com uso de escala hedônica. A atividade da fosfofrutoquinase apresentou-se baixa nas duas leveduras. Essa atividade baixa não influenciou a produção de substâncias como glicerol e etanol, porém picos de produção nos substratos testados indicam atividade glicolítica mais elevada, com potencial de produção de metabólitos-chaves que poderão ser usados em outras vias. A diacetil redutase, apesar de apresentar baixas atividades para as duas leveduras nos substratos, mostra maior potencialidade de redução do diacetil nos substratos sorgo e arroz.

## ABSTRACT

SANTOS, Iratan Jorge, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2005.  
**Kinetics of fermentation and study of metabolites and intracellular enzymes involved in brewery alcoholic fermentation conducted with high and low fermentation yeast in different wort compositions.** Adviser: Paulo Henrique Alves da Silva. Committee Members: Rogélio Lopes Brandão and Maria Goretti Almeida Oliveira.

The objective of this work was to experimentally evaluate the growth of different types of brewery yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum*) in different types of worts (substrates) containing rice, corn, sorghum, maltose, and sugarcane as malt adjuncts in compositions to verify whether such compositions alter fermentation kinetics and the activity of some enzymes during the fermentative process at a constant temperature. The presence of some extra cellular metabolites (ethanol, acetate and glycerol) and glucose, physical-chemical and microbiological characteristics (pH, attenuation, cell count, °Brix and density) as well as the sensorial quality of the beer produced under the different substrate and yeast conditions previously reported, were also monitored. The contents of primary worts and mixed worts, mixed wort mass, and mosturation yield were determined during substrate preparation. Beer processing was carried out by applying the mass and infusion processes. The wort was inoculated with high and low fermentation yeasts. Fermentation occurred at a

12°C, ending when 80% of the fermentable extract was consumed by the yeasts. Samples of the fermentative juice were collected at 0, 12, 24, 36, 60, 84, 108, 132, 156 and 180 hours, throughout fermentation. The cells were separated by centrifugation, and later ruptured with glass pearls and frozen until analysis. Enzymatic quantification (alcohol dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase, isocitrate lyase, phosphofruktokinase, glutamate oxaloacetate transaminase and diacetyl reductase) and metabolites (ethanol, glycerol and acetate) plus glucose were carried out in colorimetric tests in Cobas Fara equipment. In mosturation, the use of sugar adjuncts (sugarcane and high maltose syrup) presented higher primary wort content, higher mixed wort content, higher wort mass and higher yield, representative of mosturation efficiency and starch hydrolysis rate in sugars. In the physicochemical analyses, pH was significant for the individual variables and non-significant in the interactions. There was a difference between the yeasts in cell count, attenuation, and apparent extract. Glycerol and ethanol formation tended to increase along the process and acetate production was variable, with many oscillations. Glucose intake was confirmed to effectively initiate after 60 hours. Alcohol dehydrogenase activity presented higher production peaks in *ale* yeast cultivations, in relation to *lager* yeast, which did not influence the ethanol levels for the two yeasts. The best pyruvate dehydrogenase activities in *ale* yeast cultivation were found in the substrates maltose, sorghum and sugarcane and for *lager* yeast in the substrates sugarcane, high maltose syrup and rice. The highest glutamate oxaloacetate transaminase production peaks were detected in *ale* yeast in sugarcane juice, *high* maltose syrup and corn and in *lager* yeast in the substrates sugarcane juice, rice, and corn. Phosphofruktokinase presented greater activities in rice substrate cultivation for both yeasts. The highest isocitrate lyase activities for *ale* yeast were in the substrates sugarcane juice and sorghum and for the *lager* yeast, in the substrates rice and *high* maltose syrup. The greatest diacetyl reductase activity was in sorghum substrate cultivation juice and in *lager* yeast, in the rice substrate. The sugar substrates presented superior extracts compared to the amylaceous substrates. No significant difference was found among the grains, with yeast

amylolytic complex acting equally for the three adjuncts. All adjuncts tested are capable of producing adequate media for beer production. Ethanol production was not outstanding among the yeasts, being within the ideal range for beer production. Glycerol does not present great variations, being slightly superior in the *ale* yeast. Until the end of fermentation (80% of sugar consumption), acetate tended to produce more acid beer but with the likelihood of decreased acidity if fermentation evolved until the end. The substrates with different chemical constitutions influenced the enzymatic behavior in both yeasts. Alcohol dehydrogenase activity was low but it did not influence ethanol production. Piruvate dehydrogenase presented greater activities in high fermentation yeast, characterizing a possible availability of Krebs cycle intermediates. Although low, there was a difference in the isocitrate lyase activities between the two yeasts, in different substrates, clearly showing that greater activities in some substrates characterized the presence of metabolites originated from the glyoxalate cycle deviation, which can, in some situations, determine a weaker glycolytic pathway. Glutamate oxaloacetate transaminase activity is strongly related in these tests to the formation of precursors (amino acids) of substances essential to beer flavor, in which the activity is lower in less accepted samples, with the use of the hedonic scale. Phosphofruitoquinase activity was low in the two yeasts. This low activity did not influence the production of substances such as glycerol and ethanol, but production peaks in the substrates tested indicate a higher glycolytic activity, with potential to produce key-metabolites that can be used in other pathways. Diacetyl reductase, although presenting low activities for the two yeasts in the substrates, shows greater potentiality of reducing diacetyl in the substrates sorghum and rice.

## 1. INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida alcoólica produzida a partir de malte de cevada e que tem ainda como característica fundamental a presença de frações de lúpulo, responsável pelo amargor da bebida, sendo produzida pela ação de leveduras do gênero *Saccharomyces*, que catalisam o processo fermentativo. A cevada confere características peculiares de sabor à cerveja, porém sua substituição parcial no processo cervejeiro vem sendo pesquisada como forma de minimizar os custos de produção, mas de modo que as características sensoriais do produto não sejam comprometidas. É comum a substituição da cevada por milho, arroz, xarope de *high* maltose e sorgo, visando obter um maior rendimento na fonte de amido e promover a produção de uma cerveja com características peculiares às exigidas pelos consumidores.

Diversas características de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido pesquisadas, no sentido de otimizar o desempenho do microrganismo com relação à produtividade e eficiência de fermentação, tolerância ao etanol e à temperatura, à resistência a altas concentrações de açúcares; à habilidade em flocular e produzir ou não certos componentes do aroma e sabor das bebidas, e à propriedade de produzir metabólitos de inibição de contaminantes. Em certas situações é importante que haja algum tipo de marcador ou indicador que permita o acompanhamento da atividade do agente de fermentação, para constatar o

estado fisiológico do microrganismo e estimar em que intensidade ele está de fato conduzindo o processo fermentativo.

As fermentações alcoólicas apresentam variações em seus rendimentos, velocidades e qualidade em função de uma série de variáveis, como: tipo de substrato, condições intrínsecas e extrínsecas do meio de fermentação e estado fisiológico do microrganismo. Uma das alternativas para avaliar a queda de rendimento no sistema é através da medida da atividade das enzimas que fazem parte do metabolismo das células.

As enzimas e os metabólitos produzidos no processo fermentativo diferem entre as leveduras apenas na sua regulação, o que evidencia a conservação de uma série de reações no processo cervejeiro, que podem conferir determinado sabor ao produto final.

O objetivo deste trabalho foi verificar se o crescimento de diferentes tipos de leveduras cervejeiras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*), em diferentes tipos de substratos (mosto) contendo arroz, milho, sorgo, xarope de *high* maltose e caldo de cana como adjunto do malte na sua composição, altera a cinética de fermentação e a atividade de algumas enzimas durante o processo fermentativo, em uma temperatura constante. Estas fontes alternativas de matéria-prima foram selecionadas em função do que se pratica atualmente em termos experimentais para produção de cervejas, devendo ser ressaltado que a composição em açúcares em cada situação é variável, repercutindo no sistema de transporte para o interior das células, bem como em sinais de indução ou repressão de enzimas. Foi também objetivo desta pesquisa monitorar a presença de alguns metabólitos extracelulares (etanol, acetato e glicerol) e glicose, as características físico-químicas (pH, atenuação, contagem de células, °Brix e densidade), assim como a qualidade sensorial das cervejas produzidas nas diferentes condições de substratos e leveduras relatadas anteriormente. Pretendeu-se, ainda, monitorar a parte tecnológica de produção da cerveja, visando verificar o perfil do teor de extrato do mosto primário e mosto misto, a massa de extrato do mosto misto e o rendimento da mosturação, com a utilização de diferentes adjuntos do malte.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Tecnologia de produção de cerveja**

Os grãos de cevada, para serem considerados dentro da qualidade industrial para cerveja, devem apresentar teor de umidade de 13% b.u., pureza varietal de 95%, 12% de proteína máxima, poder germinativo de 95% e no máximo 2% de sementes de outras espécies de cereais, como aveia, trigo e centeio (AMBEV, 2003). Desclassifica-se para conversão em malte todo grão que apresentar estado de conservação alterado, aspecto de contaminação por microrganismo, fermentação, odor desagradável ou estranho, indícios de tratamento por produtos químicos ou biológicos que alterem sua condição natural ou qualquer outra causa que venha afetar a sua qualidade (VICENTE et al., 1996; PANCHUK et al., 1998; AMBEV, 2003; CERVESIA, 2003).

O termo malte define a matéria-prima resultante da germinação, sob condições controladas, de qualquer cereal. Quando não há indicação do produto, subentende-se que é feito de cevada (BEAL e MOTTRAM, 1992).

De acordo com CERVESIA (2003), são produzidos dois tipos comerciais de malte: o cervejeiro e o para destilarias.

Para DANIELS (1996), o malte contribui com o sabor e a estruturação da cerveja. A produção do malte depende diretamente das propriedades físicas do grão maduro e das enzimas sintetizadas durante a germinação.

O processo de malteação consiste das operações de maceração, germinação e secagem. Os grãos de cevada são macerados em água até teores de umidade de 43 a 46% b.u., colocados para germinar e, em seguida, secos até 4% b.u., a uma temperatura que varia entre 70 e 100 °C. Esta faixa de temperatura reduz a atividade de enzimas presentes no malte, por causar desnaturação (TSCHOPE, 2001).

O malte é a principal matéria-prima utilizada na produção de cerveja, provendo enzimas (diastases, proteases etc.) e substrato adequado para produção de extrato solúvel ou de mosto (TSCHOPE, 2001).

Os adjuntos são fontes de açúcares utilizados para substituir parte do malte. Existem várias maneiras de classificar os adjuntos, devendo ser ressaltado que uma delas leva em consideração o tipo de carboidrato que predomina em sua composição. Os adjuntos são classificados em dois grandes grupos: os ricos em amido ou amiláceos e os ricos em açúcares ou açucarados (KUNZE, 1996).

Encontrados na forma de xaropes com uso mais generalizado, os adjuntos açucarados e açúcares cristalizados são fontes de extrato facilmente solúvel, apresentando fermentabilidade variável, o que depende de sua origem, entrando no processo de fabricação durante a fervura do mosto. Por essa característica tecnológica, torna-se possível aumentar a quantidade de mosto produzido em uma sala de brassagem (fabricação), sem a necessidade de sua ampliação ou reforma (VENTURINI FILHO, 1993).

A fermentabilidade desses açúcares é de 100%, pois tanto a glicose como a sacarose são facilmente assimiladas pela levedura (VENTURINI FILHO, 1993).

Dentre os adjuntos usados como fonte de amido que podem substituir parte do malte, a maioria origina-se dos cereais, sendo o arroz (*Oryza sativa*) e o milho (*Zea mays*) os mais utilizados pelas fábricas de cerveja do Brasil e do exterior. Contudo, alguns países também utilizam a cevada (*Hordeum vulgare*), o

trigo (*Triticum aestivum*), o centeio (*Secale cereale*), a aveia (*Avena sativa*) e o sorgo (*Sorghum vulgare*), embora com uso limitado. Outra forma de adjunto amiláceo é a matéria feculenta de certas raízes e tubérculos, como mandioca (*Manihot esculenta*) e batata (*Solanum tuberosum*) (VARNAM e SUTHERLAND, 1994).

Os amidos dos cereais apresentam temperaturas de gelatinização mais elevadas que os das féculas e dos tubérculos, e os grânulos de amido de menor tamanho oferecem maior resistência à gomificação. Sendo assim, a temperatura de gomificação depende da espécie botânica e do tamanho dos grânulos de amido para mesma espécie (REINOLD, 1997).

Para serem utilizados como complemento, são necessários que os adjuntos sejam liquefeitos (100 – 121°C), se a temperatura de gelatinização for mais elevada que a temperatura de mosturação (40 – 75°C). Quando a temperatura de gelatinização do adjunto encontra-se na faixa de mosturação, ele pode ser misturado diretamente ao malte. Normalmente é adicionado 10% de malte em relação ao peso total do adjunto, ainda na fase de liquefação, para diminuir a viscosidade da pasta, e, em seguida, acrescenta-se essa mistura ao mosto. Neste caso, são extraídos de 80 a 90% dos sólidos totais do adjunto (AMBEV, 2003).

VENTURINI FILHO (1993), trabalhando com adjuntos amiláceos, chegou aos resultados de 16 a 18 °B para teor de mosto primário, 9 a 9,5 para teor de mosto misto e rendimento da mosturação na faixa de 73 a 78 %.

A presença de adjunto na formulação resulta em cerveja de cor mais clara, mais leve, sabor menos saciador e com maior brilho. A cerveja também apresenta maior estabilidade física, fazendo com que suporte melhor o resfriamento e apresente maior vida de prateleira (MADRID, 1996).

O lúpulo utilizado na fabricação da cerveja é composto por flores de planta feminina do mesmo nome (LEWIS e YOUNG, 1995; SUZUKI et al., 2002). É extraído de uma planta que cresce em regiões de clima temperado do Hemisfério norte.

Os componentes do lúpulo são óleos essenciais e resinas encontrados nas glândulas de lupulina, presente nas flores femininas (IGYOR et al., 2001), e são

os responsáveis por conferir o gosto amargo e aroma característico de cervejas; os outros componentes como taninos, aminoácidos, açúcares e proteínas entram em solução no processo. O lúpulo contribui para estabilidade da bebida e melhora a capacidade de reter a espuma da cerveja, além de fornecer propriedades antissépticas (SAKAMOTO et al., 2001, 2002).

De acordo com IGYOR et al. (2001), as resinas presentes no lúpulo fresco são constituídas principalmente pelos ácidos alfa ou humulonas e pelos ácidos beta ou lupulonas. Os ácidos alfa são a fonte mais importante do amargor, enquanto os ácidos beta pouco interferem no sabor da cerveja. Durante a fervura do mosto os ácidos alfa sofrem isomerização para a forma de ácido iso-alfa (iso-humulonas), que são mais amargos e mais solúveis que os primeiros (IGYOR et al., 2001).

Para VENTURINI FILHO (1993), a qualidade da água é um dos principais fatores na determinação da qualidade da cerveja. Em relação ao aspecto quantitativo, ela é a principal matéria-prima cervejeira, podendo atingir até 95% no produto final.

A água para fabricação da cerveja deve, além de satisfazer os requisitos gerais de água potável, assegurar o devido pH da massa, a devida extração do lúpulo, boa coagulação na fervura e fermentação e o devido desenvolvimento de cor e sabor dentro da cerveja pronta. Se a água for alcalina, poderá dissolver grandes quantidades de matérias indesejáveis das cascas e do malte. A reação em pH ácido é necessária para obter a máxima atividade das amilases e proteases. Com o pH elevado, a atividade enzimática diminui, as amilases atuam menos e sobram mais dextrinas e ocorrem menos proteólise e maior extração de cor e substâncias amargas (PENFIELD e CAMPBELL, 1990; DANIELS, 1996; NOONAN, 1996; VICENTE et al., 1996; TSCHOPE, 2001).

As etapas tecnológicas de produção de cerveja compreendem: mosturação, filtração, cocção, pré-resfriamento e sedimentação, resfriamento e aeração, fermentação, maturação, filtração, envase e pasteurização (VENTURINI FILHO, 1993).

A mosturação compreende a mistura do malte moído com água e a adição de seu complemento. O objetivo é promover a liquefação e a posterior hidrólise do amido a açúcares fermentáveis e não-fermentáveis através da atuação das diastases. O pH e a temperatura interagem para controlar a degradação do amido e a solubilização das proteínas (MADRID, 1996; MULLER, 2000; LEE, 1996; ADEGAS, 2000).

O amido é um carboidrato composto por dois polímeros (amilose e amilopectina), presente na maioria dos vegetais, cuja função é armazenar energia sintetizada pela fotossíntese (JANE, 1998; VISSER, 1998; WANG, 1998).

De acordo com MYLLARINEN (1998), na cevada, os grânulos são constituídos de 90% de amido e a relação amilose: amilopectina é de 25:75.

A amilose é um polissacarídeo composto por unidades de D-glicose, unidas entre si por ligações  $\alpha(1-4)$  em cadeias longas e essencialmente não-ramificadas. Na forma cristalina, a molécula de amilose tem uma conformação helicoidal e interior hidrofóbico. Existem seis unidades de glicose por volta de hélice, e a estabilização ocorre pela interação através de pontes de hidrogênio entre as hidroxilas dos carbonos 2 ou 3 e a do carbono 6. Os amidos de cereais apresentam 30% de amilose (CIACCO, 1998).

A amilopectina é um polímero formado por cadeias curtas ligadas entre si, de modo a formar uma estrutura ramificada. Possui peso molecular alto e é parcialmente solúvel em água. As ligações glicosídicas que unem os sucessivos resíduos de glicose da cadeia são do tipo  $\alpha(1-4)$ , entretanto nos pontos de ramificação da amilopectina essas ligações são do tipo  $\alpha(1-6)$  (CIACCO, 1998;).

As enzimas são os agentes mais importantes nas reações de hidrólise. Aquelas usadas no processo de hidrólise do amido são também chamadas de diastases, ou enzimas amilolíticas, das quais a alfa e a beta-amilase são as mais importantes.

A alfa-amilase (enzima dextrinizante) pode atacar as cadeias dos componentes do amido em qualquer ponto no interior da cadeia linear. Isto equivale dizer que a alfa-amilase é uma endoenzima (que hidrolisa ligações

glicosídicas  $\alpha(1-4)$ ). As ligações  $\alpha(1-6)$  não são quebradas pela alfa-amilase (KUNZE, 1996;).

A beta-amilase é uma exoenzima e hidrolisa ligações  $\alpha(1-4)$  a partir da extremidade não-redutora, produzindo maltose. A ação repetida dessa enzima na amilose leva à parcial destruição do polímero. Entretanto, esta enzima é bloqueada por ramificações ou outras irregularidades na cadeia. Assim, a amilopectina é parcialmente degradada pela beta-amilase (40%). Sua ação no amido resulta no rápido aumento do poder redutor (CIACCO, 1998).

Após a hidrólise na mosturação, há a clarificação do mosto com a sedimentação natural do bagaço, uma massa resultante da aglutinação da casca com os resíduos do processo. A casca do malte depositada no fundo da tina é usada como material filtrante na primeira etapa da filtração, constituindo o mosto. Uma vez drenado, a camada de cascas é borrifada com água a 75°C por diversas vezes, de modo que quando o resíduo se apresenta com menos de 1% de extratos solúveis é considerado como totalmente esgotado. A extração pode ser feita em uma só operação ou ser subdividida em duas ou até três etapas em função da quantidade de material a ser extraído (AQUARONE et al., 1983; REINOLD, 1997).

O processo de cocção leva em torno de 60 a 90 minutos, a uma temperatura de 100°C. Com a adição de lúpulo ocorre a estabilização da composição, o que inativa as amilases e proteases por causar precipitação das proteínas, que se precipitam em flocos denominados *trubs*. Outros efeitos da fervura do mosto são a aromatização (extração das substâncias do lúpulo que irão fornecer o aroma e gosto amargo característicos à cerveja), a concentração (evaporação da água do mosto até obter o peso desejado) e a esterilização (esterilização com eliminação de microrganismo), além da caramelização de alguns açúcares. Também ocorrem diversas reações químicas entre os componentes do mosto, como a precipitação do tanino do lúpulo por reação com as proteínas (AQUARONE et al., 1983; NOONAN, 1996).

Antes de ser resfriado até a temperatura de fermentação, o mosto proveniente da sala de cozimento a 100 °C deve sofrer um pré-resfriamento até

aproximadamente 80°C e deve-se esperar o tempo necessário para sedimentação do *trub* (BRAHMA, 1998). *Trub* é uma massa uniforme, composta principalmente de proteínas coaguladas e taninos (REINOLD, 1997).

Após a fase de sedimentação, o mosto é resfriado até a temperatura de fermentação. Esta temperatura é variável de acordo com o tipo de fermento utilizado e com o número de vezes que este entrou no processo. O mosto deve ser previamente oxigenado (TSCHOPE, 2001; AMBEV, 2003; CERVESIA, 2003).

Na fermentação, o objetivo primário que induz todos os microrganismos a metabolizarem os carboidratos é, geralmente, a máxima produção de energia no catabolismo oxidativo, a formação de estruturas celulares e a estocagem de reservas para utilização posterior (ALVES, 1994).

Por serem microrganismos facultativos, as leveduras podem respirar e fermentar o substrato, e a contribuição de cada um destes eventos depende das condições do meio. Nota-se outra ambigüidade no que tange ao metabolismo biossintético: em vez de um carboidrato de reserva, como nos demais organismos, as leveduras possuem dois, o glicogênio e a trealose. A oxidação da glicose pelas leveduras se desenvolve em uma seqüência de reações que incluem transferência de fosfato, oxidação-redução, descarboxilação e isomerização, além de outras (AQUARONE et al., 1983). É um processo de oxirredução intramolecular, anaeróbico, exotérmico, em que 100 g de glicose podem gerar teoricamente 49,5 g de álcool, 47 g de gás carbônico, 3 g de glicerol, além de pequenas quantidades de ácido succínico, álcoois amílico e isoamílico, e vários outros produtos secundários (SIMPSON, 1996).

Em termos energéticos, a respiração é muito mais favorável que a fermentação. Assim, sempre que possível, a levedura utiliza o açúcar em aerobiose, oxidando-o completamente em nível mitocondrial. Este processo,, porém, resulta na queda da taxa de consumo de açúcar, se comparada à da fermentação. É o chamado efeito Pasteur, que em *Saccharomyces cerevisiae* é ausente ou muito pequeno em sua magnitude, se comparado com outras espécies como a *Candida utilis* (FELDMANN, 2001).

Entretanto, na presença de glicose em concentrações a partir de 2g/L ocorre repressão catabólica das enzimas respiratórias, o que torna a fermentação a principal via de degradação do açúcar, mesmo em condições aeróbicas. A repressão chega a culminar com a perda total das mitocôndrias. Essa repressão é também denominada efeito *crabtree* (EHRHARDT e SASSEN, 1995).

Segundo CERVESIA (2003), a maturação é uma fermentação secundária em que a cerveja, logo depois que a fermentação se completa, deve ser maturada em temperaturas de 0°C ou de, no máximo, 0,5 – 3°C por períodos variáveis. Durante esse período uma lenta fermentação ocorre na cerveja, proporcionando a clarificação por precipitação de leveduras e proteínas, assim como de sólidos solúveis, proporcionando alterações em seu sistema coloidal. Além destas, ocorrem alterações químicas que auxiliam a clarificação e melhoram o aroma e o sabor. Quando a maturação começa, a maior parte dos açúcares já foi metabolizada a álcool etílico, gás carbônico, glicerol, ácido acético e álcoois superiores. Nessa fase, se necessário, faz-se a adição de antioxidante para prevenir a ação de oxigênio residual. Em geral empregam-se sulfitos ou ácido ascórbico.

Na maturação ocorre sempre formação de diacetil como subproduto da fermentação principal. Sua formação é ligada diretamente ao metabolismo dos aminoácidos (valina e leucina), que é desagradável em cerveja *lager* (LINKO et al., 1998).

Atualmente, a clarificação da cerveja e a estabilização (microbiológica e coloidal) são alcançadas por uma combinação de centrifugação, frio-maturação, filtração com terra diatomácea e pasteurização. A clarificação da cerveja serve como objetivo para se obter estabilidade, que pode ser dividida em três aspectos: microbiológico, coloidal e estabilidade de sabor. A estabilidade é alcançada microbiologicamente pela remoção de células de leveduras ativas. A estabilidade coloidal, por sua vez, é obtida pela remoção de partículas grandes, especialmente flocos formados pela coagulação de polifenóis e proteínas que aparecem como turbidez em cervejas clarificadas a baixa temperatura. Já a estabilidade do sabor é atingida através da minimização do oxigênio dissolvido na cerveja clarificada (TAYLOR et al., 2001).

Após ser envasada em latas ou garrafas, a cerveja é submetida ao tratamento térmico (pasteurização). A pasteurização da cerveja envasada é realizada em túneis, onde a temperatura é elevada a 60°C e mantida até garantir a morte dos microrganismos deterioradores. Em seguida, ela sofre um drástico resfriamento (REINOLD, 1997).

## 2.2. Levedura

A levedura é um microrganismo unicelular responsável, na cervejaria, pela fermentação alcoólica. A *saccharomyces spp* pertence à família *Saccharomycetaceae* e se distingue das restantes por suas características morfológicas e fisiológicas (AQUARONE, 1993; EHRHARTD & SASSEN, 1995).

As leveduras de baixa fermentação são espécies de *Saccharomyces uvarum* (*S. carlsbergensis*), que produzem a cerveja americana e a alemã Pilsener do tipo *lager*. Essas cervejas são processadas pela fermentação profunda (baixa), na qual as leveduras se depositam, após a fermentação tumultuosa, no fundo do tanque. Os agentes biológicos de baixa fermentação são considerados como de alta atividade fermentativa e de menor capacidade respiratória que as leveduras de alta fermentação (*S. cerevisiae*). A levedura de baixa fermentação desenvolve-se em temperaturas de 5 – 15 °C (REINOLD, 1997).

*S. cerevisiae* é considerada levedura de alta fermentação, pois emerge para superfície após a fermentação tumultuosa (ou principal). Essas espécies de leveduras produzem as cervejas inglesas Porter ou Stout do tipo *ale*, que geralmente são produzidas por fermentação superficial (alta). Esse microrganismo se desenvolve em temperaturas entre 12 e 21°C (EHRHARTD & SASSEN, 1995; REINOLD, 1997).

Segundo HORNSEY (2003), a superfície celular das leveduras de alta fermentação (*ale*) está coberta por pequenas protuberâncias microfibrilares, que lhes conferem uma aspereza que permite que as células fiquem em suspensão durante a fermentação. A parte da superfície áspera da parede celular possui

carga negativa e hidrofobicidade, características de importância para o processo cervejeiro. A carga negativa é atribuída às cadeias de fosfato localizadas na parede externa de manoproteínas; essa carga é importante durante a finalização da cerveja para o engarrafamento, quando os pontos positivamente carregados das moléculas de colágeno (material usado para a clarificação) atraem células precipitadas de leveduras e provocam sedimentação.

A espécie de *Saccharomyces uvarum* se distingue essencialmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae* pela capacidade de fermentação da melibiose e rafinose (SILVA, 1989). *Saccharomyces uvarum* tem a capacidade de hidrolisar a melibiose porque contém a enzima melibiase ( $\alpha$ -galactosidase) capaz de hidrolisar a ligação  $\alpha$  1-6 entre as unidades dos monossacarídeos, liberando a glicose e galactose. Possui também capacidade de hidrolisar a molécula de rafinose porque possui, além da melibiose, a invertase. A melibiase está ausente em *Saccharomyces cerevisiae*, por isto essa espécie não metaboliza a melibiose e usa um terço da molécula de rafinose.

Durante a utilização da rafinose e melibiose a *Saccharomyces uvarum* pode fermentar glicose, galactose, sacarose e maltose, se presentes no meio. Estas culturas podem ou não fermentar trealose ou  $\alpha$  - metil-D-glucoside, e não fermentam a celobiose, a lactose e o amido solúvel (SILVA, 1989).

Algumas diferenças existentes entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*), além do uso da melibiose e da rafinose, são o poder respiratório, o grau de esporulação, a capacidade de fermentar gliceraldeído e a intensidade de produção de H<sub>2</sub>S (SILVA, 1989).

Os açúcares fermentáveis por *Saccharomyces cerevisiae* na cervejaria consistem em glicose, frutose, maltose, maltotriose e sacarose (SILVA, 1989).

### **2.3. Metabólitos**

A seqüência de captação dos açúcares do mosto pela levedura segue um padrão definido, que, generalizando, depende do tamanho da molécula, da concentração de açúcares presentes e da disponibilidade do sistema enzimático

necessário para o metabolismo (VERDUYN, 1991; PATARO et al., 1998).

A sacarose, dissacarídeo, formado por uma molécula de glicose e uma de frutose, é hidrolisada extracelularmente por invertases específicas, sendo os monossacarídeos formados captados pelos transportadores de hexoses. Uma vez transportadas para o interior das células, a glicose e a frutose são degradadas pela via glicolítica até piruvato, que pode ser totalmente convertido a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  pelo ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa ou, então, ser degradado até etanol e  $\text{CO}_2$  pelo processo denominado de fermentação alcoólica (FIECHTER, 1992; ZASTROW e STAMBUK, 2000; HORNSEY, 2003).

Hommes, citado por ALVES (1994), observou que a glicose induz um aumento no nível das enzimas glicolíticas, e Chapman, citado pelos mesmos autores encontrou aumentadas as atividades das enzimas descarboxilases pirúvica e desidrogenase alcoólica induzidas pela glicose, o que denota o favorecimento da fermentação até o principal produto, o etanol.

A quantidade máxima de etanol que pode ser produzida em uma fermentação varia de acordo com a levedura usada, o que se deve à maior ou menor resistência ao etanol pelas leveduras. Geralmente, as linhagens utilizadas na cervejaria têm somente tolerância moderada ao etanol, suportando concentrações de 7 a 13 % (v/v) (WATIER et al., 1996).

Na membrana lipoprotéica está o sítio de ação do etanol, onde se aloja no interior hidrofóbico, acarretando o enrijecimento e, conseqüentemente, afetando vários sistemas de transporte. Diminui também a seletividade da membrana plasmática, permitindo o efluxo de constituintes celulares, bem como o influxo passivo de prótons, o que diminui o potencial de membrana e, portanto, afeta todos os sistemas que necessitam de força protomotiva. Este processo acaba por induzir deficiências nutricionais que aumentam a toxidez do etanol, somando-se o fato de que a levedura em anaerobiose tem a integridade de suas membranas comprometidas por deficiências na síntese de ácidos graxos insaturados e ergosterol (ALVES, 1994; KOTIAHO et al., 1995).

Para WATIER et al. (1996), as concentrações de etanol acima de 8% e valores de pH abaixo de 4 são desfavoráveis ao crescimento de alguns microrganismos.

O etanol é um dos metabólitos excretado em maior quantidade pela levedura durante a fermentação e passível de se tornar um substrato em aerobiose. Ele se mostra tóxico à levedura, ocasionando queda na viabilidade (KOTIAHO et al., 1995). Segundo JEFFRIES (2005), a produção eficiente de etanol por microrganismo está diretamente relacionada com sua carga genética.

Quando gerado endogenamente, o etanol é mais tóxico do que o adicionado ao meio, o que seria de extrema importância para a inibição/desnaturação das enzimas glicolíticas, caso ele se acumulasse na célula. Porém o etanol não se acumula intracelularmente, a não ser nos estágios iniciais da fermentação (PERPÈTE e COLLIN, 2000).

Outros fatores também contribuem para o aumento da toxidez do etanol, principalmente a temperatura e a síntese de subprodutos tóxicos, como o acetaldeído, o glicerol, os ácidos fórmico, acético e láctico (particularmente, o ácido acético); e também os ácidos graxos (PERPÈTE e COLLIN, 2000).

Para GUIDO et al. (2004), os níveis mais elevados de etanol são obtidos após 1,5 dia de fermentação e são indicativos de uma atividade mais elevada do fermento, que em alguns casos pode impedir o crescimento e a multiplicação da levedura.

Em cervejas testadas por BVOCHORA e ZVAUYA (2001), utilizando como adjuntos sorgo e milho, os níveis de etanol chegaram a 4,74 % (v/v) após quatro a sete dias de fermentação.

Para o metabolismo do glicerol em microrganismo eucariotas, duas rotas metabólicas principais foram identificadas. Na primeira, presente nas leveduras *S. Cerevisiae* e *Candida utilis*, o glicerol é fosforilado e, subseqüentemente, desidrogenado (CASTRO, 1991).

Na segunda rota metabólica, encontrada em outras leveduras, o glicerol é primeiramente oxidado, por uma desidrogenase NADP<sup>+</sup> ou NAD<sup>+</sup>-dependente, à dihidroxiacetona, que é, em seguida, fosforilada. A síntese do

glicerol pela via glicolítica ocorre com a transformação da dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato (G3P) catalisada pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD). A defosforilação do glicerol-3-fosfato ocorre via glicerol-3-fosfatase (GPP) (CASTRO, 1991).

Duas isoenzimas da GPD codificadas pelos genes GPD1 E GPD2 foram caracterizadas em *Saccharomyces cerevisiae* (ALBERTYN et al., 1994; WANG et al., 1994; ANSELL et al., 1997).

O estresse osmótico resultante da grande produção do glicerol é controlado principalmente pela indução de GPD1 (NEVOIGT e STAHL, 1997; PRIOR e HOHMANN, 1997). Um deslocamento do fluxo do carbono para o glicerol à custa da formação do etanol na fermentação foi conseguido, simplesmente aumentando o nível de GPD (REMIZE et al., 1999; DEQUIN, 2001; NEVOIGT et al., 2002).

A produção de glicerol durante o catabolismo dos açúcares exerce um importante papel no mecanismo biológico de balanço redox, especialmente durante o crescimento aneróbico (BAKKER et al., 2001; VICENTE, 2003). Pelo fato de a formação do etanol ser redox-neutra, o NADH formado na glicólise pode ser convertido a  $\text{NAD}^+$ , via formação de glicerol e por NADH desidrogenases mitocondriais. Em condições anaeróbicas, a oxidação do NADH ocorre somente via formação de glicerol. Esta formação é importante para a manutenção do balanço redox citoplasmático, por estar acoplado à reoxidação do NADH formado (BLOMBERG e ADLER, 1992; BAKKER et al., 2001).

Na falta de outros compostos para serem utilizados como fonte de carbono, o glicerol pode ser utilizado. Dependendo da enzima envolvida, a degradação do glicerol pode conduzir à produção dos compostos diacetil, acetoína ou ácido acético, o que pode alterar o sabor da cerveja (PINTO et al., 2004).

O glicerol é um constituinte não-volátil detectado em concentrações de 1,5 a 3,4 g/L na cerveja (SILVA, 1989; OMORI et al., 1996).

O ácido acético é o principal ácido volátil produzido durante a fermentação, embora sua presença em alguns casos é devido à atividade bacteriana (GUTIERREZ et al., 1991).

Em cervejas de variadas origens, o ácido acético raramente excede a 0,2 g/L, porém nas cervejas ácidas alemãs pode atingir 2,34 g/L. Os teores finais de acetato são variáveis e dependem muito das condições ambientais e do tipo de levedura utilizada (ALVES, 1994).

O acetato é produzido através da catálise da aldeído desidrogenase, por meio de uma oxidação denominada terceira forma de fermentação de Neuberg (ALVES, 1994).

A formação de acetato na célula durante a fermentação apresenta-se inversamente correlacionada com a de piruvato, o que indica que esse se converta em acetato. O acetato é excretado no início da fermentação quando os teores de piruvato são baixos, cai quando se atinge a máxima excreção de piruvato e volta a aumentar no final da fermentação, quando o piruvato é reabsorvido. O teor de acetato depende da intensidade do crescimento, sendo metabolizado exclusivamente pelas leveduras que o reabsorvem no final da fermentação. Ao contrário do piruvato, o teor de acetato aumenta quando há inibição do crescimento (BASSO, 1991).

Quanto ao glicerol, fica difícil estabelecer uma relação entre os teores de acetato e glicerol, porque a produção de glicerol encontra-se conectada com o crescimento. Além disto, o ácido presente no meio pode ser devido à atividade bacteriana (ALVES, 1994).

O ácido acético, à semelhança de outros ácidos orgânicos fracos, perturba a homeostase de células microbianas, por penetrar na forma não-dissociada e dissociar-se no citoplasma, promovendo a redução do pH com o acúmulo do ânion acetato. A acidificação intracelular reduz o pH, afetando a força protomotriz para os sistemas de transporte, e é uma das causas, juntamente com a ação do ânion acetato sobre as enzimas glicolíticas, da ação inibitória do ácido acético sobre a fermentação (PAMPULHA e LOUREIRO-DIAS, 1990).

A presença de ácido acético, seja oriundo da levedura, das bactérias contaminantes, ou adicionado ao meio, torna-se indesejada, mesmo que um aumento na produção de etanol, com a redução do crescimento, seja verificado (GUTIERREZ et al., 1991).

O CO<sub>2</sub> é um produto da fermentação e está presente na cerveja em uma concentração de 3,5 a 4,5 g/L. O etanol está presente em uma concentração de 2,5 a 5,0 % v/v (SILVA, 1989).

Os álcoois superiores têm mais de dois átomos de carbono, formados durante o processo oxidativo. São provenientes, em grande parte, das transformações dos aminoácidos durante o processo de fermentação, tendo influência no aroma e sabor característicos da cerveja, destacando-se álcoois amílico, butílico e propílico e seus respectivos isômeros (ARAUJO, 2000).

Os ésteres são produzidos intracelularmente, em grande parte como resultado da reação de condensação do éster de CoA de ácidos graxos com álcoois durante o processo oxidativo. Os mais importantes presentes em cervejas são acetato de etila e acetato de isoamila. Mudanças nas concentrações desses ésteres podem ter efeitos desfavoráveis no sabor da bebida (HAMMOND et al., 1993).

O diacetil é um composto formado pela descarboxilação oxidativa do acetolactato, um produto do metabolismo anabólico do aminoácido (valina e leucina). Durante a fermentação os níveis elevados de acetolactato na cerveja indicam o desequilíbrio na regulação da produção de ácidos acetohidroxi, e seu uso na produção final de aminoácidos na levedura conduz à acumulação e, mais tarde, à excreção para cerveja. No final da fermentação a levedura reabsorve o acetolactato da cerveja (HAMMOND et al., 1993; ROSE & HARRISON, 1993; BRAVO et al., 2001; BOULTON et al., 2001). A concentração final de diacetil na cerveja depende de três fatores: síntese e excreção do  $\alpha$ -acetolactato; conversão deste precursor no diacetil; e remoção do diacetil pela levedura. A remoção do diacetil da cerveja pode ser efetuada pela sua conversão a compostos com sabor mais leves: a acetoína (sob a ação da diacetil redutase, enzima que catalisa essa reação) e o 2,3-butanediol (CASTILLO, 1993).

O diacetil é um composto de cheiro forte e aroma butírico; e concentrações acima de  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  podem interferir no sabor da cerveja, por isto o seu nível deve ser controlado durante a fermentação e maturação (BEERS E MOLL, 1991; HAMMOND et al., 1993; ROSE & HARRISON, 1993; BOULTON et al., 2001; BRAVO et al., 2001).

Os aldeídos presentes na cerveja normalmente encontram-se em baixas concentrações. São compostos muito voláteis, de odor penetrante, produzidos durante a fermentação e que afetam o aroma da cerveja; são ainda compostos intermediários da formação dos álcoois, sendo formados pela descarboxilação de oxi-ácidos, ou então pela oxidação dos respectivos álcoois. Os aldeídos se encontram em concentrações de  $4 - 15 \text{ mg.L}^{-1}$ . A formação de todos os aldeídos segue o mesmo princípio, sendo sintetizados por descarboxilação enzimática do  $\alpha$ -cetoácido correspondente pela enzima descarboxilase específica (GARCIA et al., 1994; HORNSEY, 2003).

As cetonas identificadas na cerveja são em torno de 20. São produtos de menor proporção da fermentação, sendo a maior parte originada de produtos da degradação do lúpulo (HARDWICK, 1995).

Os polifenóis são encontrados na cerveja e estão associados à turbidez não-biológica ou turbidez fria. Os polifenóis (taninos) presentes no lúpulo são diferentes dos taninos presentes no malte, e podem ser diferenciados na cerveja. Os principais polifenóis encontrados no lúpulo são a cetequina, o kaempferol e a quercitina, que são coletivamente denominados polifenóis ou taninos. Os flavonóides constituem um grupo de polifenóis presentes na cerveja que são mais facilmente oxidados e que possuem envolvimento na instabilidade coloidal da cerveja. Segundo ARAÚJO (2000), os polifenóis podem ser responsáveis pelo escurecimento da cerveja, pois podem ser oxidados a ortoquinonas, e estas podem reagir com peptídeos e aminoácidos, dando origem a compostos coloridos.

## 2.4. Enzimas

Um dos produtos do metabolismo da *S.cerevisiae* é a enzima álcool desidrogenase, organizadora do complexo álcool proteína. Pertencente às oxirredutase, a álcool desidrogenase tem aproximadamente 150.000 estruturas quaternárias estabilizadas por íons zinco, conseqüentemente ela pertence ao grupo das metalenzimas. É dependente da coenzima adenina nicotinamida dinucleotídeo, que é envolvida em oxirreduções ou em reduções (LESKOVAC, 2002).

A enzima álcool desidrogenase é usada também para produzir aldeído pela oxidação preliminar dos álcoois; sua aplicação mais importante é na produção de etanol em bebidas (ORLICH et al., 2000; DICKINSON e DACK, 2001).

A produção da álcool desidrogenase está diretamente conectada à concentração de oxigênio, à fonte de carbono e ao etanol dissolvido, que é o produto da via metabólica. A produção de etanol ocorre somente se a oxidação do piruvato, através do ciclo do ácido cítrico, for paralisada em virtude da falta do oxigênio, que é a fonte necessária para esse ciclo, ou quando uma quantidade excessiva de piruvato está sendo produzida da glicose. Pelo fato de a formação de piruvato ser conectada com a formação e a redução equivalente do NADH, que deve ser reoxidado, a célula necessita encontrar outro mecanismo, além da fosforilação oxidativa, para reoxidação. Assim, a conversão do piruvato a etanol é uma via alternativa boa, porque é um processo redutivo ligado às etapas finais da reoxidação do NADH (RATLEDGE, 1991; BADZIONG et al., 1999; MAUGARD et al., 2001).

A álcool desidrogenase constitui uma família complexa de enzimas (DUESTER et al., 1999; JÖRNVALL et al., 2000). Existem várias enzimas que funcionam como álcool desidrogenase localizadas no citoplasma e na mitocôndria. O metabolismo da glicose é associado à fração citoplasmática da ADH, considerando que o catabolismo aeróbico do etanol com a oxidação de etanol em acetaldeído é uma reação catalisada pela fração da ADH presente nas mitocôndrias. Esta fração é ligada à via respiratória e catalisa a produção de

acetil CoA, gerando ATP em mitocôndrias, representa 5% da ADH total e tem uma mobilidade eletroforética mais fraca e pH ótimo mais alcalino que a fração do citoplasma (SILVA, 1989; VALENCIA et al., 2004).

Lutstorf e Megnet, citados por SILVA (1989), estudando formas de ADH diferentes, afirmaram que elas são diferentes em função da espécie de substrato utilizado, da mobilidade eletroforética, da estabilidade ao aquecimento, dos valores de Km em relação ao etanol, acetaldeído, NAD e NADH<sub>2</sub>. Assim, eles caracterizam quatro frações da ADH. A síntese de ADH-2 é reprimida em meio contendo glicose. Essa enzima pode oxidar o n-propanol e o n-butanol mais rapidamente que o etanol. Esses estudos confirmam o envolvimento da fração ADH-2 na oxidação do etanol. Segundo esses autores, a fração ADH-4 participou da redução do acetaldeído a etanol.

A ADH3 é identificada como formaldeído glutationa-dependente e sua oxidação a etanol é considerada mais fraca que a das outras estruturas (KOIVUSALO et al., 1989; DANIELSSON e JÖRNVALL, 1992; DANIELSSON et al., 1994).

Outros autores relataram o desenvolvimento da álcool desidrogenase quando as leveduras são mantidas por muito tempo em crescimento. Estas novas frações teriam o papel de oxidação, juntamente com o ciclo do glioxalato (SILVA, 1989).

Na descarboxilação oxidativa do piruvato o ponto de entrada do ciclo de Krebs é a acetil - CoA formada. É uma reação catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase. Para que essa reação ocorra cinco coenzimas diferentes são necessárias: pirofosfato de tiamina, a alipoamida, a coenzima A, o FAD e o NAD<sup>+</sup> (TERSCHURE et al., 1995).

A piruvato desidrogenase é um complexo multienzimático composto por três tipos diferentes de proteínas, que são conhecidas por piruvato desidrogenase, dihidroato transacetilase, dihidroato desidrogenase. Estas proteínas estão organizadas em agregados, sendo coletivamente responsáveis pela catálise da reação piruvato até acetil CoA. A reação é inibida pelos produtos da reação NADH e acetil CoA (MONTGOMERY et al., 1980).

Em aerobiose o metabolismo respiratório da enzima permite a alimentação do ciclo de Krebs e a formação de compostos energéticos para as funções anabólicas. A maior parte do piruvato se dirige para o ciclo do ácido cítrico e depois para a cadeia transportadora de elétrons, onde, nessa via de aerobiose, pode-se extrair muito mais energia (PIERCE, 1987).

Em anaerobiose ocorre a formação de acetil CoA, necessário à síntese de lipídeos (esterol) e dos intermediários do ciclo de Krebs, precursores da síntese de aminoácidos (PIERCE, 1987).

Para MONTGOMERY et al. (1980), uma forte atividade da piruvato desidrogenase tem como consequência a acumulação de acetil CoA, que está relacionado com uma forte produção de ésteres, lipídeos e, ou, ácidos tricarbóxicos e uma série de outros metabólitos.

A fosfofrutoquinase fosforila a frutose-6-fosfato, para formar frutose 1,6 bifosfato. A fosfofrutoquinase desempenha um papel fundamental no controle da glicólise, porque catalisa reações determinantes do fluxo dessa via (GOLDBETER, 1996). Em muitos organismos a atividade de fosfofrutoquinase é aumentada alostericamente, é ativada por AMP, Pi, ADP, íons  $Mg^{2+}$  e íons  $Ca^{2+}$  e é inibida por citrato, ATP, PEP e gliceraldeído-3-fosfato (FONTES, 2003).

A ação do efeito alostérico da fosfofrutoquinase é importante na fase de crescimento em limitações de nitrogênio. Em presença do íon  $NH_4^+$ , a enzima perde sua sensibilidade auxiliar ao efeito alostérico (RICHARD et al., 1996). A perda de regulação da fosfofrutoquinase em fase de crescimento na ausência de nitrogênio altera o fluxo de carbono essencial à via glicolítica, o que pode levar à elevada produção de ATP e ao acúmulo de energia, conduzindo à repressão da biossíntese da enzima das fases respiratórias (MADSEN, 2004).

A fosfofrutoquinase em presença de amônio pode ser inibida pela energia elevada, o que explica a inibição global da glicólise. Ocorre acumulação de frutose-6-fosfato e glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato inibe de maneira não-competitiva a hexoquinase e provoca, assim, a inibição do transporte de glicose (HYNNE et al., 2001).

Um dos fatores importantes nas vias metabólicas são seus pontos de controle. As vias poderão ser desligadas por qualquer organismo, se ele não tiver uma necessidade imediata de seus produtos, guardando, deste modo, a energia (MADSEN et al., 2005). Na glicólise, três reações formam os pontos de controle da via: a reação de glicose para glicose-6-fosfato, catalisada pela hexoquinase; a produção de frutose-1,6 bifosfato, catalisada pela fosfofrutoquinase; e a última reação da via, catalisada pela piruvatoquinase (GALLO, 2000). Frequentemente, observa-se que o controle de rotas metabólicas é exercido em pontos próximos ao início e ao final da via, envolvendo intermediários-chave; neste caso tem-se a frutose 1,6-bifosfato (FONTES, 2003).

Existem duas isoenzimas hexoquinase e uma glicoquinase em *Saccharomyces cerevisiae*. A participação das diferentes isoenzimas hexoquinase I ou II depende da fonte de carbono do meio (SILVA, 1989) as reações catalisadas por essas enzimas são irreversíveis, sendo catalisadas por enzimas com baixa atividade catalítica que se encontram muito afastadas do equilíbrio químico. Pequenas variações na razão entre as concentrações dos reagentes e dos produtos podem repercutir em saldo positivo a favor da reação no sentido glicolítico ou no sentido inverso (WARTON, 1972).

Duas enzimas de indução participam do ciclo do glioxalato, ou seja, a isocitrato liase e a malato sintase. A isocitrato liase é uma enzima do ciclo do glioxalato que atua clivando o isocitrato do ciclo do ácido cítrico, formando succinato e glioxalato. O succinato é transportado à mitocôndria, onde entra no ciclo do ácido cítrico, para ser reconvertido a oxaloacetato, completando o ciclo (GALLO, 2000). A isocitrato liase é completamente inibida por oxalato, glioxalato, malato, oxaloacetato e  $\alpha$ -cetoglutarato, sendo assim, essa enzima é bastante sensível à inibição por intermediários do ciclo de Krebs (SILVA, 1989).

Quando o meio fermentativo é rico em glicose, o ciclo do glioxalato é reprimido, então os intermediários do ciclo de Krebs são sintetizados a partir da carboxilação do piruvato, reação catalisada pela piruvato carboxilase. A implementação do ciclo traduz a necessidade de intermediários de biossíntese do ciclo e a via glicolítica com fraca atividade. Uma forte atividade específica das

enzimas do ciclo caracteriza o estado fisiológico de atividade glicolítica fraca e anabólitos defeituosos. O funcionamento, deste modo, produz coenzima reduzida, que não pode ser reoxidada na respiração (DUNTZE et al., 1969).

O funcionamento do ciclo do glioxalato ocorre no citoplasma (isocitrato liase e malato sintase), enquanto a succinato desidrogenase tem funções mitocondriais. As atividades específicas da malato desidrogenase, malato sintase e isocitrato liase são extremamente fortes em meio contendo acetato (10, 20, 100 minutos, respectivamente, em meio de crescimento contendo glicose) (DUNTZE et al., 1969).

A biossíntese dos aminoácidos pode ser dividida em duas frações: fração que contém nitrogênio (grupamento amina), através da aminação do  $\alpha$ -cetoácido, que é utilizada para formar o glutamato ou  $\alpha$ -aminoácido correspondente, e a fração que contém carbono, utilizada para formar um  $\alpha$ -cetoácido (LEWIS e YOUNG, 1995; MAGASANIK, 1992). Assim, cada um dos 19 aminoácidos mais comumente encontrados no mosto pode originar 19  $\alpha$ -cetoácidos correspondentes. Cada uma destas reações é catalisada por uma transaminase específica. As transaminações podem também funcionar na direção oposta, resultando na síntese de um aminoácido a partir da reação entre um  $\alpha$ -cetoácido e o glutamato (HORNSEY, 2003; COOPER, 1994).

Enquanto a fração carbonada dos aminoácidos é oxidada no ciclo do ácido cítrico, a fração nitrogenada, presente no glutamato, é convertida a  $\text{NH}_4^+$  pela ação da glutamato desidrogenase. Esta reação regenera a molécula de  $\alpha$ -cetoglutarato, que pode assim reagir com outro grupamento  $\text{NH}_4^+$  através de nova transaminação (MAHLER e CORDES, 1971; MONTGOMERY, 1980; CONN e STUMPF, 1984; DAWSON, 1984).

Entre os  $\alpha$ -cetoácidos estão o  $\alpha$ -cetoglutarato, o oxaloacetato (intermediários do ciclo do ácido cítrico ou então outros compostos que podem originar intermediários do ciclo do ácido cítrico. Portanto, a fração carbonada dos aminoácidos, após a reação de transaminação, pode ser oxidada a  $\text{CO}_2$  e água através do ciclo do ácido cítrico e da cadeia respiratória. Da mesma forma, intermediários do ciclo do ácido cítrico, originados de carboidratos ou lipídios,

podem ser utilizados para a produção de aminoácidos (DAWSON, 1984).

A concentração final de diacetil na cerveja depende de três fatores: síntese e excreção do  $\alpha$ -acetolactato; conversão deste precursor no diacetil; e remoção do diacetil pela levedura como relatado anteriormente a remoção do diacetil da cerveja pode ser efetuada pela sua conversão a compostos com sabor mais leves: a acetoína (sobre a ação da diacetil redutase, enzima que catalisa essa reação) e o 2,3-butanediol (CASTILLO, 1993).

A levedura reduz enzimaticamente as dicetonas livres em acetoína e acetilcarbinol, devendo ser ressaltado que as leveduras não as produzem, mas colaboram para a degradação (CASTILLO, 1993).

## **2.5. Aspecto físico-químico de cervejas**

*Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo utilizado industrialmente com maior frequência, porque é capaz de se desenvolver em vários meios. É a levedura mais completamente estudado experimentalmente, devido à sua característica distinta do metabolismo da glicose e à importância na indústria, e por ser facilmente manipulado geneticamente também é capaz de modificações na transcrição de proteínas produzidas (glicosilação, fosforilação e acetilação). Por isto, sua aplicação é clássica para produção de vinho, cerveja e etanol. *S. cerevisiae* é um sistema potencial de proteínas recombinantes (SONNLEITNER e HAHNEMANN, 1994; CARLSEN, 1997; VASAVADA, 1995; BREJNING et al., 2005).

A cerveja é um meio desfavorável de crescimento para a maioria dos microrganismos contaminantes, por causa de seu pH baixo, da falta dos nutrientes e da presença de compostos como álcool, ácidos e outros (VERDUYN, 1990; SIMPSON, 1996; NAKANO, 2000).

As células de levedura realizam uma série de reações que convertem compostos do meio em massa celular. Como resultado, produtos do metabolismo são liberados no meio extracelular (BROCK et al., 1994; SCHULZE, 1995; DEMAINE, 2000). Em condições favoráveis, a velocidade específica de

crescimento é máxima (CALDWELL, 2000). Tanto as concentrações dos produtos excretados pela célula quanto os substratos assimilados podem afetar a velocidade de crescimento (NEIDHARDT et al., 1990; PRIEST e CAMPBELL, 1996).

Para COOPER (1991), o crescimento celular pode ser estimado pelo aumento da massa celular ou do número de células, ou ainda pela concentração de qualquer outro constituinte celular.

O metabolismo da levedura pode ser influenciado pela mudança de pH, que pode afetar a composição do meio e natureza da superfície celular devido à dissociação de ácidos e bases (ATKINSON e MAVITUNA, 1991)

Para BROCK et al. (1994), de modo geral, a célula de levedura pode crescer em uma faixa de pH entre 3 e 6. Quando a diferença entre os valores externos e internos de pH aumenta, o valor da energia de manutenção da célula também aumenta.

A fermentação de açúcar por leveduras produz etanol em pH ácido, enquanto em pH alcalinos pode produzir glicerol e ácido acético (BAIRD-PARKER et al., 1980).

As mudanças metabólicas na célula tendem a regular o pH do meio para a neutralidade. As enzimas são reguladas de forma a manter uma atividade constante e compensar o efeito do pH do meio na célula (BAIRD-PARKER et al., 1980).

O efeito do pH gerado pelo ácido acético sobre o crescimento e a atividade fermentativa de *Saccharomyces* também foi analisado. Estudos realizados por PHOWCHINDA et al. (1995) demonstraram que o pH gerado pelo ácido acético não afetou as atividades de crescimento e fermentação, mas, em contrapartida, o ácido acético teve efeito inibidor, provavelmente causado por seu nível na forma não-dissociada presente no meio de fermentação. O ácido acético é um ácido fraco e não ioniza totalmente quando presente em solução. Estudos mostram ainda que, aumentando o pH de 4,5 para 6,5 ou utilizando aeração eficiente, a toxicidade do ácido pode ser evitada. Sob condições limitadas de aeração, o ácido

acético acumulado durante a fermentação causou intoxicação da levedura em baixo pH extracelular (MEINANDER et al., 1994).

A atividade enzimática dentro da célula da levedura parece depender de outros fatores além do pH, como temperatura, frações enzimáticas e concentrações de AMP e ATP, não sendo, entretanto, sensível a ADP e íon  $\text{Ca}^{++}$  (NICHOLS et al., 1994).

Além dos estudos cinéticos e bioquímicos procurou-se neste trabalho avaliar sensorialmente as cervejas produzidas experimentalmente. A escala hedônica pode ser utilizada em testes de aceitação em laboratório, com o objetivo de obter informações sobre a provável aceitação de produtos pelo consumidor nas fases iniciais de desenvolvimento. É utilizada também para determinar a aceitação, quando se promovem alteração/inclusão de ingredientes e modificações nos processos, nas matérias na embalagem, nas condições de estocagem e no tempo de conservação dos alimentos. É um teste de relativa simplicidade, sendo as instruções dadas aos provadores restritos aos procedimentos, sem nenhuma informação em direção à resposta (CHAVES, 1993).

A determinação da aceitação é parte crucial no processo de desenvolvimento ou melhoramento de produtos. Os testes de aceitação requerem equipe não-treinada, com grande número de participantes (acima de 40 ou 50), que representam a população de consumidores atuais ou potenciais do produto. Para triagem inicial ou avaliação preliminar de aceitação, a análise é normalmente realizada em condições de laboratório, com 30 a 50 julgadores não-treinados. Para estudos mais representativos, utilizam-se locais centrais (locais de grande concentração de pessoas), pela facilidade de seleção ao acaso de um número acima de 100 pessoas, para cada treinamento, formulação ou amostra avaliada. Em estudos de campo, o número de consumidores que participam do teste deve ser aumentado para algo acima de 1.000 julgadores para cada tratamento analisado (DELLA LUCIA, 1999).

Há diferentes tipos de escala hedônica, como as verbais: gosta extremamente/desgosta extremamente; excelente/péssimo, e a escala gráfica ou

facial. Nas escalas do tipo verbal, a escolha das palavras ou frases que vão identificar os intervalos na escala é de grande importância, uma vez que essa associação verbal não somente deverá dar idéia de ordem sucessiva dos intervalos na escala, como também facilitar a decisão do provador em suas respostas. Devem-se evitar expressões ambíguas que possam causar confusão e dificultar a decisão do provador. Os pontos da escala são associados a valores numéricos, possibilitando a análise estatística dos resultados por meio de análise de variância e de outras técnicas. No questionário não se indicam os valores numéricos, somente as descrições. O analista do teste é quem deve designar os valores ao analisar os resultados (MORAES, 1993; ANZALDUA-MORALES, 1994).

A escala hedônica pode ter forma e amplitude variáveis, porém a mais utilizada é a escala descritiva de nove categorias: gosta extremamente, gosta muito, gosta moderadamente, gosta ligeiramente, indiferente (não gosta nem desgosta), desgosta ligeiramente, desgosta moderadamente, desgosta muito e desgosta extremamente. Esta escala é de fácil entendimento, com mínimo de instrução para consumidores inexperientes (MUNOZ, 1992; PAL et al., 1995).

Testes realizados em laboratórios possuem as vantagens de homogeneizar o preparo e a apresentação das amostras, controlar as condições externas e ambientes e ter baixo custo; suas desvantagens são as informações limitadas. Os testes realizados em locais centrais possuem as vantagens de obter informações de uma parcela representativa da população e utilizar largo número de provadores; sua desvantagem é a falta de controle das condições verdadeiras de uso. Assim, é possível obter maiores informações e a opinião familiar com relação ao produto (DELLA LUCIA, 1999).

## **CAPÍTULO 1**

### **TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE CERVEJA**

#### **1. INTRODUÇÃO**

O Ministério da Agricultura é, no Brasil, o órgão responsável pelo estabelecimento de normas de identidade e qualidade das bebidas alcoólicas e não-alcoólicas. De acordo com essas normas a cerveja é definida como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto de malte por ação da levedura cervejeira. Segundo esse Ministério, as matérias-primas a serem utilizadas na produção de cerveja são: malte, água e lúpulo; devendo-se ser ressaltado que parte do malte poderá ser substituída por cereais malteados ou não, ou por carboidratos de origem vegetal. As fontes de carboidratos utilizadas em substituição ao malte são chamadas “adjuntos”.

No que diz respeito aos adjuntos utilizados na produção da cerveja brasileira destacam-se: griz de milho e a quirera de arroz. Em menor escala utiliza-se açúcar na forma de açúcar cristal e açúcar invertido. Mais recentemente entrou no mercado o xarope de milho. Tanto no Brasil como no exterior há pesquisadores estudando a utilização de fontes não-convencionais de adjunto na produção de cerveja.

Provavelmente as primeiras bebidas alcoólicas tenham sido feitas de cevada, tâmaras, uvas ou mel, sendo a origem incerta. Há evidências de que a cerveja feita de cevada malteada já era fabricada na Mesopotâmia em 6000 antes de Cristo.

O Brasil apresenta hoje várias cervejarias de médio e grande porte, que adotam a mais moderna tecnologia cervejeira para fabricar suas cervejas. A produção brasileira de cerveja soma aproximadamente 84 milhões de hectolitros anuais (2001), colocando o país em 4<sup>o</sup> lugar em nível mundial, atrás apenas dos Estados Unidos (236,5 milhões de hL por ano), da China (209 milhões de hL por ano) e da Alemanha (112,8 milhões de hL por ano).

A fabricação de cerveja é com certeza uma das mais antigas biotecnologias e, em termos econômicos, permanece sendo a aplicação mais significativa da microbiologia industrial.

O estudo da arte cervejeira é atualmente baseado em conhecimentos teóricos e empíricos, que foram acumulados ao longo dos séculos através de práticas contínuas. Somente há 100 anos a cerveja passou a ser estudada a fundo, e até hoje não foi possível detectar todas as reações que ocorrem durante a produção desta bebida. Mesmo os mestres cervejeiros mais modernos só aplicam os conceitos teóricos até determinado ponto. A partir daí, o que passa a valer é a experiência de cada um para poder garantir um produto de qualidade.

Tomando-se como base a importância dessa bebida e o seu complexo processo de fabricação, objetivou-se com este trabalho estudar a tecnologia cervejeira, utilizando como complemento do malte adjuntos (arroz, sorgo, milho, caldo de cana, xarope de maltose) na proporção de 30% em relação ao malte processado, fazendo-se uma avaliação do teor de extrato do mosto primário e mosto misto, da massa de extrato do mosto misto e do rendimento da mosturação, parâmetros estes utilizados pela indústria cervejeira com o objetivo de avaliar a eficiência do processo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A tecnologia da produção da cerveja deste trabalho foi desenvolvida na fábrica piloto do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG.

### 2.1. Matéria-prima

Para produzir a cerveja foram utilizadas as seguintes matérias-primas: malte, água destilada, lúpulo em *pellets* e os adjuntos (*gritz* de milho, sorgo, quirera de arroz, caldo de cana e xarope *high* maltose). Foi utilizado sulfato de cálcio (gesso) como insumo, para correção do pH, conforme descrito por VENTURINI FILHO (1993).

O malte utilizado foi produzido e doado pela malteria do Vale, localizada no município de Taubaté-SP.

Na água destilada utilizou-se sulfato de cálcio di-hidratado ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) para correção na proporção de 0,43 g para cada litro, sendo esse um cofator fundamental na produção de cerveja (Ca 100 ppm).

O lúpulo na forma de *pellets* foi gentilmente fornecido por indústria cervejeira de Minas Gerais.

A quirera de arroz, o *gritz* de milho e o caldo de cana foram adquiridos no comércio local e produzidos no Departamento de Fitotecnia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

O sorgo foi doado pela Embrapa milho e sorgo, localizada no município de Sete Lagoas-MG.

## **2.2. Agente fermentativo**

Como agente fermentativo foram utilizadas leveduras cervejeiras de baixa e alta fermentação da espécie *Saccharomyces carlsbergensis* (*Lager*) e *Saccharomyces cerevisiae* (*ale*), devidamente propagadas, utilizando-se como substrato mosto de cevada à temperatura de 35°C, seguindo a metodologia descrita pela FUNDAÇÃO ANDRE TOSELLO (2002).

## **2.3. Processo de fabricação da cerveja**

### **2.3.1. Moagem do malte**

O malte foi triturado a seco em moinho durante o período de 10 minutos, para cada teste, de forma a produzir a desintegração total do endosperma, para que todos os elementos constituintes estivessem acessíveis às ações enzimáticas.

### **2.3.2. Mosturação**

As mosturações foram processadas em dois tachos abertos, compostos de camisa com circulação de vapor e água para resfriamento, com capacidade de 18 e 36 L, sendo, respectivamente, um utilizado como cozedor de cereal e o outro como tina de mostura. No aquecimento utilizou-se circulação de vapor gerado por caldeiras a lenha.

Utilizou-se o processo de duas massas, segundo MULLER (2000) e HOUGH (1987), para os adjuntos sorgo, milho e arroz (amiláceos), seguindo três

etapas para produção de extratos: gomificação ou gelatinização, liquefação ou dextrinização e sacarificação. Inicialmente trabalhou-se com a temperatura de 50°C na fase de repouso de peptonização, seguindo-se posteriormente as temperaturas demonstradas na Figura 1.

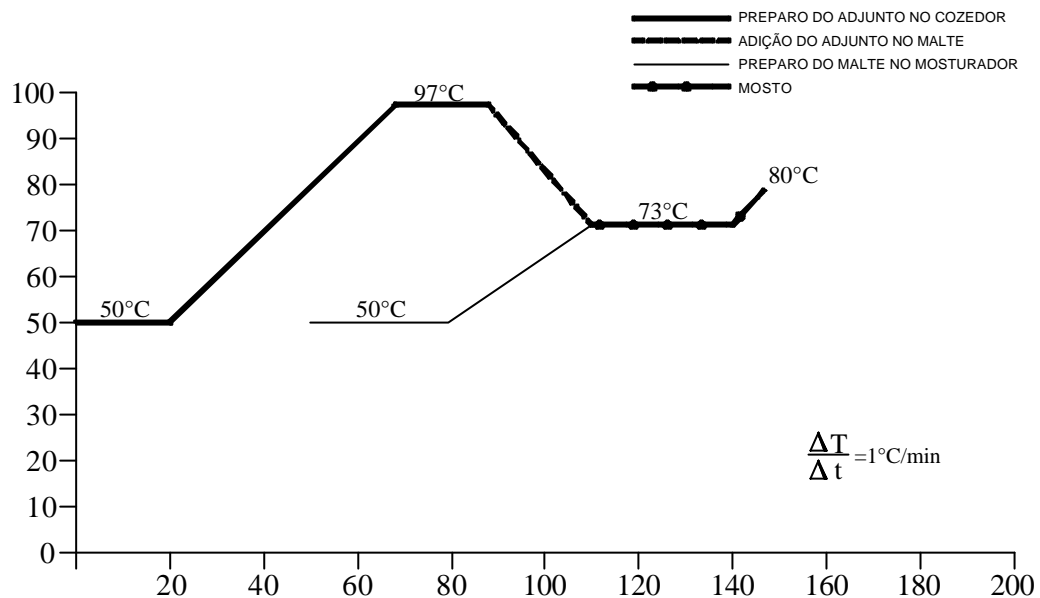


Figura 1 – Relação de tempo e temperatura na mosturação pelo processo de duas massas.

Os adjuntos foram utilizados na proporção de um terço em relação à quantidade de malte do sistema. Eles foram colocados no tacho cozedor de cereal, após o repouso de peptonização com 10% de malte em relação ao total do adjunto. Inicialmente foram aquecidos a 50°C durante 25 a 30 minutos, em seguida a temperatura se elevou na proporção de 1°C por minuto até 97°C, onde permaneceu cerca de 20 minutos, quando foi introduzida no segundo tacho aberto, contendo a mistura de malte a 50°C peptonizado, ou seja, o que coincide com início da elevação da temperatura da massa, mantendo-se o equilíbrio em torno de 73 °C (Figura 1).

O caldo de cana e o xarope de *high* maltose, por se tratarem de adjuntos açucarados, foram adicionados diretamente ao malte por meio do processo de infusão, de acordo com DE CLERCK (1957). Utilizou-se aqui apenas o

mosturador (tacho aberto de 36 litros). Neste caso o adjunto não foi fervido em tanque separado. A hidrólise de suas frações se deu na tina de mosturação, juntamente com o malte, em temperaturas inferiores a 75°C. Como anteriormente, os adjuntos foram utilizados na proporção de um terço em relação à quantidade de malte do sistema. Primeiramente foram aquecidos a 50°C durante 25 a 30 minutos, em seguida a temperatura se elevou na proporção de 1°C por minuto até 73 °C, onde permaneceu cerca de 20 minutos, quando a temperatura se elevou para 80 °C durante 10 minutos (Figura 2).

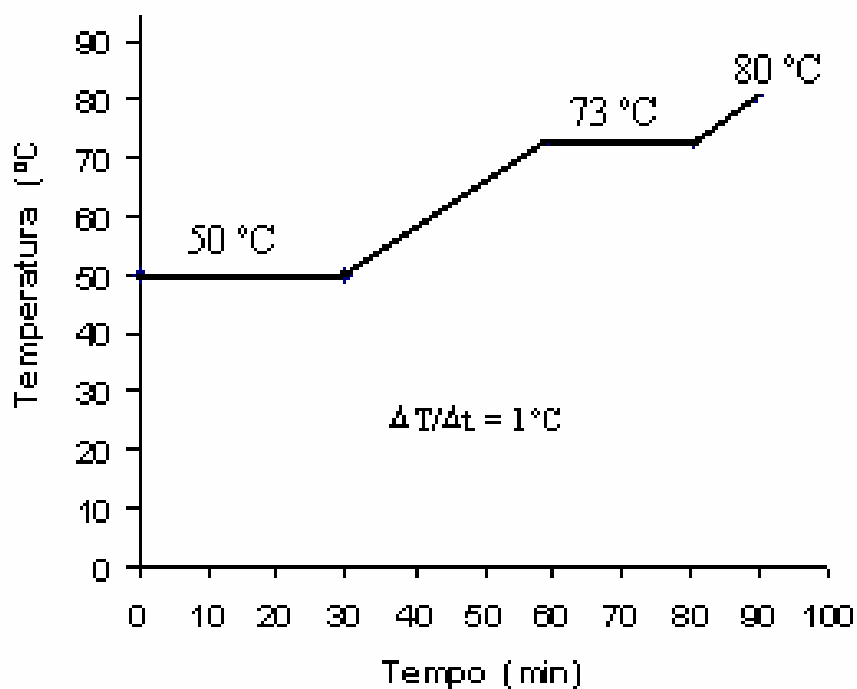


Figura 2 – Relação de tempo e temperatura na mosturação pelo processo de infusão.

No final da mosturação, para os dois métodos, foram feitos os monitoramentos das transformações de degradação do amido pelo teste do iodo (solução 0,20 N de iodo), de acordo com REINOLD (1997) e EUROPEAN BREWERY CONVENTION (1987). Caso esteja presente no mosto, o iodo combina-se com amido não-hidrolisado, produzindo coloração azul bem intensa.

### **2.3.3. Filtração**

A filtração foi realizada em um suporte metálico perfurado, recoberto por um pano de algodão devidamente esterilizado em autoclave a 121°C, por 15 minutos.

No processo utilizou-se o método em que o leito de filtragem é revolvido com a ajuda de uma despumadeira de ácido inoxidável e adicionaram-se cuidadosamente 18 litros de água destilada (Ca 100 ppm) a 80°C, com o objetivo de lavar o bagaço de malte. Após 30 minutos de filtragem repetiu-se a mesma operação, de acordo com CEREDA et al. (1983) e BRAHMA (1998).

### **2.3.4. Cocção do mosto e adição do lúpulo**

A partir da filtragem, o mosto adquirido foi fervido por 60 minutos em tacho aberto, em volume de 36 litros, onde o aquecimento foi feito com vapor.

Na lupagem do mosto utilizou-se lúpulo em *pellets*, através do método tradicional de três cargas, sugerido por Hudston, citado por VENTURINI FILHO (1993). Nesse processo a primeira carga de lúpulo foi adicionada 15 minutos após o início da ebulição, a segunda a 30 minutos e a terceira 45 minutos.

### **2.3.5. Resfriamento do mosto e correção do °Brix**

Finalizada a fervura (100°C), o mosto foi resfriado em um recipiente de 50 litros de capacidade, contendo água a -20°C. Após a temperatura do mosto chegar próximo de 20°C, determinou-se o teor de extrato através de um refratômetro marca Cosmo Brix 0 – 32. O teor de extrato do mosto foi corrigido para 12°Brix, com o uso de água desmineralizada.

Com o extrato corrigido, foi retirada uma amostra de 500 mL, para determinação do extrato fermentável.

O mosto, após a coleta das amostras, foi colocado em câmara fria a 0 °C e deixado em repouso durante 12 horas, período que tanto o *trub* quanto o bagaço

de lúpulo decantaram no fundo do recipiente acondicionador. No final do repouso, os mostos sobrenadantes com temperatura próxima de 0°C foram colocados em botijas plásticas de 5 litros e levados para congelamento. No momento oportuno foram descongelados e divididos em balões de 3 litros de capacidade, sendo completados com mosto até 75% de sua capacidade e, posteriormente, levados para inoculação do agente fermentativo, como mostra Figura 3.



Figura 3 – Visualização dos balões de fermentação em processos fermentativo .

### **2.3.6. Fermentação e maturação**

A inoculação do mosto frio foi feita à temperatura de 10 – 12°C, utilizando-se o fermento previamente propagado e devidamente ativado para uma proporção de  $10^6$  a  $10^8$  células viáveis/mL de mosto, o que corresponde à adição de aproximadamente 77 g de levedura (em matéria seca) por 100 litros de mosto ou 200 a 387 g de levedura prensada (40% de umidade) por 100 litros de mosto, de acordo com CEREDA et al. (1983).

Foram retirados 30 mL de amostra de cada substrato inoculado e em processo de fermentação a cada 6 horas, durante as primeiras 36 horas e de 24 em 24 horas, até a atenuação chegar a 80% dos açúcares fermentáveis. Toda fermentação foi conduzida em aparelho incubador BOD 411D marca Nova ética, com temperatura controlada em  $12 \pm 1^\circ\text{C}$ . Quando o teor de extrato fermentável

do mosto estava próximo de 80% de atenuação, a fermentação primária foi finalizada.

Paralelamente ao processo fermentativo, uma amostra de 30 mL em triplicata de cada experimento foi colocada para fermentar à temperatura de 35°C, de forma a verificar o consumo dos açúcares fermentáveis pelas leveduras, em um tempo mais acelerado, para se determinar a atenuação limite.

Passado o período fermentativo, os balões de fermentação, contendo mosto fermentado, foram colocados em câmara fria com temperatura regulada a  $0 \pm 1^\circ\text{C}$ , para processar a etapa de maturação da cerveja- verde, onde permaneceu durante 14 dias, conforme a metodologia da BRAHMA (1998).

### **2.3.7. Engarrafamento e carbonatação**

Com a conclusão da etapa de maturação, a cerveja foi engarrafada manualmente a uma temperatura próxima de 0°C, em garrafas de 600 mL, de cor âmbar, com tampas metálicas, ambas devidamente esterilizadas em água fervente durante 1 hora.

O processo de carbonatação foi realizado naturalmente, à temperatura ambiente. Através da fermentação do açúcar residual presente na cerveja, por ação das leveduras ainda presentes no meio, o gás carbônico foi produzido no interior das garrafas durante o processo, conforme a metodologia descrita por VENTURINI FILHO (1993). No final da carbonatação, as garrafas que continham cerveja foram pasteurizadas e armazenadas em geladeira (6 – 8°C), aguardando os testes sensoriais.

## **2.4. Avaliação da mosturação**

### **2.4.1. Teor de extrato do mosto primário e mosto misto**

O teor de extrato aparente foi determinado com o refratômetro de Brix, conforme COPERSUCAR (1987).

### **2.4.2. Massa de mosto misto**

A massa de mosto misto foi obtida em balança comercial, marca Filizola, com capacidade de 20 kg e sensibilidade de 10 g. A massa de extrato do mosto misto foi obtida pela fórmula descrita a seguir, de acordo com VENTURINI FILHO (1993).

$$\text{Massa de extrato (g)} = \text{teor de extrato (°Brix)} \times \text{massa de mosto (g)} / 100$$

### **2.4.3. Rendimento da mosturação**

O rendimento da mosturação foi calculado através da equação a seguir, a partir de informações obtidas em DE CLERCK (1957).

$$\text{Rendimento} = \text{massa de extrato (g)} / \text{massa de malte (g)} + \text{massa de adjunto} \cdot 100$$

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Avaliação da mosturação**

A eficiência da mosturação, que representa a taxa de hidrólise do amido em açúcares, foi estimada pelos parâmetros teor de extrato do mosto primário, teor de extrato do mosto misto, massa do mosto misto e rendimento da mosturação.

#### **3.2. Teor de extrato do mosto primário**

O teor de extrato do mosto primário é a quantidade de açúcar (°Brix) obtido no mosto após a hidrólise enzimática, sendo a primeira fase líquida que atravessa o leito de filtração.

Pelo exame dos dados do Quadro 1, nota-se que entre os adjuntos açucarados (xarope de *high* maltose e caldo de cana) não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ). Também não foi notada diferença significativa entre os adjuntos amiláceos (sorgo, milho e arroz), o que está de acordo com os resultados obtidos por VENTURINI FILHO (1993). Somente ocorreu diferença quando os grupos (amiláceo e açucarado) foram comparados. A mosturação dos adjuntos amiláceos milho, sorgo e arroz, utilizando o processo

Quadro 1 – Médias do teor de extrato do mosto primário para as diferentes composições estudadas

Composição	Teor de extrato do mosto primário (°Brix)	Desvio-padrão
30% de maltose	22,5a	1,05
30% de cana	21,5 a	1,21
30% de sorgo	17,0 b	0,00
30% de milho	16,5 b	0,60
30% de arroz	16,3 b	0,62

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ) (GAN et al., 2001).

de duas massas, apresentou, respectivamente, os resultados 16,5, 17 e 16,3°B. Esses resultados podem ter ocorrido em função de os amidos desses cereais apresentarem temperaturas de gomificação semelhantes, tendo uma disponibilidade de açúcares próxima em relação aos seus extratos de mosto primário. Deve-se destacar que a temperatura de gomificação depende da espécie botânica e do tamanho dos grânulos de amido para mesma espécie, segundo REINOLD (1997). Essa extração corresponde a 80 a 90% de sólidos totais extraídos do adjunto, segundo a AMBEV (2003). Já os adjuntos açucarados apresentaram concentrações de açúcares de 22,5 °B para xarope de *high* maltose e 21,5 para caldo de cana, que corresponde ao processo de infusão. A concentração de açúcar foi maior no xarope de *high* maltose em função de ele ser usado em igual proporção em relação ao caldo de cana (um terço em relação ao malte) e estar mais concentrado. A hidrólise não promoveu uma geração de açúcares tão elevada quanto aquelas obtidas pelas fontes já açucaradas.

### 3.3. Teor de extrato do mosto misto

O teor de extrato do mosto misto é a quantidade de açúcar (°Brix) obtido após o resíduo sólido ser lavado com água quente (75 – 80°C), para extrair a máxima quantidade de extrato retido no leito filtrante.

Analisando os dados do Quadro 2, observa-se que existiu diferença estatística entre os substratos açucarados (xarope de *high* maltose e caldo de cana), que diferiram também dos substratos amiláceos, acompanhando o mesmo Quadro 2 – Médias do teor de extrato do mosto misto para as diferentes composições estudadas

<b>Composição</b>	<b>Teor de extrato do mosto misto (°Brix)</b>	<b>Desvio-padrão</b>
30% de maltose	16,5 a	0,34
30% de cana	16,0 a	0,43
30% de sorgo	9,2 c	0,26
30% de milho	9,1 c	0,45
30% de arroz	9,1 c	0,34

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ) (GAN et al., 2001).

comportamento do teor de extrato do mosto primário. Já para os substratos amiláceos entre si não foi observada nenhuma diferença nos tratamentos. A melhor extração de sólidos solúveis conseguida na lavagem do bagaço do malte (mosto misto) foi observada nos adjuntos açucarados (xarope de *high* maltose 21,5°Brix e caldo de cana 16,5°Brix).

Os adjuntos amiláceos, após lavagem, apresentaram teor de extrato do mosto misto semelhante (milho 9,1°Brix, sorgo 9,2°Brix, arroz 9,1°Brix), comprovando que apesar de possuírem amidos de composição diferentes (proporção de amilose e amilopectina) as etapas de gelatinização, liquefação e sacarificação, na mosturação foram idênticas para todos.

### **3.4. Massa de mosto misto**

A massa de extrato de mosto misto é o produto obtido ao dividir o teor de extrato do mosto misto (°Brix) pela massa de mosto (g).

Analisando o Quadro 3, nota-se que houve diferença significativa estatisticamente entre os substratos açucarados (xarope de *high* maltose e caldo de cana). Constata-se que para os adjuntos amiláceos submetidos ao processo de

mosturação pelo método de duas massas a massa de extrato foi: milho 3.033 g, sorgo 3.064 g e arroz 3.032 g. Já para os adjuntos açucarados submetidos ao método de infusão os resultados foram: maltose 3.684 g e cana 3.560 g. Os resultados mostram que os adjuntos amiláceos, por utilizarem maior quantidade de água no processo de filtração, possuem teor de extrato no mosto misto menor que o dos adjuntos açucarados, o que leva conseqüentemente a uma massa de extrato do mosto misto também menor, que irá influenciar diretamente o rendimento da mosturação; estes resultados estão de acordo com os obtidos por HUG & PFERNNINGER (1980).

Quadro 3 – Médias do teor da massa do mosto misto para as diferentes composições estudadas

<b>Composição</b>	<b>Massa do mosto misto</b>	<b>Desvio-padrão</b>
30% de maltose	3684 a	2,6
30% de cana	3560 b	2,6
30% de sorgo	3064 c	3,0
30% de milho	3033 d	2,6
30% de arroz	3032 d	3,0

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ) (GAN et al., 2001).

### **3.5. Rendimento da mosturação**

O rendimento da mosturação de todos os tratamentos é calculado como a razão entre a massa de extrato do mosto misto e a massa do malte utilizado mais a massa do adjunto. Analisando estatisticamente os resultados apresentados no Quadro 4, verifica-se que não houve diferença significativa entre os adjuntos açucarados, quando comparados entre si, porém existe diferença estatística quando comparados com os adjuntos amiláceos. Também não foi detectada diferença entre os adjuntos amiláceos comparados entre si, que tiveram os seguintes resultados de rendimento na mosturação: sorgo 76,6%, milho 75,8% e milho 75,5%, o que está de acordo com os resultados obtidos por VENTURINI FILHO (1993), que trabalhou com adjuntos amiláceos. Como os resultados das

massas nos extratos dos mostos mistos foram mais elevados para os adjuntos açucarados, e a massa do malte acrescida da massa do adjunto foi a mesma para todos os tratamentos, conclui-se que os adjuntos açucarados, como demonstrado nos parâmetros anteriores, apresentaram melhores rendimentos.

Quadro 4 – Médias dos rendimentos da mosturação para as diferentes composições estudadas

<b>Composição</b>	<b>Rendimento da mosturação</b>	<b>Desvio-padrão</b>
30% de maltose	91,967 a	2,49
30% de cana	89,000 a	1,80
30% de sorgo	76,600 b	1,03
30% de milho	75,800 b	2,32
30% de arroz	75,500 b	1,82

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ) (GAN et al., 2001).

### 3. CONCLUSÕES

Dentro das condições de trabalho em que foi realizada esta pesquisa, pode-se tirar as seguintes conclusões:

Concluiu-se, com base nos teores de mosto primário, mosto misto, massa do mosto misto e rendimento, que a eficiência de hidrólise dos três cereais empregados (amiláceos), se comparados com as fontes de açúcares na forma de xarope (caldo de cana e xarope de *high* maltose) adicionadas na mesma proporção dos cereais, foi significativamente superior. A hidrólise não promoveu uma geração de açúcares tão elevada quanto aquelas obtidas pelas fontes já açucaradas

Entre os três cereais não houve diferença significativa, o que indica que o complexo amilolítico proveniente da cevada não agiu diferentemente sobre os três tipos de amido (milho, sorgo e arroz).

Todos os adjuntos testados neste estudo foram tecnologicamente capazes de produzir meios com características adequadas para o início do processo fermentativo e podem ser utilizados no processo de fabricação de cerveja, devendo ser destacado que os açucarados possuem maior eficiência na fabricação, quando comparados aos amiláceos.

## **CAPÍTULO 2**

### **METABÓLITOS EM CERVEJA**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Para que ocorra a utilização dos nutrientes do meio é necessário que as leveduras possuam genes responsáveis pelo desenvolvimento de sistemas enzimáticos, que possa proporcionar uma metabolização cada vez mais eficiente dos mais variados constituintes do meio fermentativo (mosto), em compostos orgânicos simples e fundamentais, denominados metabólitos-chaves, que são utilizados no processo de biossíntese. O metabolismo degradativo (catabolismo) realiza-se com a liberação de energia (processo exergônico). Já os processos de biossíntese são endergônicos, necessitam do fornecimento de energia para sua realização. A energia para biossíntese é formada pelas reações catabólicas (VERDUYN, 1991; PATARO et al., 1998).

Através das reações enzimáticas, os metabólitos formados, inicialmente, servem como matéria-prima; são transformados em moléculas simples, entre os quais estão os intermediários ou precursores das macromoléculas; e são os intermediários da oxidação da glicose, ou seja, as trioses, as pentoses, o ácido pirúvico, o acetil-CoA, o oxaloacetato, o  $\alpha$ -cetoglutarato e outros. Dentre os

precursores das macromoléculas no metabolismo biossintetizador estão os aminoácidos, nucleotídeos, aminoaçúcares e ácidos graxos. Alguns são compostos nitrogenados cujo nitrogênio provém do íon de amônio do meio. Outros contêm enxofre, derivado do íon de sulfato, e outros são ésteres do ácido fosfórico (WATIER et al., 1996).

Os metabólitos primários são moléculas de baixo peso molecular que aparecem como produtos intermediários ou finais das vias catabólicas e anabólicas das leveduras na produção de cerveja e como suporte para construção das macromoléculas essenciais, ou são convertidos em coenzimas. O etanol, o glicerol, o acetato e a glicose são intermediários do processo biológico. A superprodução de metabólitos durante o processamento é evitada pela maioria dos microrganismos, visto que é um processo que consome grande quantidade de energia (ALVES, 1994).

O conjunto dessas reações é coletivamente denominado metabolismo intermediário e constitui-se por um complexo de reações enzimáticas interligadas. Cada uma dessas reações é, do ponto de vista bioquímico, relativamente simples, envolvendo a retirada ou a adição de hidrogênio da água, de gás carbônico, de amônia ou de fosfato (HORNSEY, 2005).

Os componentes da cerveja classificados como secundários constituem um grupo de produtos oriundos do processo de fermentação e são responsáveis por características sensoriais importantes, que se não forem monitoradas adequadamente podem comprometer a qualidade da cerveja. Esse monitoramento está relacionado com a manipulação de fatores que têm influência direta no metabolismo da levedura (LEWIS e YUONG 1995).

O objetivo desta etapa do trabalho foi estudar o perfil de consumo da glicose e formação de etanol, glicerol e acetato em cervejas, utilizando leveduras de baixa (*Saccharomyces carlsbergensis*) e alta (*Saccharomyces cerevisiae*) fermentação em diferentes substratos, contendo sorgo, arroz, milho, xarope de *high* maltose e caldo de cana, como adjuntos do malte.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As determinações dos metabólitos foram realizadas no Laboratório de Fermentações do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG e no Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas – NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG.

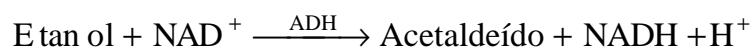
### 2.1. Determinação de metabólitos extracelulares

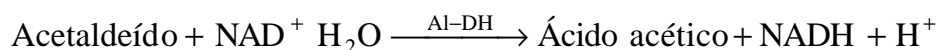
#### 2.1.1. Determinação de etanol

A determinação do etanol foi feita com o uso da metodologia enzimática (ADH + AL-DH), com utilização do kit comercial (BOEHRINGER, 2003).

O método enzimático utiliza a álcool desidrogenase (ADH) e a acetaldeído desidrogenase (AL-DH) em presença de  $\text{NAD}^+$ .

O equilíbrio da reação é deslocado para a direita com a formação do acetaldeído. O acetaldeído é oxidado quantitativamente a ácido acético na presença da enzima aldeído desidrogenase (Al-DH), segundo a reação a seguir:





O etanol presente no meio foi oxidado através da adenina nicotinamida dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>), na presença da enzima álcool desidrogenase (ADH) (reação anterior).

O NADH formado na reação anterior foi determinado pela absorvância em espectrofotômetro de dosagens bioquímica COBAS-FARA (Roche) a 340 nm, a 20°C, para um volume de amostra de 10 microlitros e um volume final de 250 microlitros.

De acordo com a equação, em relação à concentração de NADH formado, há uma relação estequiométrica com a degradação do substrato (etanol). A fórmula utilizada para o cálculo pode ser expressa por:

$$c = \frac{V.M.W}{\epsilon.d.v.2.1000} \cdot \Delta A \text{ [g/L]}$$

em que

V = volume final: 250 microlitros;

v = volume da amostra: 10 microlitros;

MW = peso molecular: 46,07;

d = caminho ótico [cm]: 1.00;

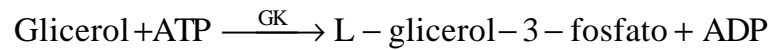
$\epsilon$  = coeficiente de extinção do NAD a 340 nm = 6.3 [L.mmol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>]; e

$\Delta A$  = variação da absorvância.

### 2.1.2. Determinação de glicerol

A dosagem de glicerol extracelular das amostras foi realizada através da metodologia descrita no kit comercial (BOEHRINGER, 2003).

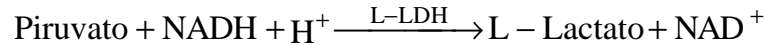
O glicerol presente nas amostras foi fosforilado na presença de ATP e transformado em L-glicerol-3-fosfato e ADP na reação catalisada pela enzima glicerolquinase (GK), de acordo com a reação:



Na reação a seguir, através da ação da piruvatoquinase (PK), há a reação do ADP com fosfoenolpiruvato ocorre a formação do piruvato mais ATP.



O piruvato em presença do  $\text{NADH} + \text{H}^+$  (reduzido) e em reação catalisada pela enzima L-Lactatodesidrogenase (L-LDH) produz L-Lactato e  $\text{NAD}^+$  (oxidado) (reação abaixo).



Conforme pode ser deduzido dessas reações, o NADH foi utilizado equivalentemente ao consumo do glicerol, o que é acompanhado através da absorvância em aparelho de dosagens bioquímicas COBAS-FARA (Roche) a 340 nm a uma temperatura de 20-25°C e 10 microlitros de amostra para um volume total de 250 microlitros.

$$c = \frac{V \cdot \text{MW}}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta A \text{ [g/L]}$$

em que

V = volume final: 250 microlitros;

v = volume da amostra: 10 microlitros;

MW = peso molecular: 92,1;

d = caminho ótico [cm]: 1.00;

$\epsilon$  = coeficiente de extinção do NAD a 340 nm = 6.3 [L.mmol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>]; e

$\Delta A$  = variação da absorvância.

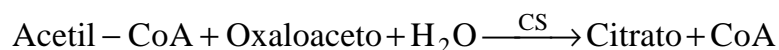
### 2.1.3. Determinação de acetato

A determinação do acetato foi feita com o uso da metodologia descrita no kit comercial (BOEHRINGER, 2003).

O ácido acético presente nas amostras testadas (acetato) foi convertido a acetil-CoA (reação descrita a seguir), na presença da enzima acetil-CoA sintetase (ACS), adenosina-5-trifosfato (ATP) e coenzima A (CoA).



Acetil-CoA reage com oxaloacetato e transforma-se em citrato na presença da enzima citrato sintase (CS) (reação a seguir).



O oxaloacetato requerido para reação é formado a partir do L-malato (reação a seguir) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) na presença de L-malato desidrogenase (L-MDH). Nesta reação o NAD<sup>+</sup> é reduzido a NADH.



A concentração de acetato é proporcional a formação do NADH que foi determinado através do aumento da absorvância, em aparelho de dosagens bioquímica COBAS-FARA (Roche) a 340 nm a 20 °C para um volume de amostra de 10 microlitros e um volume final de 250 microlitros.

$$c = \frac{V \cdot MW}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta A [\text{g/L}]$$

em que:

V = volume final: 250 microlitros;

v = volume da amostra: 10 microlitros;

MW = peso molecular: 60.05;

d = caminho ótico [cm]: 1.00;

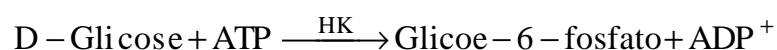
$\epsilon$  = coeficiente de extinção do NAD a 340 nm = 6.3 [L.mmol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>]; e

$\Delta A$  = variação da absorbância.

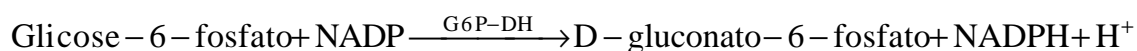
#### 2.1.4. Determinação de glicose

A concentração de glicose foi determinada através de técnica enzimática seguindo metodologia do kit comercial (BOEHRINGER, 2003) utilizando hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase.

Na condução dos ensaios a pH 7,6 a enzima hexoquinase (HK) catalisa a fosforilação da D-glicose (reação abaixo) através da adenosina-5-trifosfato (ATP) com a formação simultâneo da Adenosina-5-difosfato (ADP).



A glicose-6-fosfato (G-6-P) é oxidada através do fosfato da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP) na presença da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH) para D-gluconato-6-fosfato com a formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH - reduzido) (reação a seguir).



A quantidade de NADPH formada nesta reação é estequiometricamente equivalente a quantidade de glicose no sistema. O aumento do NADPH foi medido pela absorvância a 340 nm, a uma temperatura de 20-25°C, e um volume de amostra de 10 microlitros para um volume final da mistura de 250 microlitros.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Determinação do etanol

Os níveis de produção de etanol nas fermentações aqui apresentados referem-se ao total obtido no sistema de fermentação, utilizando nos ensaios o reator cheio até 75% de sua capacidade, sem alimentação de oxigênio, somente com agitação inicial, até 80% de consumo dos açúcares fermentáveis. Foram utilizadas as duas leveduras de alta e baixa fermentação, nos diferentes substratos.

A análise da Figura 1 revela que a produção de etanol teve início a partir das primeiras horas de fermentação, apresentando baixos valores e permanecendo sem grandes aumentos até as 84 horas. Constatou-se o mesmo comportamento para todos os ensaios, o que é favorável na fermentação de cerveja do tipo *pilsen* (tipo de cerveja alvo do teste), cujos valores de etanol podem chegar a 2 a 4,5 % no produto final para comercialização. Como neste trabalho a fermentação foi interrompida com 80% de consumo dos açúcares fermentáveis, os níveis de etanol atingiram, em média, 30 g/L. Em cervejas testadas por BVOCHORA e ZVAUYA (2001), utilizando adjuntos amiláceos, os níveis de etanol chegaram a 4,74 % (v/v) de quatro a sete dias de fermentação. Porém, níveis acima de 45 g/L em pleno processo fermentativo, como confirmado em trabalhos feitos por GUIDO et al. (2004), podem impedir o

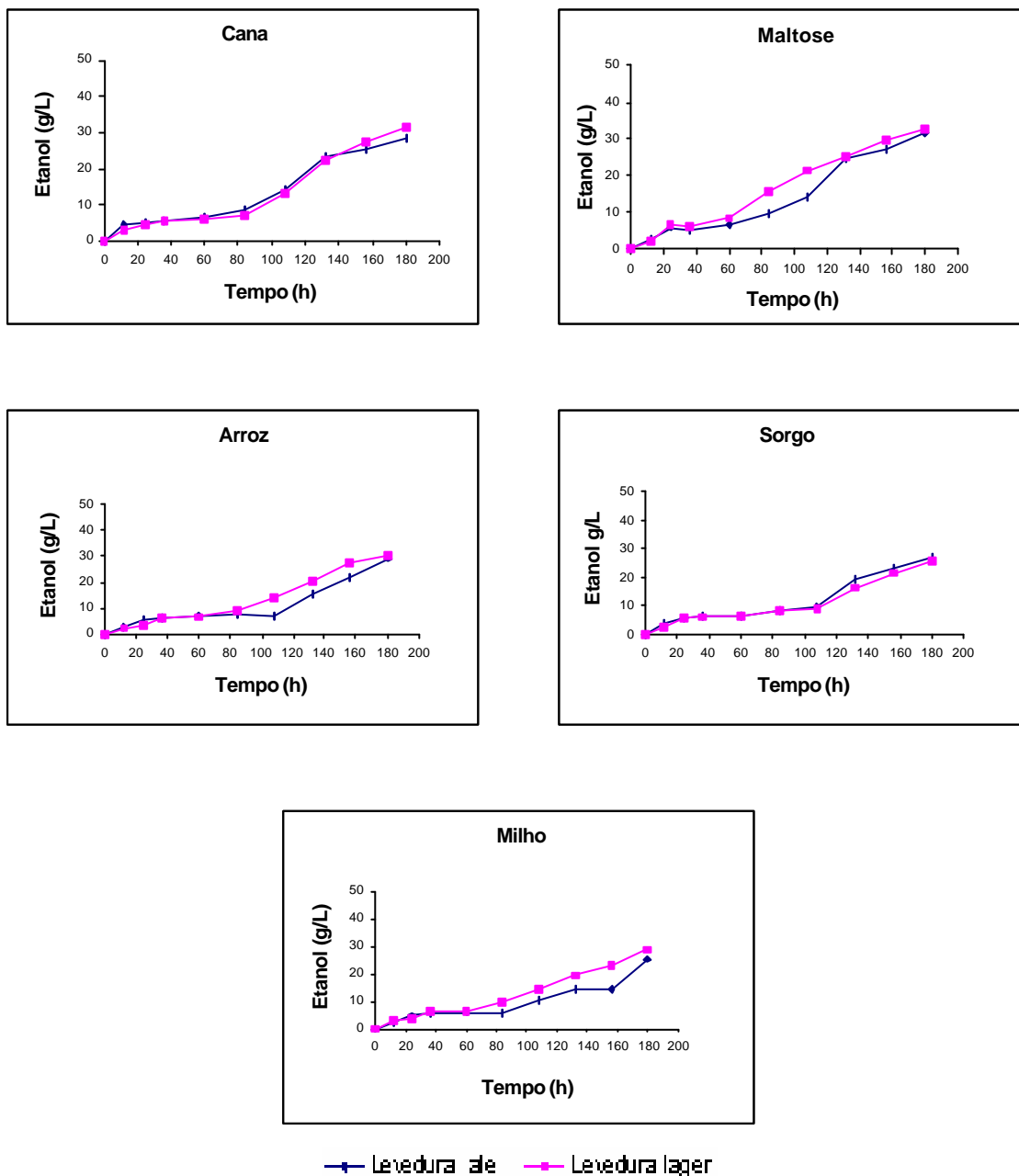


Figura 1 – Produção de etanol utilizando as leveduras *ale* e *lager* para os substratos cana, maltose, arroz, sorgo e milho.

crescimento e a multiplicação da levedura no processo cervejeiro, considerando que a maioria das linhagens de levedura usadas na cervejaria, como confirmado por WATIER (1996), tem somente tolerância moderada ao etanol. Apesar de serem indicativos de uma atividade mais elevada da levedura, altos níveis de etanol seriam prejudiciais aos propósitos do experimento.

A partir das 84 horas, quando provavelmente a quantidade de saturação em oxigênio no meio caiu (meio não-alimentado com oxigênio), foram notados para os referidos tratamentos aumentos na produção de etanol, permanecendo à medida que o oxigênio era consumido. A concentração de etanol foi elevando-se no meio, visto que esta substância é preferencialmente formada em condições de anaerobiose.

### **3.2. Determinação do glicerol**

A produção de glicerol para as duas leveduras (*ale* e *lager*) nos substratos analisados não apresentou grandes variações, se comparadas entre si, porém sendo ligeiramente maior na levedura (*ale*).

Observa-se, na Figura 2, tendência de aumento de produção desse metabólito ao longo das fermentações. Os maiores aumentos, de modo geral, foram observados a partir das 100 horas de fermentação, o que provavelmente coincide com o final do período de saturação do oxigênio dos meios e o início da fase anaróbica da levedura, que nessas condições é um importante mecanismo de balanço redox, onde o NADH é produzido citosolicamente e reoxidado pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, como afirma VICENTE (2003).

A produção de glicerol, em todos os tratamentos, não ultrapassou 2 g/L (Figura 2), pois os ensaios fermentativos foram programados para consumir 80% dos açúcares fermentecíveis, sendo interrompida as 180 horas, restando ainda 20% de açúcares fermentáveis que seriam fontes potenciais de glicerol, que possivelmente poderia atingir uma faixa maior. Sendo um constituinte não-volátil, suas concentrações são detectadas em cervejas (SILVA, 1989) na faixa de 1,5 a 3,4 g/L. Mesmo não tendo atingido o máximo da potencialidade de

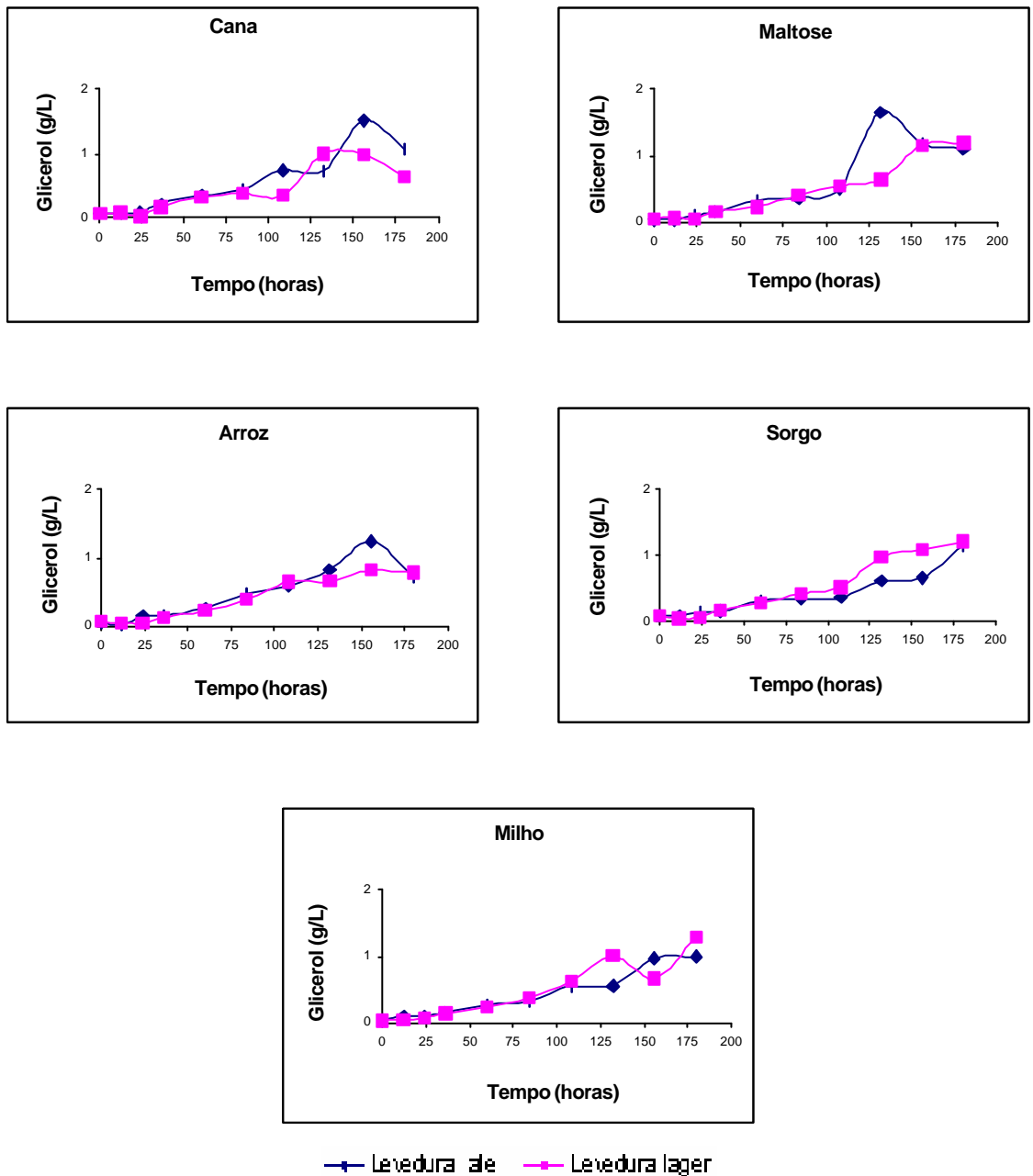


Figura 2 – Produção de glicerol utilizando as leveduras *ale* e *lager* para os substratos cana, maltose, arroz, sorgo e milho.

produção nos meios testados, pois como mencionado a fermentação não foi conduzida até o final, o glicerol produzido até o momento da interrupção pode ter participado como precursor de substâncias determinantes nas características sensoriais das cervejas, uma vez que aplicando o teste sensorial por meio da escala hedônica as diversas cervejas tiveram índices de aceitação variável. Esta hipótese está de acordo com PINTO (2004), que afirma que, dependendo da enzima envolvida, a degradação do glicerol pode conduzir à produção dos compostos como o diacetil, a acetoína ou o ácido acético, que pode alterar o sabor da cerveja.

### **3.3. Determinação do acetato**

Sendo produto do metabolismo secundário da levedura, o acetato foi excretado no meio fermentativo durante as primeiras horas, apresentando concentrações variáveis para as duas leveduras nos diferentes substratos, ao longo das fermentações, como mostra a Figura 3. Durante as primeiras 24 horas notou-se queda na produção dessa substância mais rapidamente na levedura *lager*, nos substratos xarope de *high* maltose, caldo de cana, sorgo e milho, chegando próximo de zero. Já no substrato arroz, as duas leveduras chegaram próximo de zero, em igual tempo. A partir de 24 horas, nota-se para todas as fermentações tendência de variações na produção e no consumo desse metabólito, que neste experimento caracteriza cervejas ácidas. Porém, convém lembrar que o processo fermentativo foi interrompido com 80% do consumo dos açúcares fermentáveis, ainda restando 20%, que provavelmente alteraria a concentração desse metabólito no meio. BASSO (1991) e ALVES (1994) relataram que os teores de acetato no meio dependem da intensidade do crescimento do microrganismo. Como a propagação teve uma boa evolução de biomassa nos meios testados, os índices de acetato apresentaram-se elevados. Mas, segundo os mesmos autores, essa substância é metabolizada exclusivamente pelas leveduras que o reabsorvem no final da fermentação, alterando suas concentrações, tornando-as variáveis no final da fermentação. Para ALVES

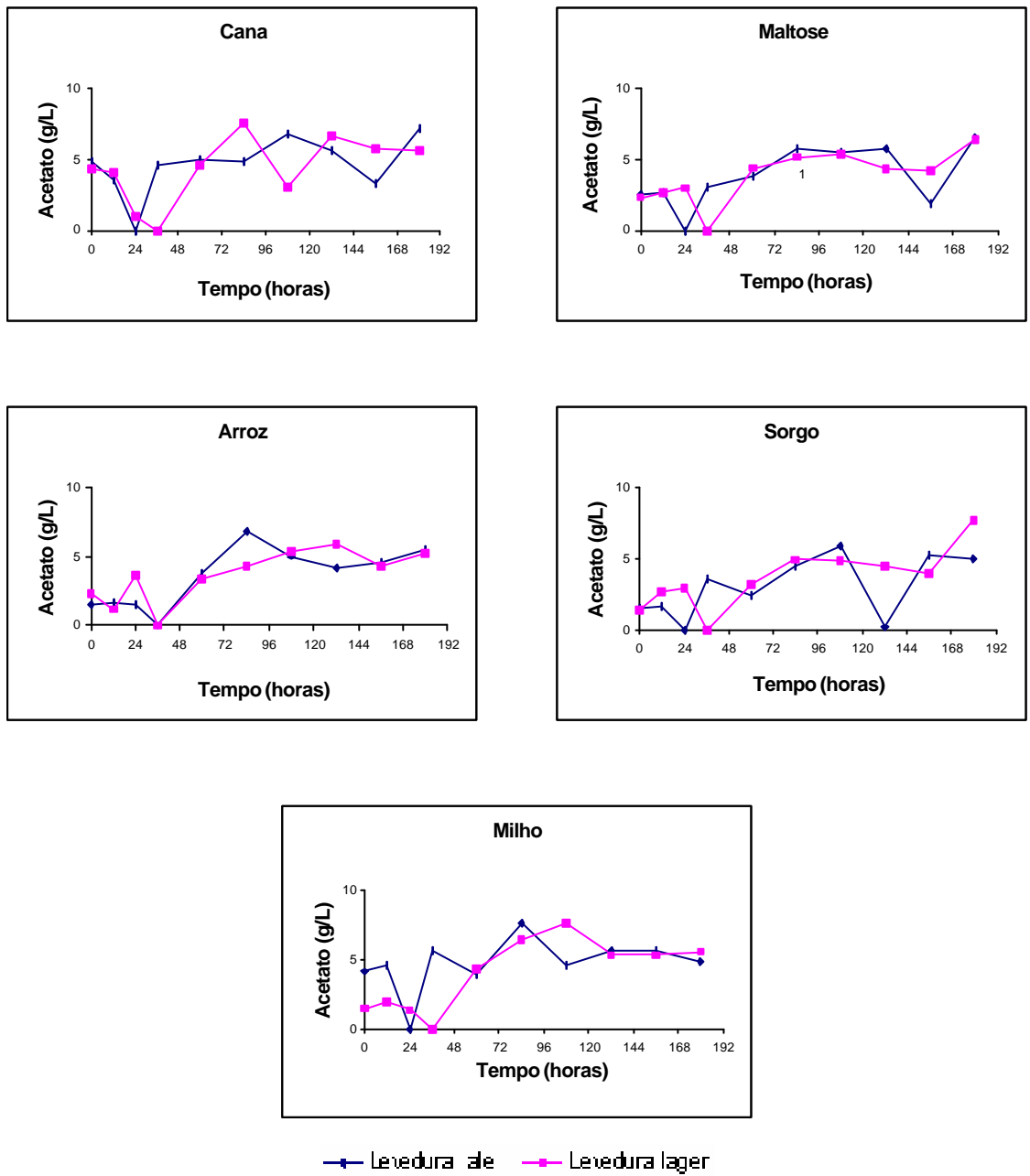


Figura 3 – Produção de acetato utilizando as leveduras *ale* e *lager* para os substratos cana, maltose, arroz, sorgo e milho.

(1994), cervejas de variadas origens raramente excedem 0,2 g/L, porém as cervejas ácidas alemãs podem atingir 2,34 g/L. Mesmo apresentando teores de acetato na faixa de 4 – 6 g/L até o momento de encerramento do processo fermentativo, que caracteriza cervejas ácidas, seria provável a diminuição desse metabólito, uma vez que existe a possibilidade de reabsorção pelo agente biológico. Testes nas cervejas acabadas teriam de ser feitos para comprovar essa hipótese.

### **3.4. Consumo de glicose**

A cinética de consumo de glicose para as duas leveduras (*ale e lager*), nos substratos testados, não apresentou grandes variações. Se comparadas entre si, nota-se um consumo mínimo até as 60 horas, o que normalmente não se observa quando a glicose é preferencialmente consumida pela levedura. Porém, de acordo com VERDUYN (1991), enquanto não existe manifestação externa da atividade metabólica estão ocorrendo diversos fenômenos fisiológicos e bioquímicos importantes, quando as próprias leveduras estão se adaptando aos meios de diferentes constituições utilizados neste experimento, ao mesmo tempo em que estão sendo sintetizados novos sistemas enzimáticos, para permitir que a levedura possa utilizar uma ampla variedade de componentes dos meios. Após as 60 horas do processo fermentativo iniciou-se um consumo acentuado de glicose, que coincidiu com o maior aumento na produção de etanol e permaneceu até as 180 horas, determinando assim o final do processo fermentativo em todos os meios testados. Essa etapa caracteriza-se pelo desprendimento volumoso e intenso de dióxido de carbono, conseqüência da existência de um número suficiente de células para desdobra dos açúcares dos meios de cultivos.

Exceção ocorreu com uso do substrato que continha caldo de cana como adjunto (complemento), onde se observou o consumo moderado até as 156 horas, intensificando-se no final de 156 a 180 horas.

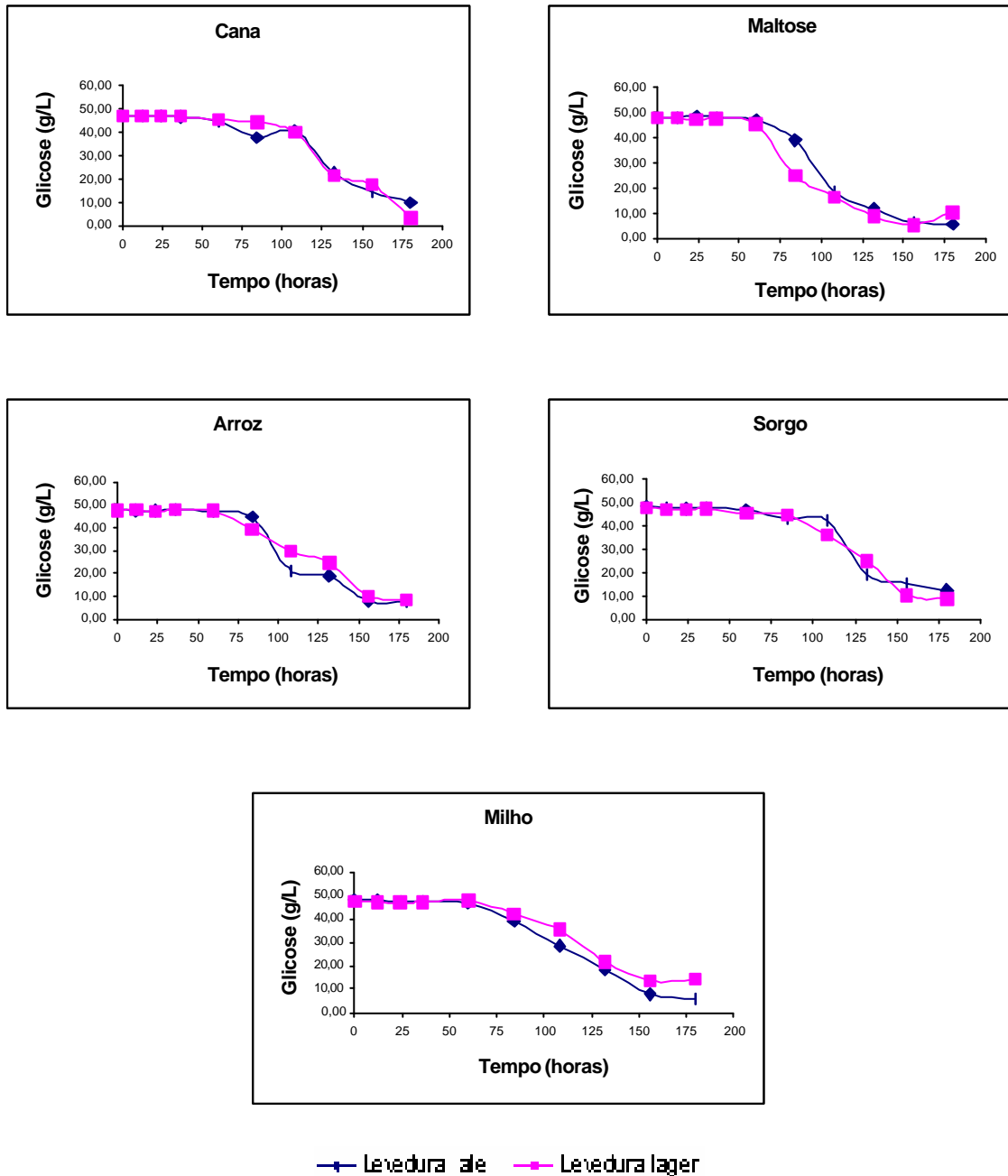


Figura 4 – Consumo de glicose utilizando as leveduras *ale* e *lager* para os substratos cana, maltose, arroz, sorgo e milho.

## 4. CONCLUSÕES

De modo geral, a produção de etanol no meio fermentativo iniciou-se entre 60 – 80 horas, período em que foram observados o maior consumo de glicose no processo e provavelmente a diminuição no suprimento de oxigênio do meio. Não existiu destaque de produção entre as leveduras testadas nos substratos utilizados, todos permanecendo em uma faixa de 27 a 32 g/L.

A produção de glicerol entre as leveduras não apresentou grandes variações, sendo ligeiramente superior na levedura *ale*.

Não houve destaque de produção do glicerol em relação aos substratos, tendo um aumento proporcional para todos os meios testados. Nas condições testadas com 80% de consumo dos açúcares fermentáveis, o glicerol já se encontrava na faixa ideal para produção de cerveja, não tendo interferência nem das cepas de levedura nem dos substratos testados na superprodução ou deficiência desse metabólito.

O acetato excretado no meio fermentativo apresentou teores variáveis para as duas espécies de leveduras nos substratos testados, com queda a zero em alguns pontos do processo para todos os meios.

Até 80% de consumo dos açúcares fermentecíveis, a tendência nas condições fermentativas testadas foi a produção de cerveja ácidas. Porém, o

acetato pode ser reabsorvido pelas leveduras no final da fermentação, diminuindo a concentração até as faixas ideais.

O consumo de glicose para todos os substratos com ambas as leveduras testadas se iniciou após as 60 horas, o que pode ser devido à adaptação da levedura aos meios de fermentação com diferentes composições. Esta tendência de consumo é compatível com as condições de processo e com a força do inóculo adotados neste experimento.

## **CAPÍTULO 3**

### **ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM CERVEJA**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Enzimas são substâncias existentes em todos os seres vivos, animais ou vegetais. São responsáveis pelas transformações bioquímicas que se realizam nos processos de vida. Podem acelerar as reações químicas até um grau predeterminado e agem como catalisadores. Portanto, não são consumidas pela reação. As enzimas são responsáveis pelo aumento das velocidades de todas as reações que ocorrem no interior das células e sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação protéica nativa (FONTES, 2003).

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, todas as enzimas são moléculas de proteínas, cuja função é reconhecer e se ligar a reagentes específicos, catalisando sua conversão em produtos (GALLO, 2000).

O estudo cinético de reações enzimáticas fornece informações básicas da reação e parâmetros que caracterizam as propriedades da enzima. Informações cinéticas podem ser usadas para diferentes aplicações de enzimas, como transformação de compostos de interesse industrial, caso da produção de cerveja.

Todos os processos de produção de bebidas pelo uso de microrganismos fermentadores baseiam-se na regulação do metabolismo celular para obtenção de produtos de alta qualidade. Assim, o estudo e a regulação do processo enzimático tendem a se tornar uma grande ferramenta de controle para processos de fabricação de bebidas alcoólicas (LEWIS e YOUNG, 1995).

No metabolismo de cada microrganismo na produção de cerveja de qualidade as enzimas são capazes de catalisar uma grande variedade de reações, entre as quais hidrólises, polimerizações, oxirreduções, desidratações, condensações aldólicas, transferências de grupos orgânicos, reações de radicais livres etc (MAGASANIK, 1992).

Na produção de cerveja com utilização de maltes, adjuntos, lúpulos e águas com características químicas diferenciadas, podem ser produzidos substratos com várias constituições, o que irá influenciar o crescimento do microrganismo, que depende do tipo de substrato em que este está crescendo e da capacidade de se adaptar ao meio, pois serão capazes de produzir enzimas específicas que podem discriminar uma dada espécie molecular numa mistura complexa (TERSCHURE et al.,1995).

A atividade das enzimas regulatórias do crescimento e a presença de metabólitos que estimulem a sua atividade ou de inibidores que procedam de forma contrária são fatores determinantes no processo cervejeiro de forma geral (DUESTER et al., 1999).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar o perfil de algumas enzimas proveniente de levedura de alta e baixa fermentação, quando cultivadas em substratos de diferentes constituições químicas. Essas enzimas são determinantes no processo cervejeiro, de forma que seus conhecimentos científicos visam elucidar o processo fermentativo e otimizar a qualidade do produto, com finalidades científicas e comerciais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As determinações enzimáticas foram realizadas no Laboratório de Fermentações do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG e no Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas – NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG.

### 2.1. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína das amostras foi realizada com base no método de LOWRY et al. (1951).

Proteína produzida:

$$\text{Conc.de proteína} = \frac{\hat{\lambda}_y + 0,0873}{0,103}$$

em que

$\hat{\lambda}_p$  = leitura de absorvância em espectrofotômetro;

Proteína =  $(\hat{\lambda}_p + b)/a$ ;

$$y = ax + b;$$

a e b = são fatores calculados a partir da equação da regressão linear da curva-padrão padronizada para o aparelho COBAS-FARA, naquelas condições de trabalho.

## 2.2. Ensaio enzimáticos

As atividades enzimáticas foram calculadas pela fórmula descrita a seguir, usando como coeficiente de extinção 6,22, volume no ensaio de 250 µl e volume do extrato de 50 µl para os substratos em um tempo de incubação de 10 minutos.

- Atividade enzimática específica:

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta \text{inclinação} \times \text{volume no ens}}{\text{vol. extrato} \times \text{coef. extinção} \times [\text{proteína}]}$$

em que

$\Delta_{\text{inclinação}}$  = diferença de inclinação das curvas-padrão do branco e da amostra.

Obs.: A inclinação das curvas padrão do branco e da amostra são obtidas pela regressão linear dos dados da leitura do espectrofotômetro do aparelho COBAS-FARA (Roche).

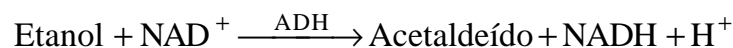
### 2.2.1. Preparo de extratos celulares

Foram retirados 30 mL de amostra de cada substrato inoculado e em processo de fermentação a cada 6 horas, durante as primeiras 36 horas e de 24 em 24 horas, até a atenuação chegar a 80% dos açúcares fermentáveis. As amostras (2.500 g) foram centrifugadas por 10 minutos, a 4°C. Após o descarte do sobrenadante o sedimento celular foi ressuspenso em 30 mL de solução

gelada de NaCl 0,9%. A amostra foi novamente centrifugada; o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspense em 0,5 mL de tampão imidazole (Imidazol 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 40 mM, KCl 400 mM, pH 7) e transferido para tubos de ensaio contendo 0,5g de pérolas de vidro em cada tubo. As células foram rompidas por agitação em vortex (3 x 90 segundos), com repouso em gelo nos intervalos de agitação. Após esse procedimento adicionou-se 0,5 mL do tampão imidazol em cada tubo. O sobrenadante foi transferido para tubos plásticos de 1,8 mL, que foram colocados em microcentrífugas e centrifugados por 10 minutos a 3.500 rpm, sobre refrigeração. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em temperatura de -20°C até o momento da dosagem (SALGADO et al., 2002).

### **2.2.2. Determinação da atividade da álcool desidrogenase**

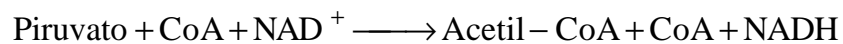
A atividade da álcool desidrogenase (E.C. 1.1.1.1) foi determinada como descrito por WORONICK (1975), através do aumento de absorbância a 340 nm a 20°C (em aparelho espectrofométrico COBAS-FARA (Roche), após a descarboxilação do piruvato, seguida da redução do aldeído acético a etanol pelo NADH (reação abaixo). A mistura de reação constitui-se dos reativos-tampão glicina 0,1 M, pH 10, 0, NAD 1,0 mg/mL, solução de etanol 1%. A análise da atividade enzimática está baseada na determinação da redução do NAD<sup>+</sup>.



### **2.2.3. Determinação da atividade da piruvato desidrogenase**

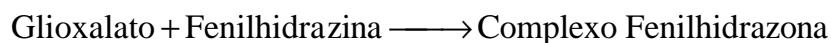
Através da utilização dos extratos obtidos, foi determinada a dosagem do complexo piruvato desidrogenase, como descrito por HARADA e HIRABAYASHI (1982). O complexo multienzimático consta de: piruvato desidrogenase (E.C. 1.2.4.1) e dihidrolipoato trasacetilase (E.C. 1.3.1.12),

dihidrolipoato desidrogenase (E.C.1.6.4.3). A atividade desse complexo foi determinada pelo aumento de absorbância a 340 nm 20°C (em aparelho espectrofométrico COBAS-FARA (Roche)), através da produção de acetil CoA e da quantidade de NADH formado (reação descrita a seguir), que é proporcional a concentração do complexo multienzimático. A mistura do sistema de reação foi constituída de: tampão Tris/HCl 0,3 M, pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 0,01 M, coenzima A 8,0 mM, L-cisteína 0,2 M, NAD<sup>+</sup> 10 mM, TPP 10mM e piruvato de sódio 0,1 M.



#### **2.2.4. Determinação da atividade da isocitrato liase**

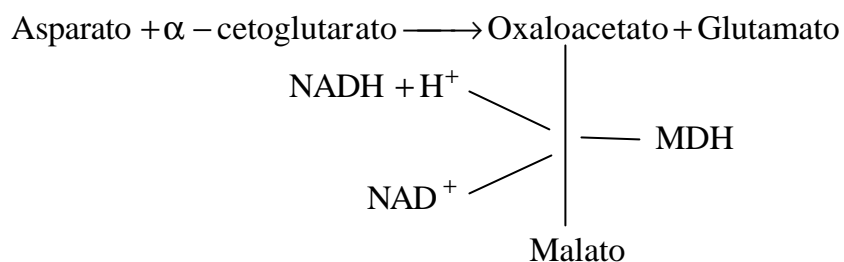
Para determinar a atividade da isocitrato liase (E.C. 4.1.3.1) utilizou-se a metodologia descrita por McFADDEN e HOWES, (1960), que está fundamentada na propriedade que possui a fenilhidrazina de formar complexos com aldeídos e ácido glioxílico (reação a seguir). A mistura do sistema de reação foi constituída de tampão tris/HCl 0,14 M, pH 7,5, MgSO<sub>4</sub> 5,0 mM, cisteína 20 mM, isocitrato 4,0 mM, fenilhidrazina 1%. A determinação da combinação glioxalato/fenilhidrazona foi feita pelo aumento de absorbância a 340 nm a 20 °C (em aparelho espectrofométrico COBAS-FARA (Roche)).



#### **2.2.5. Determinação da atividade da fosfofrutoquinase**

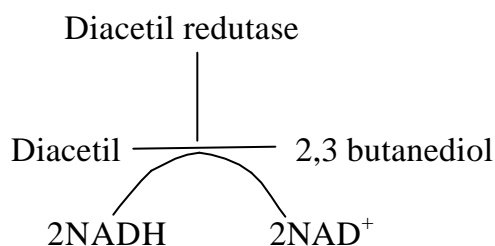
Os extratos obtidos foram utilizados para dosagem da atividade da fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11). A atividade da PFK foi determinada como





### 2.2.7. Determinação da atividade da diacetil redutase

A dosagem da atividade da diacetil redutase foi determinada segundo a metodologia descrita por STORMER (1975), que é baseada na determinação da redução irreversível do diacetil por meio da oxidação do NADH, quantificado através da adsorbância em aparelho espectrofotométrico COBAS-FARA (Roche) a 340 nm, a 20°C. Na mistura da reação foram utilizados: diacetil 0,1 M, NADH 0,5 mM e tampão fosfato 1,0 M, pH 5,8.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma característica muito importante para que uma levedura seja utilizada no processo fermentativo é a capacidade fermentativa. Uma das formas de verificar esse parâmetro é a dosagem enzimática. Portanto, duas leveduras de alta fermentação (*ale*) (*Saccharomyces cerevisiae*) e de baixa fermentação (*lager*) (*Saccharomyces carlsbergensis*) foram testadas nos substratos, contendo como complemento do malte caldo de cana, xarope de *high* maltose, arroz, sorgo e milho, submetidos à dosagem enzimática através dos seus extratos intracelular.

Foram testadas as enzimas: álcool desidrogenase, piruvato desidrogenase, isocitrato liase, fosfofrutoquinase, glutamato oxaloacetato transaminase e diacetil redutase.

#### 3.1. Álcool desidrogenase

Analisando as Figuras 1, 3, 5, 7 e 9, observa-se que as atividades da álcool desidrogenase caracterizam-se na levedura de alta fermentação (*ale*) por aparecimento de picos de produção a partir das 12 horas e após 100 horas do início da fermentação, voltando a cair próximo de zero nos substratos xarope de *high* maltose, sorgo e milho, com maiores picos de produções alcançando 1.438, 1.903 e 1.482,6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, respectivamente. Nos substratos caldo de

cana e arroz os picos de aumentos só apareceram a partir das 24 horas e após 100 horas do início da fermentação, atingindo atividade máxima de 1.196 e 1.027  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, respectivamente, que coincide com a fase de início de maior crescimento do fermento.

Observando as Figuras 2, 4, 6, 8 e 10, verifica-se que com a utilização da levedura de baixa fermentação (*lager*) a atividade da álcool desidrogenase apresentou algum aumento durante o crescimento celular, porém bem menor que a de alta fermentação, apresentando picos a partir das 12 horas, seguidos de diminuições durante o processo para todas as fermentações. A maior atividade foi observada com picos de aumentos nos substratos caldo de cana e milho, sendo 436 e 273  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, respectivamente.

Apesar de ocorrerem grandes diferenças nas atividades específicas da álcool desidrogenase entre as leveduras utilizadas e o aparecimento de picos com maior aumento de produção em alguns substratos testados, verifica-se que não houve influências na produção de etanol. Para RATLEDGE (1991), BADZIONG et al. (1999) e MAUGARD et al. (2001) e a atividade dessa enzima está conectada diretamente à concentração de oxigênio (que foi igual para todos os testes), à fonte de carbono (diferentes em relação aos substratos testados) e ao etanol dissolvido, que é o produto da via metabólica. Segundo Lutstorf e Megnet, citados por SILVA (1989), as atividades dessa enzima estão relacionadas com formas de ADH diferentes e essa diferença ocorre em função da espécie de substrato utilizado, da mobilidade eletroforética, da estabilidade ao aquecimento, dos valores de Km em relação ao etanol, acetaldeído, do NAD e NADH<sub>2</sub>.

Os níveis de etanol mantiveram-se com aumento ao longo de todas as fermentações, chegando na faixa de 25 a 32 g/L para todos os substratos testados, o que, provavelmente, prediz que é necessário apenas pequenas quantidades dessa enzima para chegar a um nível aceitável dessa substância na bebida.

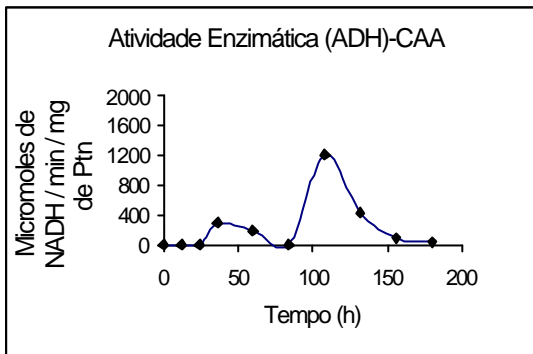


Figura 1 – Atividade específica da álcool desidrogenase para levedura *ale* no substrato com caldo de cana.

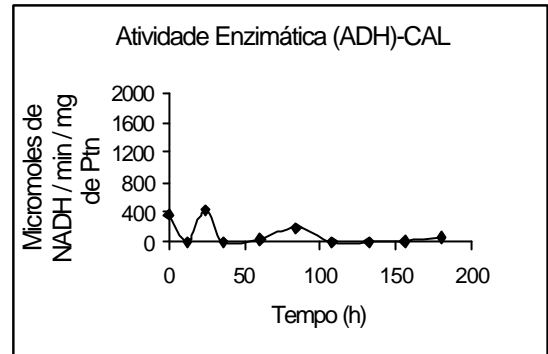


Figura 2 – Atividade específica da álcool desidrogenase para levedura *lager* no substrato com caldo de cana.

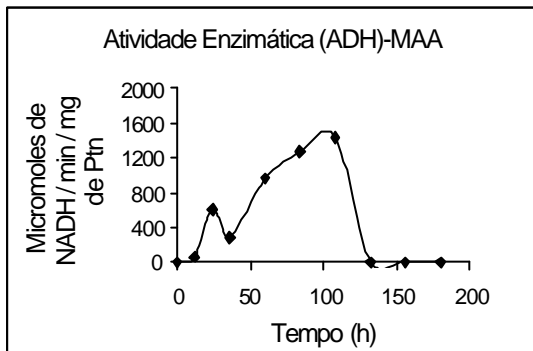


Figura 3 – Atividade específica da álcool desidrogenase para levedura *ale* no substrato com maltose.

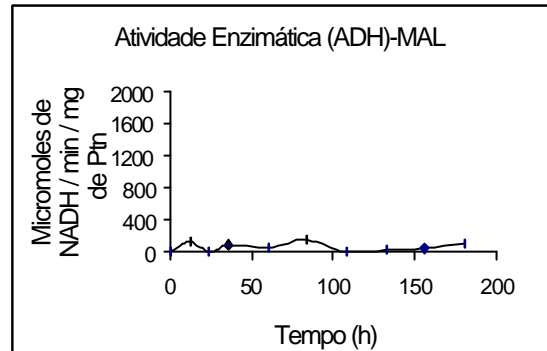


Figura 4 – Atividade específica da álcool desidrogenase para levedura *lager* no substrato com maltose.

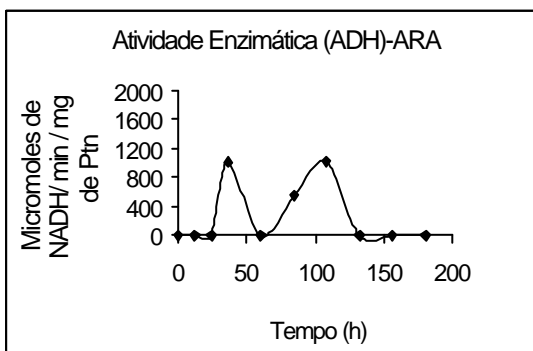


Figura 5 – Atividade específica da álcool desidrogenase para levedura *ale* no substrato com arroz.

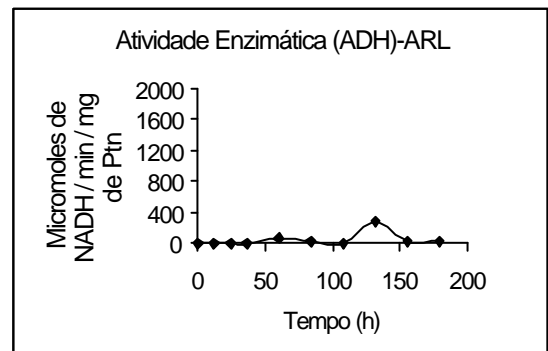


Figura 6 – Atividade específica da álcool desidrogenase para levedura *lager* no substrato com arroz.

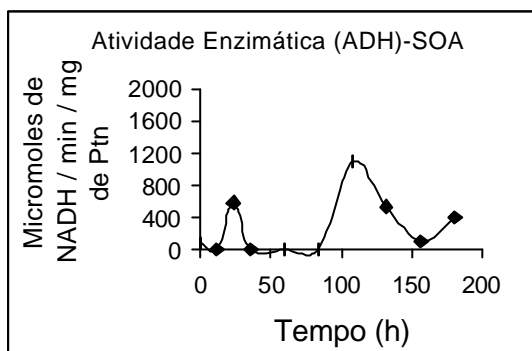


Figura 7 – Atividade específica da álcool desidrogenase para levedura *ale* no substrato com sorgo.

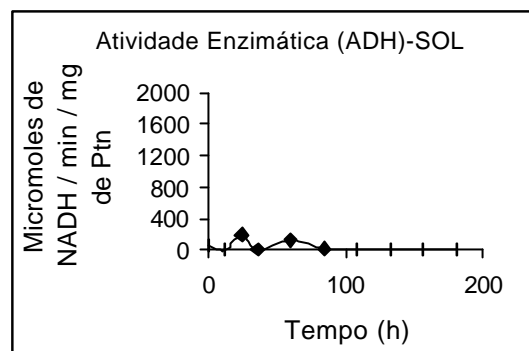


Figura 8 – Atividade específica da álcool desidrogenase para levedura *lager* no substrato com sorgo.

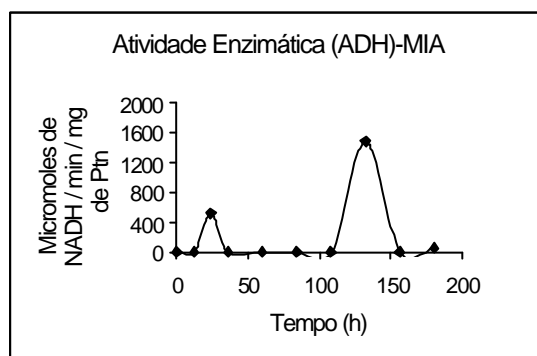


Figura 9 – Atividade específica da álcool desidrogenase para levedura *ale* no substrato com milho.

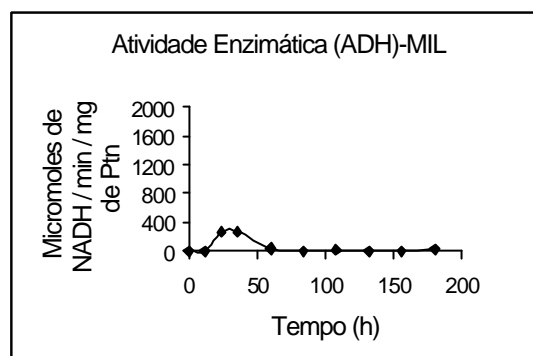


Figura 10 – Atividade específica da álcool desidrogenase para levedura *lager* no substrato com milho.

### 3.2. Piruvato desidrogenase

A atividade específica da piruvato desidrogenase para levedura de alta fermentação (Figuras 11, 13, 15, 17 e 19) apresentou aumentos logo no início das fermentações para todos os substratos com picos às 12 horas, tendo as maiores atividades específicas sido observadas com utilização dos substratos maltose e sorgo, sendo 692 e 606  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, respectivamente. Ao longo das fermentações caracterizou-se por picos de produção às 60 e 84 horas e diminuições até próximo de zero, que permaneceu nos substrato milho, sorgo e cana até o final das fermentações. Nos substratos maltose e arroz observaram-se novos picos de produção no final das fermentações.

Essas atividades específicas maiores nas primeiras horas de fermentação caracterizam uma biossíntese da enzima mais elevada no período em que o meio ainda se encontra com grande quantidade de oxigênio, favorecendo as condições de propagação da levedura, tendo uma transformação maior de piruvato a acetil CoA que, segundo PIERCE (1987), permite a alimentação do ciclo de Krebs e a formação de compostos energéticos para as funções anabólicas, como também a síntese de lipídeos e precursores da síntese de aminoácidos. A maior parte do piruvato se dirige para o ciclo do ácido cítrico e depois para a cadeia transportadora de elétrons, onde, nessa via de aerobiose, pode-se extrair muito mais energia.

Analogamente à levedura de alta fermentação, a levedura de baixa fermentação apresentou tendência de aumento (Figuras 12, 14, 16, 18 e 20), com picos iniciais nas primeiras 12 horas, porém menores em atividades específicas nos substratos cana, maltose, arroz e sorgo. A partir desse ponto existe tendência de queda até próximo de zero para esses substratos, voltando a aumentar com picos as 60 e 84 horas. Os maiores picos de atividade específica dessa enzima foram alcançados na levedura *lager* com uso de arroz e caldo de cana, sendo 628 e 602  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, respectivamente.

Na fermentação com substrato milho observa-se que não houve grandes aumentos de atividade até 60 horas, só podendo ser notado aumentos com picos às 84 horas, seguidos de diminuições até próximo de zero.

A atividade específica da piruvato desidrogenase na levedura de alta fermentação (*ale*) apresentou-se globalmente superior nos substratos testados. Essa levedura possivelmente tenha uma atividade condicionada pela necessidade de maior síntese de metabólitos intermediários do ciclo de Krebs, que serão utilizados na formação de substâncias responsáveis pelas características sensoriais da cerveja em processo, como: álcool superior e ésteres, segundo MONTGOMERY et al. (1980). A diferenciação pode ter ocorrido pela característica fisiológica diferenciada das leveduras testadas diante de meios de composições químicas variadas, tendo em vista que as condições físicas eram iguais para as duas leveduras.

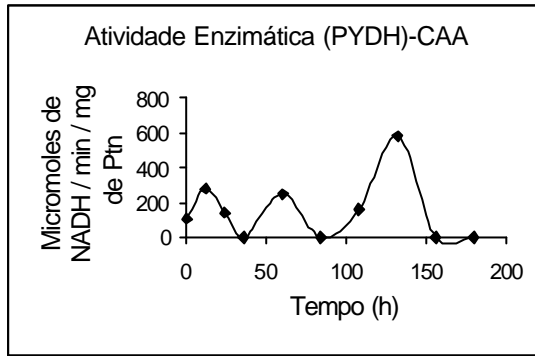


Figura 11 – Atividade específica da piruvato desidrogenase para levedura *ale* no substrato com caldo de cana.

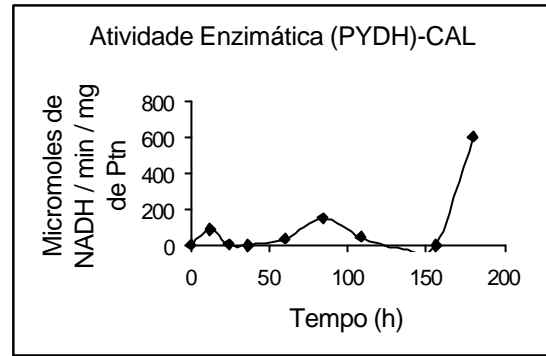


Figura 12 – Atividade específica da piruvato desidrogenase para levedura *lager* no substrato com caldo de cana.

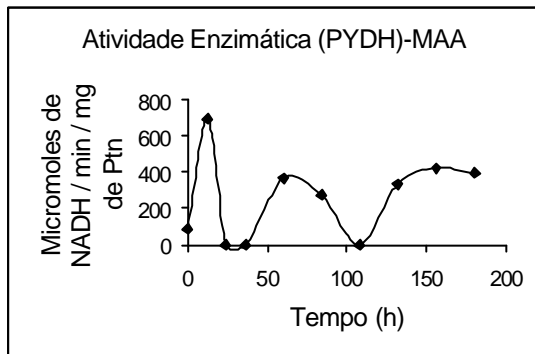


Figura 13 – Atividade específica da piruvato desidrogenase para levedura *ale* no substrato com maltose.

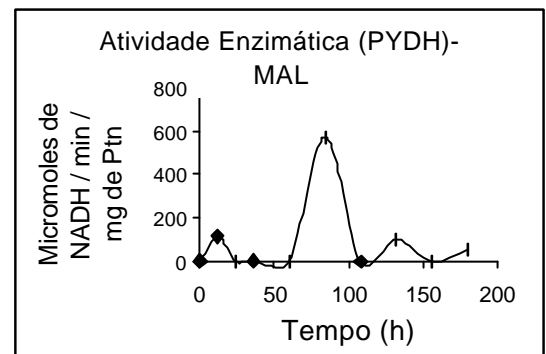


Figura 14 – Atividade específica da piruvato desidrogenase para levedura *lager* no substrato com maltose.

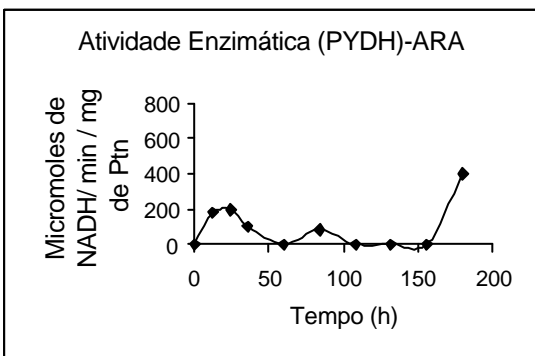


Figura 15 – Atividade específica da piruvato desidrogenase para levedura *ale* no substrato com arroz.

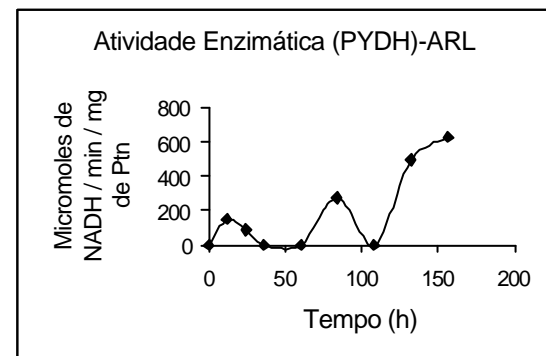


Figura 16 – Atividade específica da piruvato desidrogenase para levedura *lager* no substrato com arroz.

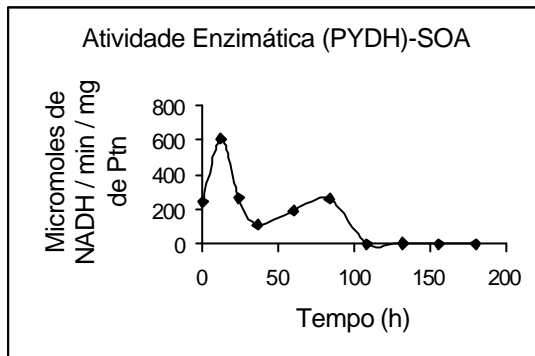


Figura 17 – Atividade específica da piruvato desidrogenase para levedura *ale* no substrato com sorgo.

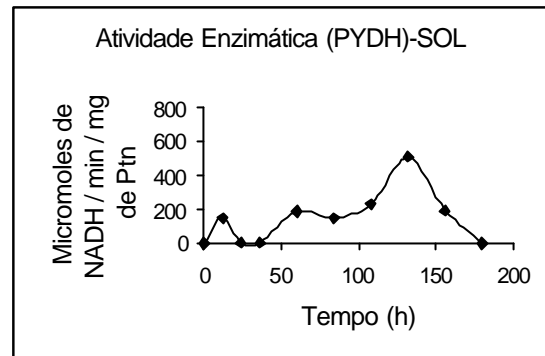


Figura 18 – Atividade específica da piruvato desidrogenase para levedura *lager* no substrato com sorgo.

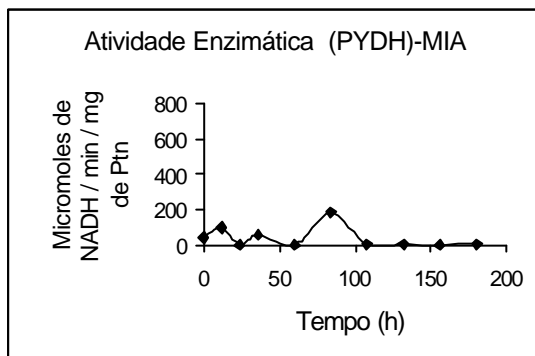


Figura 19 – Atividade específica da piruvato desidrogenase para levedura *ale* no substrato com milho.

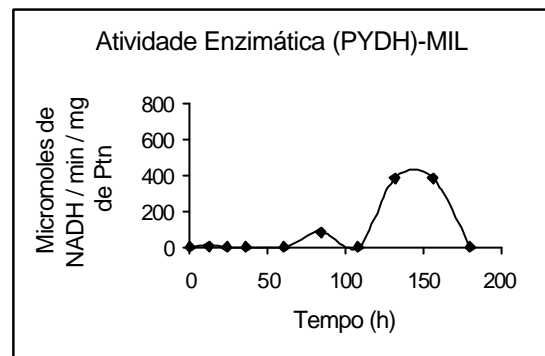


Figura 20 – Atividade específica da piruvato desidrogenase para levedura *lager* no substrato com milho.

### 3.3. Isocitrato liase

Observando as Figuras 21, 23, 25, 27 e 29, que mostram os perfis da isocitrato liase com a utilização da levedura de alta fermentação, nota-se que a enzima tem tendência de aumento durante as primeiras horas de fermentação, seguido de queda até próximo de zero, com novos aumentos ao longo das fermentações, para todos os substratos. As maiores atividades específicas foram alcançadas nos substratos caldo de cana, xarope de *high* maltose, arroz e sorgo, com picos chegando a 399, 329, 189, 357  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, respectivamente. No substrato milho com a mesma levedura, a atividade ficou muito abaixo das

observadas nos outros substratos, tendo uma atividade inicial mais elevada e caindo ao longo do processo. A maior atividade foi às 12 horas, chegando a 110  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn.

Com a utilização da levedura de baixa fermentação (*lager*) nas fermentações, os perfis enzimáticos (Figuras 22, 24, 26, 28 e 30) demonstraram que no início das fermentações a atividade específica da isocitrato liase foi baixa, tendo picos de produção às 12 horas, seguidos de diminuições até próximo de zero para os substratos xarope de *high* maltose, arroz e sorgo. Ao longo dessas fermentações as maiores atividades foram obtidas no final do processo fermentativo, para os substratos xarope de *high* maltose às 180 horas 533  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn e o substrato arroz às 156 horas 545  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn; com substrato sorgo a maior atividade específica foi alcançada com aparecimento de pico de produção no meio da fermentação às 84 horas 374  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn. Já com uso dos substratos caldo de cana e milho para mesma levedura, a atividade específica inicial foi baixa, tendo as maiores atividade às 60 horas, 433  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, e 132 horas, 264  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, respectivamente.

Com o aumento das atividades específicas nos referidos substratos testados, o desvio do ciclo do glioxalato fica evidenciado ao longo das fermentações, traduzindo a maior necessidade de ativação da via de biossíntese dos intermediários do ciclo de Krebs por condensação da acetil CoA ( $\text{C}_2 + \text{C}_2$ ), quando os índices de glicose não iriam causar mais repressão do ciclo do glioxalato. Segundo DUNTZE et al. (1969), quando o meio fermentativo é rico em glicose o ciclo do glioxalato é reprimido, conseqüentemente os intermediários do ciclo de Krebs são sintetizados a partir da carboxilação do piruvato, reação catalisada pela piruvato carboxilase.

Nos substratos de picos com maior atividade com a implementação do ciclo do glioxalato, e traduzindo a necessidade de metabólitos intermediários de biossíntese, obtém-se uma via glicolítica com atividade mais fraca, o que é também afirmado por SILVA (1989), devendo-se destacar que foi detectada em alguns substratos pelas baixas atividades de enzima reguladora da via glicolítica.

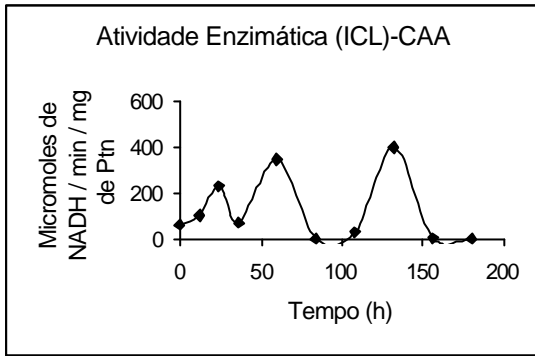


Figura 21 – Atividade específica da isocitrato liase para levedura *ale* no substrato com caldo de cana.

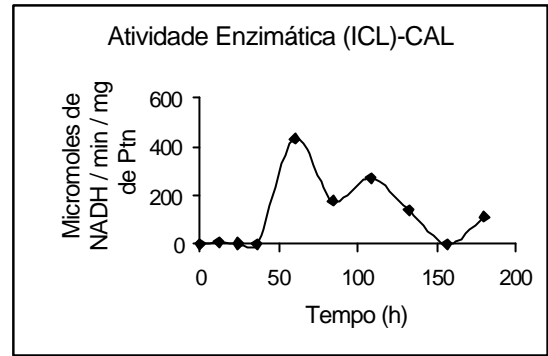


Figura 22 – Atividade específica da isocitrato liase para levedura *lager* no substrato com caldo de cana.

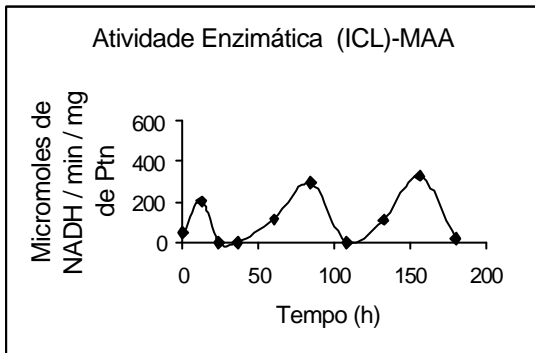


Figura 23 – Atividade específica da isocitrato liase para levedura *ale* no substrato com maltose.

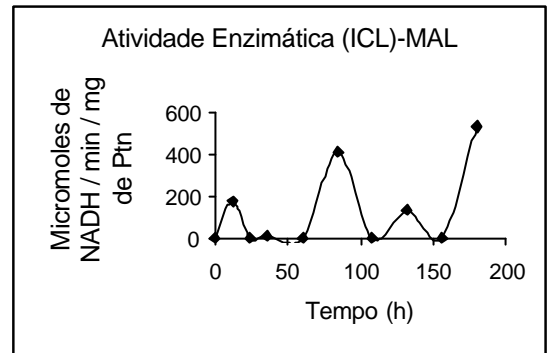


Figura 24 – Atividade específica da isocitrato liase para levedura *lager* no substrato com maltose.

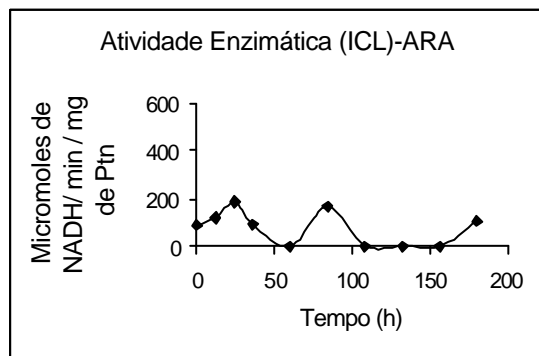


Figura 25 – Atividade específica da isocitrato liase para levedura *ale* no substrato com arroz.

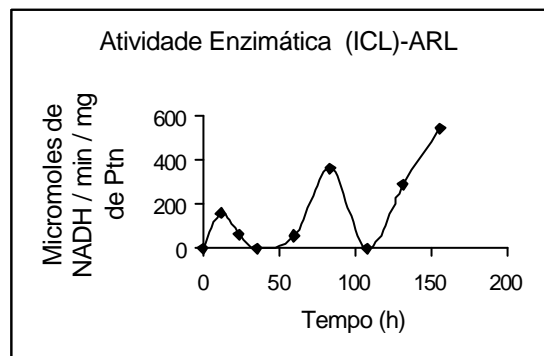


Figura 26 – Atividade específica da isocitrato liase para levedura *lager* no substrato com arroz.

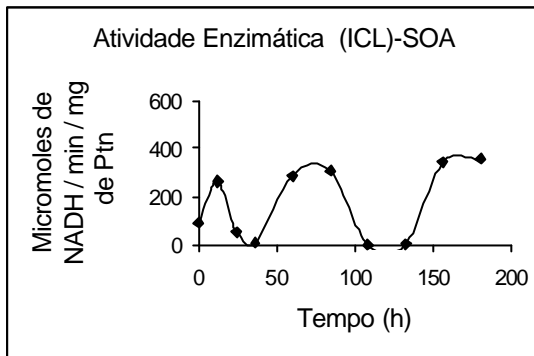


Figura 27 – Atividade específica da isocitrato liase para levedura *ale* no substrato com sorgo.

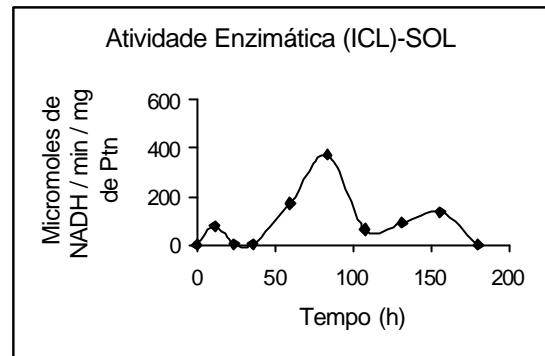


Figura 28 – Atividade específica da isocitrato liase para levedura *lager* no substrato com sorgo.

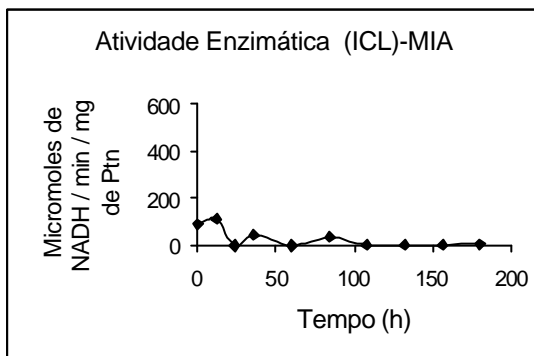


Figura 29 – Atividade específica da isocitrato liase para levedura *ale* no substrato com milho.

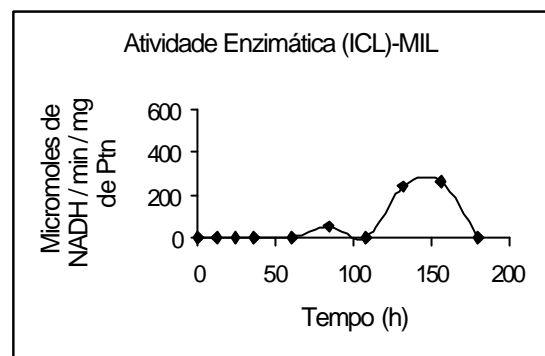


Figura 30 – Atividade específica da isocitrato liase para levedura *lager* no substrato com sorgo.

### 3.4. Fosfofrutoquinase

As curvas de evolução da atividade específica da fosfofrutoquinase não apresentaram comportamento homogêneo nas fermentações. As atividades específicas nos extratos adquiridos da levedura de alta fermentação (*ale*) (Figuras 31, 33, 35, 37 e 39) apresentaram para o substrato caldo de cana e xarope de *high* maltose baixa atividade específica no início das fermentações, permanecendo assim ao longo do processo, só aumentando no final da fermentação a partir das 108 horas, com maiores atividades de 132  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn para cana e 197  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn para o xarope de *high* maltose. Os outros substratos

(amiláceos) utilizados (arroz, sorgo e milho) apresentaram, de modo geral, maiores atividades específicas nas horas iniciais, quando comparados aos açucarados (caldo de cana e maltose). O arroz e o milho, após 12 horas do processo fermentativo, tiveram tendência de queda com posterior aparecimento de picos de produção, tendo as maiores atividades específicas 132 horas para o arroz com 562  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn e 156 horas para o milho com 199  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn. Para o substrato sorgo observou-se aumento inicial da enzima, seguido de picos de produção com diminuições até próximo de zero, tendo a maior atividade às 12 horas com 317  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn.

Com o cultivo da levedura *lager* (Figuras 32, 34, 36, 38 e 40) nos substratos caldo de cana, xarope de *high* maltose, arroz e sorgo, a atividade específica da fosfofrutoquinase foi baixa até a metade do processo, só aparecendo picos com maiores produções da enzima após 100 horas do processo, devendo ser ressaltado que nos substratos caldo de cana, arroz e sorgo esses aumentos foram seguidos de diminuições até próximo de zero. Os maiores picos de produções dessa enzima no substrato caldo de cana foi às 156 horas com 101  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, no arroz às 108 horas com 462  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn e no xarope de *high* maltose às 180 horas com 260  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn. Apesar de o substrato milho apresentar picos no início, meio e final da fermentação, a atividade específica foi baixa, com maior produção às 60 horas com 167  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn.

Os picos de atividades específicas mais elevados nos substratos testados indicam atividades glicolíticas mais acentuadas, com potencial de produção de metabólitos-chaves, que serão posteriormente utilizados como suporte para manutenção de outras vias e produção de substâncias importantes no anabolismo da célula, que podem influenciar a característica do produto final.

Apesar de os picos de produção indicarem a capacidade de fluxo dessa via, em um determinado sentido com produção de substância, esse fato não causou alteração na produção de etanol e glicerol, que permaneceram com aumentos uniformes ao longo do processo e em níveis compatíveis com os determinados para cerveja *pilsen*, que é de 2 a 4,5% de etanol, segundo a

AMBEV (2003), e de 1,5 a 3,4% de glicerol, segundo SILVA (1989) e OMORI et al. (1996), para comercialização.

Para MADSEN (2004), sendo ponto de controle na via glicolítica a fosfofrutoquinase pode ter sua atividade específica aumentada alostericamente, o que pode ser importante na fase de crescimento em limitações de alguns compostos. Outros metabólitos ligados diretamente à via glicolítica teriam de ser determinados para comprovar o aumento do fluxo alostericamente dessa enzima, nos experimentos realizados.

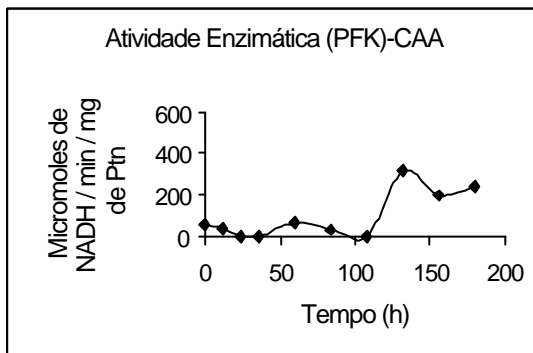


Figura 31 – Atividade específica da fosfofrutoquinase para levedura *ale* no substrato com caldo de cana.

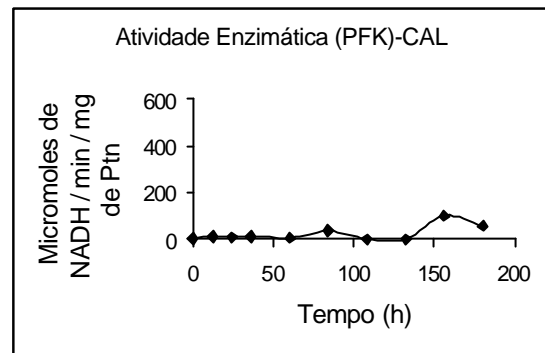


Figura 32 – Atividade específica da fosfofrutoquinase para levedura *lager* no substrato com caldo decana.

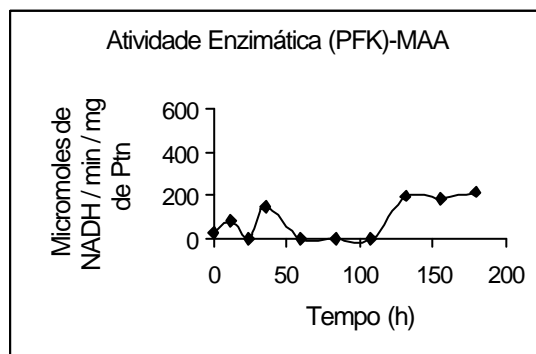


Figura 33 – Atividade específica da fosfofrutoquinase para levedura *ale* no substrato com maltose.

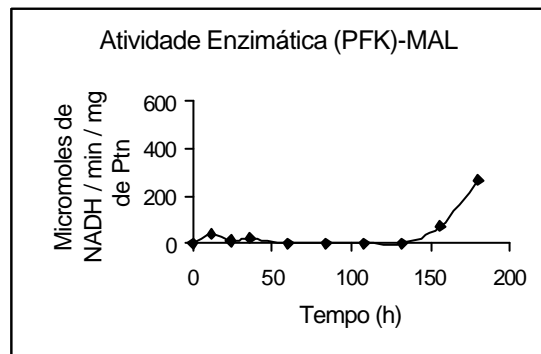


Figura 34 – Atividade específica da fosfofrutoquinase para levedura *lager* no substrato com maltose.

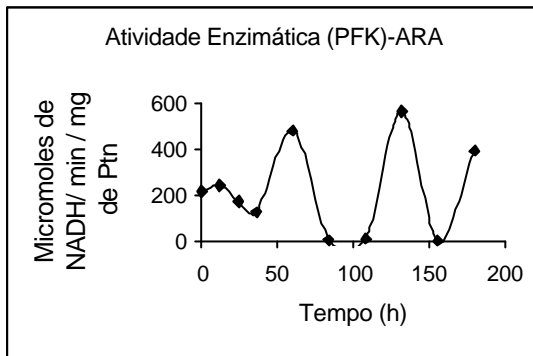


Figura 35 – Atividade específica da fosfofrutoquinase para levedura *ale* no substrato com arroz.

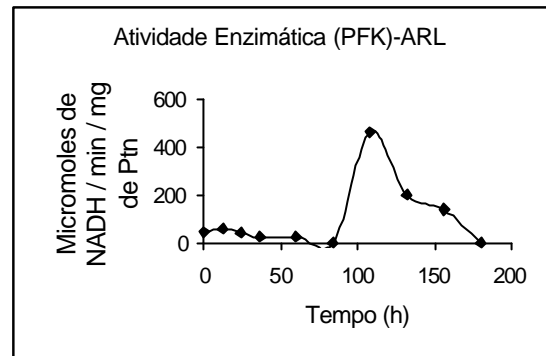


Figura 36 – Atividade específica da fosfofrutoquinase para levedura *lager* no substrato com arroz.

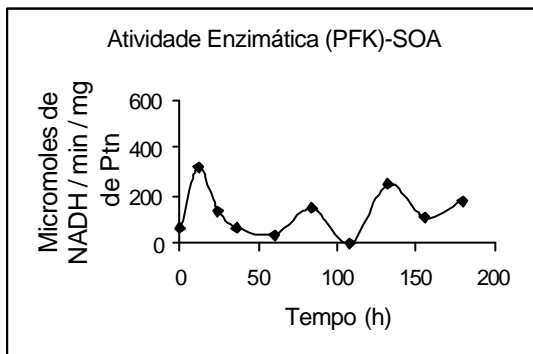


Figura 37 – Atividade específica da fosfofrutoquinase para levedura *ale* no substrato com sorgo.

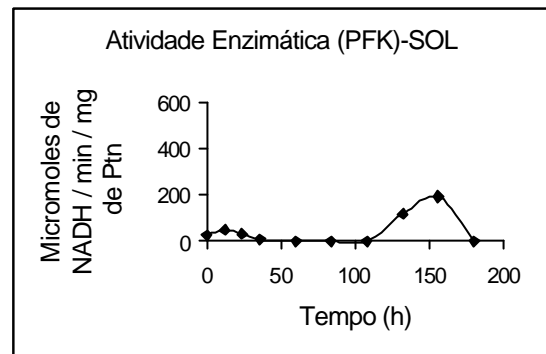


Figura 38 – Atividade específica da fosfofrutoquinase para levedura *lager* no substrato com sorgo.

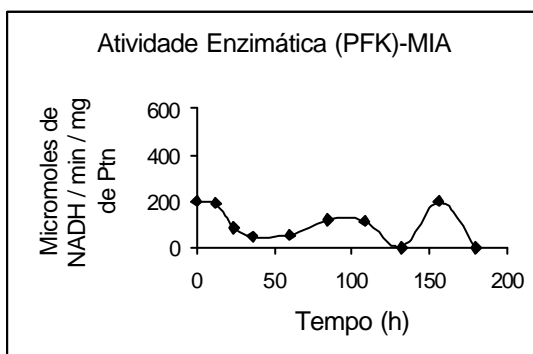


Figura 39 – Atividade específica da fosfofrutoquinase para levedura *ale* no substrato com milho.

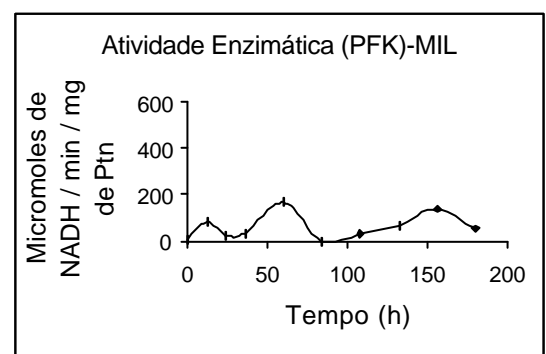


Figura 40 – Atividade específica da fosfofrutoquinase para levedura *lager* no substrato com milho.

### 3.5. Glutamato oxaloacetato transaminase

Na análise dos perfis enzimáticos (Figuras 41, 43, 45, 47 e 49) obtidos dos extratos da levedura de alta fermentação, foram constatadas variações nas atividades específicas ao longo das fermentações. Inicialmente, com o uso de substrato caldo de cana, a atividade da glutamato oxaloacetato transaminase manteve-se baixa, com tendência a aumentar, chegando ao máximo pico de produção às 84 horas, 602  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn; para o substrato xarope de *high* maltose dois picos de produção ficaram caracterizados, um às 12 horas iniciais com 611  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn e o outro no final, às 156 horas, com 769  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn. No decorrer do processo a atividade permaneceu baixa. Com o uso do substrato arroz observou-se um aumento inicial, chegando ao maior pico de produção às 60 horas, com 335  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, seguido de atividades menores até o final. Para o substrato sorgo a atividade específica manteve-se baixa, porém com dois picos maiores de produção às 12 horas com 239  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn e 156 horas com 229  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn. Utilizando o milho como substrato, ocorreram picos de produção às 12 e 60 horas, com decréscimo próximo de zero, sendo a maior produção enzimática ocorrido no final da fermentação, às 156 horas, com 637  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn.

Com o uso da levedura *lager* nos referidos substratos a atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase apresentou-se ligeiramente inferior às alcançadas pela levedura *ale*. Nos substratos caldo de cana, arroz, sorgo e milho não foram observados grandes aumentos antes das 36 horas, período após o qual no substrato caldo de cana as atividades máximas atingidas foram às 108 horas com 370  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, seguidas de diminuições até próximo de zero. Com o substrato arroz observou-se a maior produção às 60 horas com 489  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn e às 180 horas com 348  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn. Para o substrato sorgo os maiores aumentos foram registrados graficamente às 60 horas, com 242  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, seguidos de diminuições, e com substrato milho ao longo do processo foram verificadas apenas pequenas

variações, apresentando atividades específicas com picos de produção bem menores. Se comparados aos outros substratos utilizados, a máxima atividade com esse substrato foi às 36 horas, com 122  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn). Já com o substrato xarope de *high* maltose foram observados picos com maior produção às 12 horas, 376  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn.

A atividade da glutamato oxaloacetato transaminase apresentou-se bastante variável para as duas leveduras testadas, em todos os substratos. A diminuição da atividade durante o processo de crescimento caracteriza uma parada na biossíntese da enzima durante essa fase, o que foi observado nas duas leveduras ao longo do processo fermentativo.

Em função de a constituição dos meios testados ser diferenciada, a quantidade de aminoácido posta no meio pela função catalítica para biossíntese da glutamato oxaloacetato transaminase, a partir de intermediários do metabolismo do carbono, indicaria que a assimilação de aminoácidos dos meios não corresponderia à necessidade de incorporação dos aminoácidos nas proteínas, o que obrigaria a levedura a recorrer, via biossintética, ao  $\alpha$ -cetoglutarato (COOPER, 1994; HORNSEY, 2003).

Provavelmente a atividade dessa enzima logo no início de algumas fermentações seja por causa da pouca quantidade de aminoácidos em alguns meios, induzindo à biossíntese nessas condições (DAWSON, 1984).

Observa-se que essa enzima está diretamente relacionada com a produção de aminoácidos (HORNSEY, 2003), que são substratos para compostos que contribuem para o sabor de bebidas, como o diacetil (valina e isoleucina), álcool superior e ésteres. Os testes sensoriais efetuados nas diferentes cervejas produzidas com os diferentes substratos, com as duas leveduras (alta e baixa fermentação), comprovaram que onde a atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase apresentou-se mais baixa as amostras tiveram menor aceitação pela aplicação da escala hedônica.

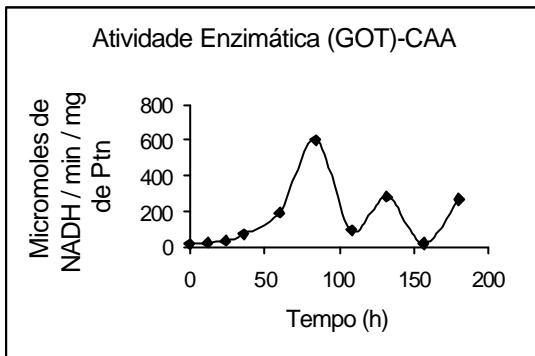


Figura 41 – Atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase para levedura *ale* no substrato com caldo de cana.

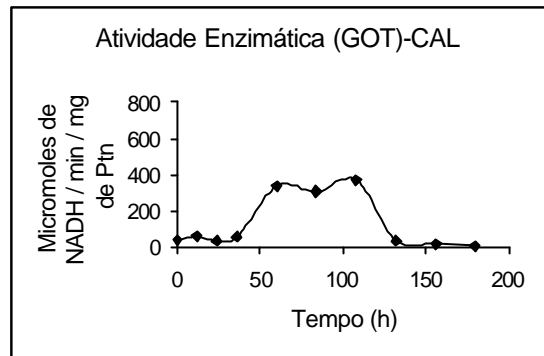


Figura 42 – Atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase para levedura *lager* no substrato com caldo de cana.

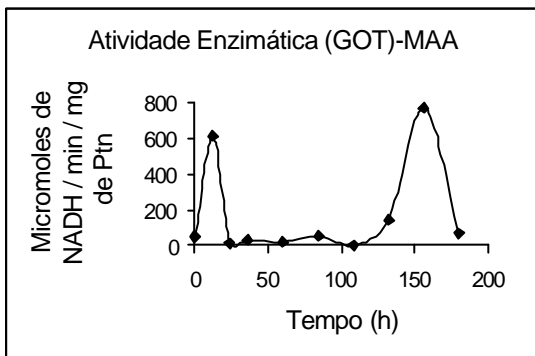


Figura 43 – Atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase para levedura *ale* no substrato com ma ltose.

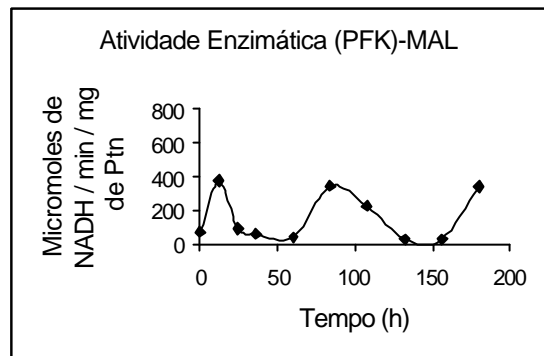


Figura 44 – Atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase para levedura *lager* no substrato com maltose.

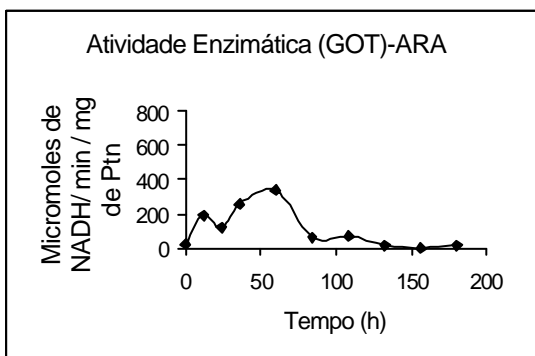


Figura 45 – Atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase para levedura *ale* no substrato com arroz.

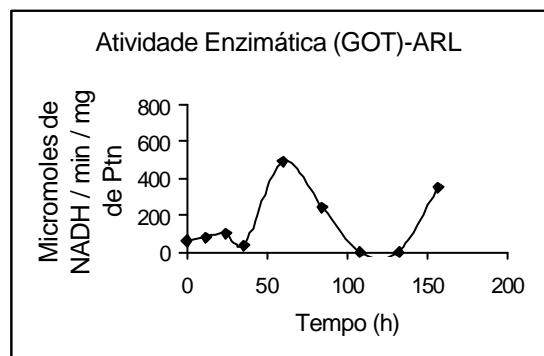


Figura 46 – Atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase para levedura *lager* no substrato com arroz.

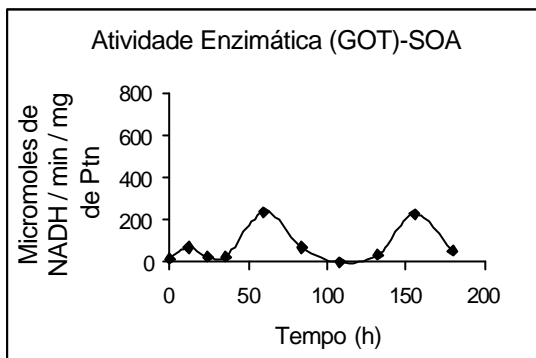


Figura 47 – Atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase para levedura *ale* no substrato com sorgo.

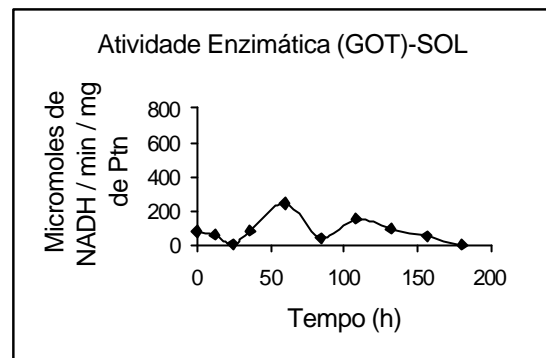


Figura 48 – Atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase para levedura *lager* no substrato com sorgo.

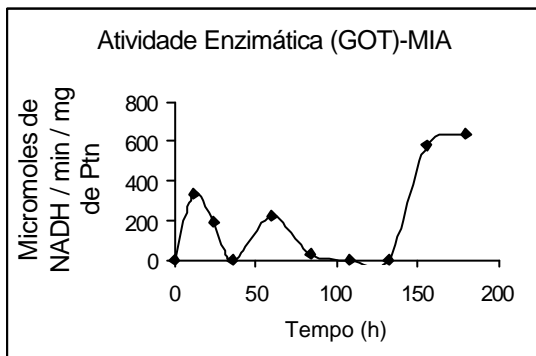


Figura 49 – Atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase para levedura *ale* no substrato com milho.

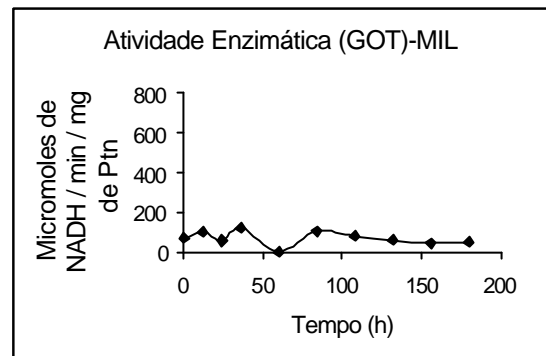


Figura 50 – Atividade específica da glutamato oxaloacetato transaminase para levedura *lager* no substrato com milho.

### 3.6. Diacetil redurase

Constatou-se nos perfis dos extratos obtidos da levedura de alta fermentação (*ale*), nos substratos testados (Figuras 51, 53, 55, 57 e 59), que a enzima diacetil redutase apresentou baixas atividades, com pequenas variações nos substrato caldo de cana e arroz, tendo as maiores atividades específicas sido observadas às 24 horas, 117  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, e às 60 horas, 80  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, respectivamente. Nos substratos xarope de *high* maltose a enzima apresentou tendência inicial de queda, seguida de aumento, com maior atividade às 84 horas, 308  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn. Para o substrato milho observou-se baixa

atividade ao longo do processo, porém com picos de produção às 24 horas, 313  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, e às 156, 139  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn. As maiores produções dessa enzima foram observadas no substrato sorgo às 84 horas 521  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, e às 180 horas, no final da fermentação.

Com a utilização da levedura *lager* nos substratos testados, os perfis enzimáticos da diacetil redutase (Figuras 52, 54, 56, 58 e 60) permaneceram com baixas atividades específicas e picos de produção ao longo do processo. Com o substrato caldo de cana a maior produção foi às 108 horas, 194  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn, e com o substrato xarope de *high* maltose a maior produção da enzima foi no meio do processo, às 84 horas, com 355  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn. Utilizando o substrato arroz, o sistema fermentativo caracterizou-se por ter a maior produção dessa enzima, quando comparado aos outros com picos de produção às 60 horas, 567  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn. No substrato sorgo a maior produção enzimática foi detectada com picos às 180 horas, 455  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de Ptn. Já para o substrato milho as atividades mantiveram-se baixa ao longo do processo, com pequenas variações na produção enzimática.

A concentração final de diacetil na cerveja depende de três fatores: síntese e excreção do  $\alpha$ -acetolactato, conversão deste precursor no diacetil e remoção do diacetil pela levedura. A remoção do diacetil da cerveja pode ser efetuada pela sua conversão a compostos com sabor mais leves: a acetoína (sobre a ação da diacetil redutase, enzima que catalisa essa reação) e o 2,3-butanediol (CASTILLO, 1993).

As maiores atividades da enzima diacetil redutase no substrato sorgo para levedura de alta fermentação e arroz na levedura de baixa fermentação não refletem os resultados de aceitação dessas cervejas, pois esses produtos tiveram apenas notas intermediárias ou baixas. Provavelmente essas notas estejam relacionadas a outras substâncias e não efetivamente ao diacetil presente no meio, já que a cerveja foi maturada e com a maior atividade enzimática nesses substratos existia grande possibilidade de redução dessa substância, pois, segundo CASTILO (1993), a levedura pode reduzir essa substância.

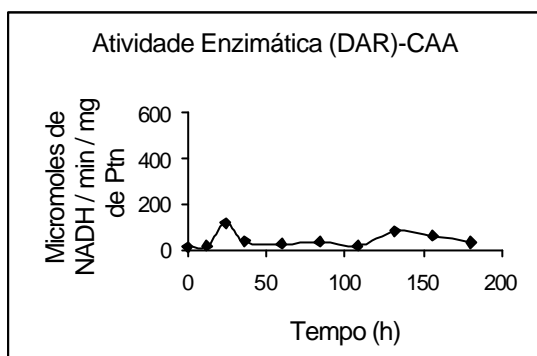


Figura 51 – Atividade específica da diacetil redutase para levedura *ale* no substrato com caldo de cana.

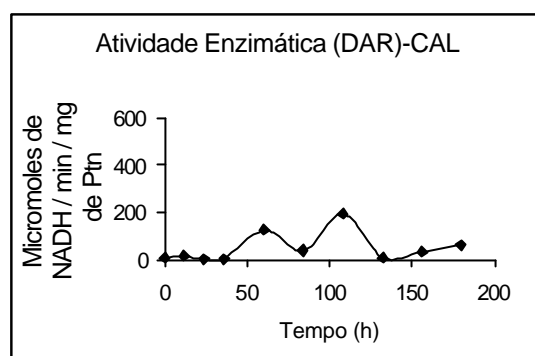


Figura 52 – Atividade específica da diacetil redutase para levedura *lager* no substrato com caldo de cana.

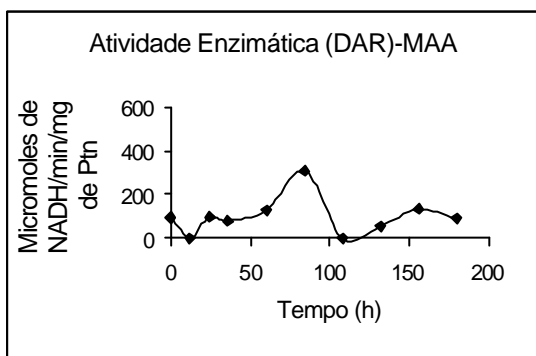


Figura 53 – Atividade específica da diacetil redutase para levedura *ale* no substrato com maltose.

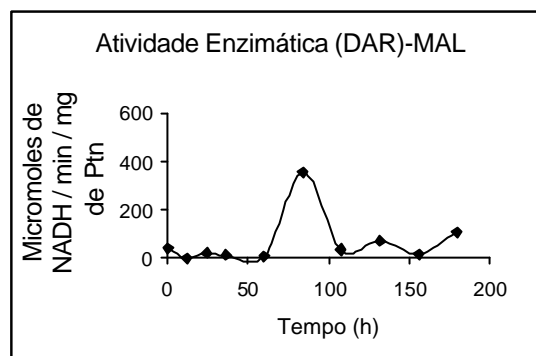


Figura 54 – Atividade específica da diacetil redutase para levedura *lager* e no substrato com maltose.

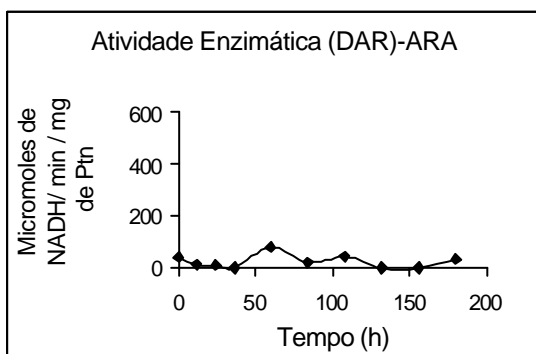


Figura 55 – Atividade específica da diacetil redutase para levedura *ale* no substrato com arroz.

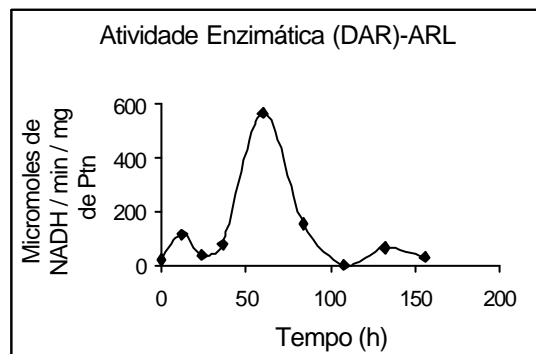


Figura 56 – Atividade específica da diacetil redutase para levedura *lager* e no substrato com arroz.

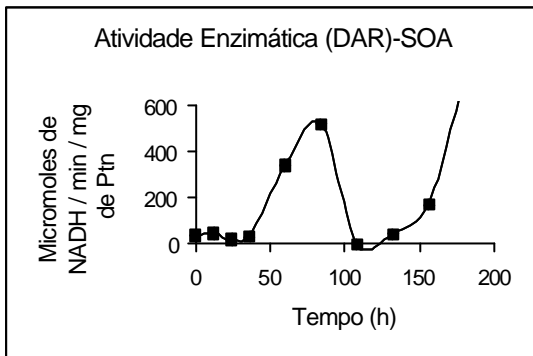


Figura 57 – Atividade específica da diacetil redutase para levedura *ale* no substrato com sorgo.

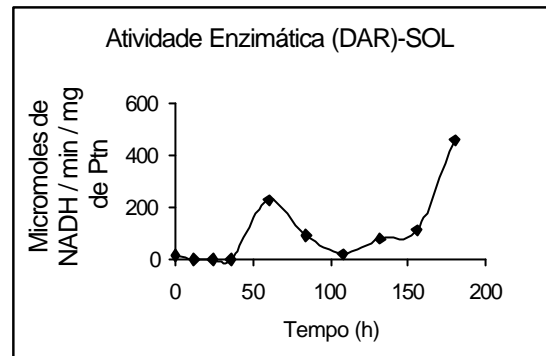


Figura 58 – Atividade específica da diacetil redutase para levedura *lager* e no substrato com sorgo.

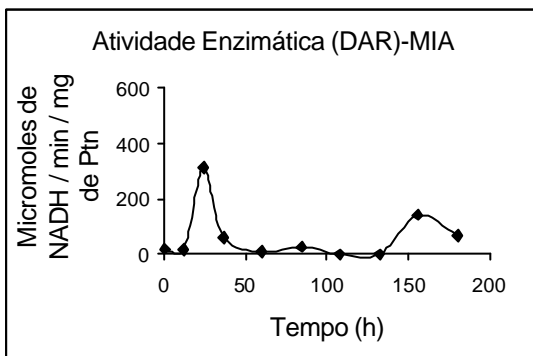


Figura 59 – Atividade específica da diacetil redutase para levedura *ale* no substrato com milho.

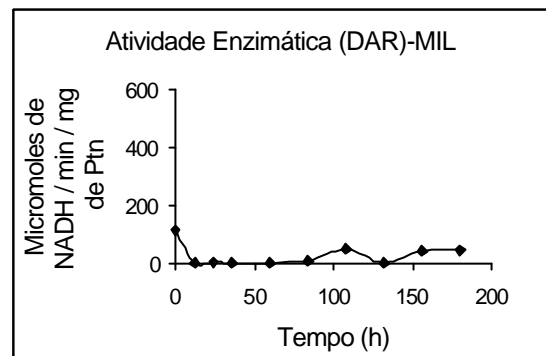


Figura 60 – Atividade específica da diacetil redutase para levedura *lager* e no substrato com milho.

## 4. CONCLUSÕES

A utilização de substratos com constituição química diferenciada influenciou o comportamento das atividades enzimáticas das duas leveduras de alta e baixa fermentação, provavelmente devido à translocação e regulação de nutrientes através da membrana, como também à formação de complexos enzimáticos diferenciados .

A atividade da álcool desidrogenase apresentou maiores picos de produção na levedura de alta fermentação, comparada com a levedura de baixa. Porém, essas diferenças não influenciaram as condições do trabalho testadas na produção de etanol, que se mantiveram em níveis próximos em todos os substratos, para as duas leveduras.

Os substratos xarope de *high* maltose, sorgo e caldo de cana tiveram os melhores desempenhos na produção da piruvato desidrogenase que os demais, nas mesmas condições de aeração, nas primeiras 12 horas do processo na levedura *ale*. Na levedura *lager* os maiores picos de aumento foram observados nos substratos caldo de cana, arroz e xarope de *high* maltose. Globalmente, a levedura *ale* apresentou maiores atividades que a *lager*.

As melhores atividades da enzima isocitrato liase foram alcançadas no substrato caldo de cana e sorgo, quando se cultivou a levedura *ale*, e nos substratos arroz e xarope de *high* maltose, quando se cultivou a levedura *lager*, o que indicaria uma desrepressão do ciclo do glioxalato nesses meios, com as referidas leveduras.

A enzima glutamato oxaloacetato transaminase apresentou as maiores atividades com o cultivo da levedura ale nos substratos caldo de cana, xarope de é maltose e milho. Com o cultivo da levedura *lager* os melhores desempenhos dessa enzima foram nos substratos caldo de cana, arroz e milho. Os substratos de maior produção para as duas enzimas, coincidentemente, produziram as cervejas com maior aceitação, o que comprova ser essa enzima nesses substratos disponibilizadora fundamental de aminoácidos de importância na formação de substâncias que determinam a característica sensorial da cerveja.

As maiores atividades da fosfofrutoquinase foram verificadas nos cultivos das leveduras ale e *lager* nos substratos arroz, o que indica uma atividade glicolítica mais elevada na primeira fase da via e o maior fluxo no sentido da produção do piruvato.

A diacetil redutase está relacionada com a redução do diacetil na cerveja, que é um composto de extrema importância na formação do perfil sensorial da bebida. As maiores atividades foram detectadas no cultivo levedura ale no substrato sorgo e na levedura *lager* no substrato arroz, o que indica a potencialidade de redução dessa substância ao longo do processo.

## **CAPÍTULO 4**

### **ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAL EM CERVEJAS**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Na indústria de cerveja, durante a fermentação, as mudanças fisiológicas e bioquímicas ocorrem na célula durante as primeiras horas depois que o microrganismo é inoculado, ocorrendo processos importantes que acompanham o crescimento da massa celular e podem determinar o sucesso ou falha na fermentação (SONNLEITNER e HAHNEMANN, 1994).

A função principal da levedura na fermentação é a catálise e a conversão rápida e eficiente de açúcares do mosto em etanol e dióxido de carbono e outros metabólitos menores, mas importantes para o desenvolvimento do aroma e sabor da cerveja (VASAVADA, 1995). A aplicação da levedura na biotecnologia para fabricação de cerveja envolve sua exposição a meio com as mais variadas constituições físico-químicas, que podem afetar sua viabilidade. No decorrer das fermentações podem ser observados fatores importantes que podem controlar um processo fermentativo como pH, concentração de açúcar, temperatura, concentração de álcool etc., que induz a levedura a exibir respostas complexas quando sujeita a circunstâncias fisiológicas fora dos padrões ideais. Essas respostas envolvem aspectos que estão ligados com a produção de substâncias que vão determinar as características sensoriais da cerveja em processo.

Dependendo do grau de alteração desses fatores, podem ser determinadas a eficiência do processo e sua utilização em padrões comerciais de fermentação industrial (DEMAIN, 2000).

Através da atenuação, que pode ser determinada pela diminuição do °Brix, pode-se determinar a captação pela levedura dos açúcares do mosto.

A cerveja sofre mudanças gradativas, o que pode ser evidenciado por deteriorações no sabor, aumento de turbidez e acentuação da cor. A cerveja deve possuir uma boa estabilidade, para que suas características originais sejam mantidas por um longo período e suas alterações físico-químicas sejam retardadas (COOPER, 1991, PHOWCHINDA et al, 1995).

A variação da estabilidade coloidal ou físico-química da cerveja pode implicar o aparecimento da turbidez. Os colóides são pequenas partículas finamente dispersas e de tamanho irregulares e que em solução, freqüentemente, apresentam carga elétrica. As proteínas, os polifenóis os polissacarídeos e as substâncias minerais são os responsáveis pela instabilidade coloidal (HORNSEY, 2003).

Sensorialmente, a cerveja é uma das bebidas mais delicadas, possuindo um complexo, mas moderado, sabor e aroma. Como a cerveja é uma mistura complexa de vários compostos dissolvidos em um ambiente aquoso, sua vida de prateleira é amplamente determinada por sua estabilidade coloidal, apesar de as mudanças no sabor poderem ocorrer antes que a turbidez no produto seja formada. A oxidação de um ou mais compostos do produto pode resultar em uma cascata de mudanças no aroma e no sabor da cerveja (HORNSEY, 2003).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de alguns fatores (pH, concentração de açúcar, crescimento celular, extrato aparente) físico-químicos que estão relacionados com a qualidade sensorial da cerveja.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

As análises físico-químicas e sensorial dos processos fermentativos da produção das cervejas foram realizadas no Laboratório de Fermentações do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG.

### **2.1. Análises físico-químicas do processo fermentativo**

#### **2.1.1. Contagem de células**

A contagem de células em cada experimento foi determinada através da lâmina de Thoma, seguindo metodologia descrita por PELCZAR et al. (1980). Todas as amostras foram diluídas na proporção de 1:10, com solução de fosfato de potássio, de modo a manter a concentração de fermento em uma faixa que proporcionasse a contagem.

#### **2.1.2. Determinação de pH**

Essa análise foi feita em potenciômetro marca “Micronal”, para medida de pH, que foi determinado à temperatura de 20°C, após a eliminação do CO<sub>2</sub>, seguindo a metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1976).

### 2.1.3. Atenuação

A atenuação foi calculada de acordo com AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMIST – ASBC (1958). A atenuação foi calculada pela fórmula:

$$\text{Atenuação aparente} = \frac{\text{Extrato do mosto} - \text{Extrato final}}{\text{Extrato do mosto}} \times 100$$

### 2.1.4. Extrato aparente

O teor de extrato aparente foi determinado com um refratômetro de Brix, conforme Coopersucar, citado por VENTURINI FILHO (1993).

## 2.2. Análise sensorial

Foram realizados testes de aceitação no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal de Viçosa, segundo a metodologia descrita por CHAVES e SPROESSER (1999), com o uso da escala hedônica de nove pontos, que variou gradativamente, com base nos atributos gosta/desgosta. Os pontos da escala foram associados a valores numéricos, para possibilitar a análise estatística dos resultados por meio da análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey, para comparação de médias (Quadro 1). Foram selecionados 50 provadores, que representavam a população de consumidores atuais ou potenciais de cerveja.

Quadro 1 – Decodificação utilizada para aplicação de análise estatística

Classificação na escala	Score
Gostei extremamente	9
Gostei muito	8
Gostei moderadamente	7
Gostei ligeiramente	6
Indiferente	5
Desgostei ligeiramente	4
Desgostei moderadamente	3
Desgostei muito	2
Desgostei extremamente	1

As amostras de cervejas foram codificadas com números de três algarismos aleatórios, para realização do teste de aceitação, conforme representação esquemática no Quadro 2.

Quadro 2 - Codificação das cervejas para realização do teste de aceitação

<b>Cerveja tipo <i>Ale</i></b>	<b>Código</b>	<b>Cerveja tipo <i>Lager</i></b>	<b>Código</b>
ARA	703	ARL	310
CAA	803	CAL	912
MAA	523	MAL	708
MIA	112	MIL	318
SOA	422	SOL	501

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Análises físico-químicas**

##### **3.1.1. Contagem de células**

Os crescimentos celulares para as fermentações apresentaram variações em relação aos substratos utilizados. De modo geral, as fermentações com os microrganismos de alta e baixa fermentação apresentaram uma fase adaptativa (fase de latência) na qual as contagens do número de células não revelaram aumento acentuado, permanecendo abaixo de  $20 \times 10^6$  células/mL durante o intervalo de 20 - 40 horas do processo fermentativo. Não era de se esperar a fase adaptativa, uma vez que os substratos foram inoculados com células novas, devidamente propagadas para todas as fermentações. No entanto, essas propagações iniciais foram feitas em meios contendo apenas malte em sua constituição. Já na fase experimental foram utilizadas fontes diferenciadas de adjuntos (sorgo, milho, arroz, caldo de cana e xarope de *high* maltose), que deram origem aos meios de cultivo utilizados efetivamente nos testes. Para CEREDA (1983), BROCK et al. (1994), DEMAIN (2000) e SCHULZE (1995), essa fase seria explicada pela necessidade de estruturação pelo microrganismo do seu sistema enzimático, capaz de realizar uma série de reações que converte

maior quantidade de compostos disponíveis, uma vez que foram utilizados meios contendo concentrações variadas e diferenciadas desses componentes. Após a fase adaptativa observou-se, em todas fermentações, aumento no número de células, caracterizando a fase de crescimento exponencial, que chega a um ponto máximo de desenvolvimento e diminui próximo ao final das fermentações, para todos os substratos.

Na fermentação com caldo de cana como substrato e a levedura *lager*, a contagem atingiu cerca  $80 \times 10^6$  células/mL contra  $60 \times 10^6$  células/mL da *ale*. Com a utilização do sorgo as leveduras *lager* e *ale* atingiram em torno de  $50$  a  $60 \times 10^6$  células/mL, respectivamente. Já utilizando milho como adjunto, os índices celulares chegaram a  $50 \times 10^6$  células/mL para *lager* e  $30 \times 10^6$  células/mL *ale*. Porém, com a utilização de xarope de *high* maltose a contagem máxima de células para *lager* foi de  $90 \times 10^6$  e para levedura *ale* e foi próximo de  $60 \times 10^6$  células/mL. Com uso de arroz na composição do mosto as leveduras *lager* e *ale* atingiram o máximo de  $50 \times 10^6$  células/mL. Esses resultados estão representados na Figura 1, através do logaritmo do número de células.

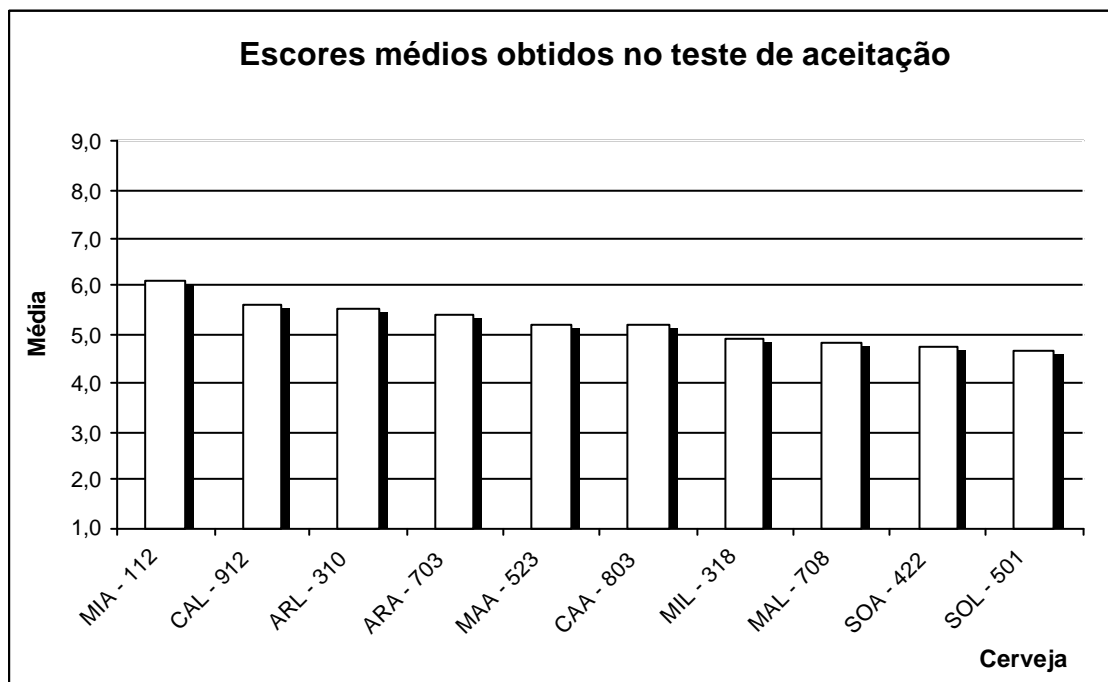


Figura 1 – Escores médios obtidos no teste de aceitação de cervejas com uso de escala hedônica realizado por 50 provadores.

Analisando o Quadro 3, verifica-se que há diferença estatística entre as espécies de leveduras testadas, entre a composição dos substratos, bem como em relação ao tempo de crescimento. Existe também diferença entre as interações levedura e composição do mosto, levedura e tempo testado, composição do mosto e tempo, como também entre a interação levedura em função da composição e do tempo.

Quadro 3 – Análise de variância do crescimento celular

Fonte de variação	GL	QM
		Log célula
Levedura	1	0,2170*
Composição	4	0,2017*
Tempo	8	2,7568*
Levedura*composição	4	0,07971*
Levedura*tempo	8	0,1016*
Composição*tempo	32	0,08487*
Levedura*composição*tempo	32	0,05437*
Resíduo	180	0,002255*

GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio; \* significativo, a 5% de probabilidade; e n.s: não-significativo, a 5% de probabilidade (GAN et al., 2001).

Analisando os resultados, pode-se constatar que apesar de desempenhos diferenciados a *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*, respectivamente levedura de alta e baixa fermentação, são microrganismos capazes de se desenvolver em vários meios para produção de cerveja de forma satisfatória a atender às necessidades da indústria, o que é comprovado em trabalhos realizados por pesquisadores como SONNLEITNER e HAHNEMANN (1994); VASAVADA (1995); CARLSEN (1997); e BREJNING et al. (2005).

### 3.1.2. pH

Os valores de pH nas fermentações utilizando leveduras do tipo *lager* e *ale* não sofreram grandes variações entre os diferentes tratamentos, durante as fermentações. O pH inicial está em torno de 5,3 e depois de 160 horas de

fermentação atinge uma faixa de 4,1 a 4,2. Essa queda no pH durante as primeiras fases fermentativas pode influenciar o metabolismo da levedura, que pode afetar a composição do meio e a natureza da superfície celular devido à dissociação de ácidos e bases. As mudanças metabólicas na célula tendem a regular o pH do meio, como afirmaram ATKINSON e MAVITUNA (1991). Porém, a queda de pH nos valores citados nos ensaios foi favorável ao desenvolvimento das leveduras em testes, que têm um pH de desenvolvimento na faixa de 3,5 – 4,5, de acordo com CEREDA (1983) e BROCK et al. (1994).

Na análise estatística do pH (Quadros 4) nota-se que existe diferença significativa entre as leveduras, entre a composição dos substratos testados e entre o tempo do processo fermentativo. Já para as interações levedura e composição do mosto, levedura e tempo testado, composição do mosto e tempo, como também para a interação levedura em função da composição do mosto e do tempo, não existe diferença significativa.

Quadro 4 – Análise de variância do pH em relação às variáveis testadas

Fonte de Variação	GL	QM
		pH
Levedura	1	0,1974*
Composição	4	0,4501*
Tempo	8	2,2251*
Levedura*composição	4	0,0420 <sup>ns</sup>
Levedura*tempo	8	0,01229 <sup>ns</sup>
Composição*tempo	32	0,03656 <sup>ns</sup>
Levedura*composição*tempo	32	0,04233 <sup>ns</sup>
Resíduo	180	0,04841

GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio; \* significativo, a 5% de probabilidade; e ns não-significativo ao nível de 5% de probabilidade (GAN et al., 2001).

O Quadro 5 apresenta as equações ajustadas a partir dos dados experimentais que descrevem o comportamento do pH em função da composição do substrato utilizando levedura (*lager* e *ale*).

Quadro 5 - Equações do pH ajustadas a partir de dados experimentais

<i>Lager - pH</i>			
Composição	Equação	R <sup>2</sup>	CV (%)
Arroz	$\hat{Y} = 4,956-0,00426*\text{Tempo}$	0,696	4,819
Cana	$\hat{Y} = 4,853-0,00449*\text{Tempo}$	0,698	5,218
Maltose	$\hat{Y} = 4,907-0,00631*\text{Tempo}$	0,940	5,934
Milho	$\hat{Y} = 4,800-0,00425*\text{Tempo}$	0,750	4,162
Sorgo	$\hat{Y} = 5,065-0,0111*\text{Tempo}+0,0000547*\text{Tempo}^2$	0,701	5,167
<i>Ale - pH</i>			
Composição	Equação	R <sup>2</sup>	CV (%)
Arroz	$\hat{Y} = 5,010-0,00489*\text{Tempo}$	0,865	4,175
Cana	$\hat{Y} = 4,833-0,00359*\text{Tempo}$	0,738	4,482
Maltose	$\hat{Y} = 4,800-0,00425*\text{Tempo}$	0,750	4,899
Milho	$\hat{Y} = 5,083-0,0109*\text{Tempo}+0,0000441*\text{Tempo}^2$	0,728	5,517
Sorgo	$\hat{Y} = 5,264-0,0130*\text{Tempo}+0,0000499*\text{Tempo}^2$	0,840	5,288

### 3.1.3. Atenuação

O final da fermentação foi estabelecido como sendo o momento em que a atenuação atingiu 80% de consumo do extrato fermentável, que foi estimado através de ensaio a 35°C, durante cinco dias (extrato primitivo), para todos os substratos e leveduras. Os valores mínimos de atenuação determinados experimentalmente para cada substrato estão no Quadro 6.

A atenuação-limite (80% de consumo de açúcar em relação a densidade limite) foi alcançada para todas as fermentações após 6,6 dias, o que está de acordo com os resultados obtidos por SILVA (1989), que obteve taxa de atenuação em seus trabalhos de 85% de seis a nove dias do início do processo fermentativo. Essa atenuação experimental correspondeu em média à de glicose de 40 g/L, para todos os substratos. A taxa de consumo do extrato aparente nas fermentações teve uma velocidade inicial de degradação elevada, reduzindo-se ao longo do processo, até atingir a meta.

Quadro 6 – Estimativa da atenuação a 35°C para os substratos e leveduras analisadas

Substrato	°Brix				
	Inicial	3º dia	4º dia	5º dia	°Brix limite
MAA	12,0	7,0	7,0	7,0	8,4
MAL	12,0	6,8	6,8	6,5	7,8
MIA	12,0	7,5	7,0	7,0	8,4
MIL	12,0	7,2	6,5	6,0	7,2
CAA	12,0	6,0	6,0	6,0	7,2
CAL	12,0	6,5	6,5	6,2	7,4
SOA	12,0	6,0	6,0	6,0	7,2
SOL	12,0	5,5	5,5	5,0	6,0
ARA	12,0	6,5	6,1	6,0	7,2
ARL	12,0	5,7	5,7	5,6	6,7

No Quadro 7 observa-se que a atenuação apresentou-se estatisticamente significativa para todas as variáveis testadas, comprovando que existe diferença entre as leveduras, entre a composição dos substratos testados e entre o tempo do processo fermentativo. Para as interações levedura e composição do mosto, levedura e tempo testado, composição do mosto e tempo, como também para interação levedura em função da composição do mosto e do tempo, permaneceu a tendência de significância, existindo diferença entre as interações.

Quadro 7 – Análise de variância do pH em relação as variáveis testadas

Fonte de variação	GL	QM
		Atenuação
Levedura	1	188,6685*
Composição	4	140,6063*
Tempo	8	17454,5809*
Levedura*composição	4	184,7759*
Levedura*tempo	8	34,7124*
Composição*tempo	32	49,8027*
Levedura*composição*tempo	32	33,3240*
Resíduo	180	3,5520

GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio; \* significativo, a 5% de probabilidade; e ns: não-significativo, a 5% de probabilidade (GAN et al., 2001).

No Quadro 8 estão as equações ajustadas a partir dos dados experimentais que descrevem o comportamento da atenuação em função da composição do substrato utilizando levedura (*lager* e *ale*).

Quadro 8 – Equações da atenuação ajustadas a partir de dados experimentais

<i>Lager</i> - Atenuação			
Composição	Equação	R <sup>2</sup>	CV (%)
Arroz	$\hat{Y} = 1,509+1,201*\text{Tempo}-0,0125*\text{Tempo}^2+0,00005084*\text{tempo}^3$	0,994	6,558
Cana	$\hat{Y} = 2,305+1,097*\text{Tempo}-0,00757*\text{Tempo}^2+0,0000239*\text{tempo}^3$	0,987	8,312
Maltose	$\hat{Y} = 1,918+1,090*\text{Tempo}-0,0119*\text{Tempo}^2+0,0000519*\text{tempo}^3$	0,992	7,600
Milho	$\hat{Y} = 4,493+0,781*\text{Tempo}-0,00586*\text{Tempo}^2+0,0000255*\text{tempo}^3$	0,972	12,179
Sorgo	$\hat{Y} = 4,219+0,966*\text{Tempo}-0,00757*\text{Tempo}^2+0,0000563*\text{tempo}^3$	0,982	10,553
<i>Ale</i> - Atenuação			
Composição	Equação	R <sup>2</sup>	CV (%)
Arroz	$\hat{Y} = -0,612+1,369*\text{Tempo}-0,0152*\text{Tempo}^2+0,0000621*\text{tempo}^3$	0,986	8,809
Cana	$\hat{Y} = 1,907+0,932*\text{Tempo}-0,00864*\text{Tempo}^2+0,0000373*\text{tempo}^3$	0,989	8,723
Maltose	$\hat{Y} = -0,933+1,185*\text{Tempo}-0,0133*\text{Tempo}^2+0,0000580*\text{tempo}^3$	0,990	8,512
Milho	$\hat{Y} = 0,9112+1,259*\text{Tempo}-0,0151*\text{Tempo}^2+0,0000657*\text{tempo}^3$	0,997	6,020
Sorgo	$\hat{Y} = 3,534+0,952*\text{Tempo}-0,0092*\text{Tempo}^2+0,0000407*\text{tempo}^3$	0,981	10,058

### 3.1.4. Extrato aparente (°Brix)

O teor de açúcar inicial para todas as fermentações testadas foi corrigido para 12° Brix, encerrando-se o processo fermentativo após consumo de 80% dos açúcares fermentáveis, de modo a permanecer 20% desse açúcar para promover a carbonatação do produto.

Os açúcares fermentáveis apresentaram tendência homogênea de queda ao longo de todo processo fermentativo, como foi também verificado em trabalhos realizados por SILVA (1989). Analisando o Quadro 9, observa-se que para todas as variáveis testadas houve significância estatística, comprovando que existe diferença entre as leveduras, entre a composição dos substratos testados e entre o tempo do processo fermentativo. Existe também diferença para as interações levedura e composição do mosto, levedura e tempo testado, composição do mosto e tempo, como também a interação levedura em função da composição do mosto e do tempo.

Quadro 9 – Análise de variância do extrato aparente (°Brix) em relação as variáveis testadas

Fonte de variação	GL	QM
		Brix
Levedura	1	1,9935*
Composição	4	0,3565*
Tempo	8	79,8345*
Levedura*composição	4	0,2960*
Levedura*tempo	8	0,2066*
Composição*tempo	32	0,1865*
Levedura*composição*tempo	32	0,1620*
Resíduo	180	0,08863

GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio; \* significativo, a 5% de probabilidade; e ns: não-significativo, a 5% de probabilidade.

Um brix excessivamente elevado foi constatado em todas as fermentações, provavelmente devido às células em suspensão ou a outro agente de alta densidade, e não em função de açúcares residuais. Este mesmo fenômeno foi constatado em cervejas comerciais, em testes preliminares. Apesar de existirem diferenças significativas entre as leveduras testadas, como também entre os substratos verificou-se que o perfil de consumo do extrato aparente tem tendências graficamente semelhantes, o que deixa bem evidente que apesar de estar trabalhando com meios de constituições diferenciadas o comportamento dos microrganismos testados não esteve muito distante, comprovando que esses substratos podem ser utilizados para produção industrial de cerveja.

O Quadro 10 apresenta as equações ajustadas a partir dos dados experimentais que descrevem o comportamento do extrato aparente (°Brix) em função da composição do substrato, utilizando-se levedura (*lager* e *ale*).

Quadro 10 – Equações do extrato aparente (°Brix) ajustadas a partir de dados experimentais

<i>Lager - Brix</i>			
Composição	Equação	R <sup>2</sup>	CV (%)
Arroz	$\hat{Y} = 12,034 - 0,0887 * \text{Tempo} + 0,000981 * \text{Tempo}^2 - 0,00000401 * \text{tempo}^3$	0,986	2,534
Cana	$\hat{Y} = 11,862 - 0,0627 * \text{Tempo} + 0,000567 * \text{Tempo}^2 - 0,00000243 * \text{tempo}^3$	0,989	2,492
Maltose	$\hat{Y} = 12,023 - 0,0776 * \text{Tempo} + 0,000846 * \text{Tempo}^2 + 0,0000367 * \text{tempo}^3$	0,992	2,348
Milho	$\hat{Y} = 11,955 - 0,0879 * \text{Tempo} + 0,00106 * \text{Tempo}^2 + 0,00000458 * \text{tempo}^3$	0,995	3,031
Sorgo	$\hat{Y} = 11,841 - 0,0646 * \text{Tempo} + 0,000615 * \text{Tempo}^2 + 0,00000265 * \text{tempo}^3$	0,985	2,926

<i>Ale - Brix</i>			
Composição	Equação	R <sup>2</sup>	CV (%)
Arroz	$\hat{Y} = 11,892 - 0,0782 * \text{Tempo} + 0,000798 * \text{Tempo}^2 - 0,00000324 * \text{tempo}^3$	0,993	2,030
Cana	$\hat{Y} = 11,852 - 0,0728 * \text{Tempo} + 0,000488 * \text{Tempo}^2 - 0,00000149 * \text{tempo}^3$	0,989	2,845
Maltose	$\hat{Y} = 11,873 - 0,0751 * \text{Tempo} + 0,000795 * \text{Tempo}^2 + 0,0000345 * \text{tempo}^3$	0,994	2,349
Milho	$\hat{Y} = 11,683 - 0,0534 * \text{Tempo} + 0,000405 * \text{Tempo}^2 + 0,00000176 * \text{tempo}^3$	0,970	5,008
Sorgo	$\hat{Y} = 11,875 - 0,0737 * \text{Tempo} + 0,000777 * \text{Tempo}^2 + 0,00000339 * \text{tempo}^3$	0,964	6,674

### 3.1.5. Análise sensorial

Pelo exame do Quadro 11 constata-se que existe diferença significativa entre as amostras ( $P < 0,05$ ). Logo, as médias foram analisadas pelo teste de Tukey, para verificação das diferenças.

Quadro 11 – Médias para diferentes composições de cervejas estudadas

Amostra	Provadores (P)	Média	Desvio-Padrão
MIA - 112	50	6,1 a*	1,81
CAL - 912	50	5,6 a b	2,33
ARL - 310	50	5,5 a b	2,11
ARA - 703	50	5,4 a b	1,87
MAA - 523	50	5,2 a b	1,89
CAA - 803	50	5,2 a b	2,03
MIL - 318	50	4,9 a b	2,45
MAL - 708	50	4,8 a b	2,09
SOA - 422	50	4,7 b	2,42
SOL - 501	50	4,7 b	2,11

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ) (GAN et al., 2001).

Com base no valor crítico da amplitude total estudentizada pelo método de Tukey a 5%, com dez amostras e 441 graus de liberdade do resíduo da análise de variância, verificou-se que os escores médios obtidos no teste de aceitação das cervejas MIA, CAL, ARL, ARA, MAA, CAA, MIL e MAL não diferem significativamente a 5% de probabilidade, devendo ser ressaltado que o escore médio da cerveja MIA difere significativamente dos escores médios obtidos para as cervejas SOA e SOL ( $P < 0,05$ ).

## 4. CONCLUSÕES

A contagem celular caracterizou-se por diferença significativa em relação às variáveis testadas, com uma ligeira fase adaptativa que pode ter se instalado em função de o número de células usadas não ser suficiente para metabolizar a quantidade de substrato disponível, partindo do pressuposto que nos ensaios se tratavam de células novas devidamente propagadas e com boa viabilidade.

Os melhores desempenhos de formação de biomassa celular foram observados com uso dos adjuntos açucarados (xarope de *high* maltose e caldo de cana) com a levedura *lager*.

As evoluções do pH dos meios de crescimento testados iniciaram na faixa de 5,0 - 5,5 e finalizaram na faixa de 4,1 – 4,5, para todos os experimentos, exibindo comportamento semelhante com tendência de queda, onde a cerveja nessas condições torna-se um meio desfavorável ao crescimento para a maioria dos microrganismos contaminantes por causa do pH baixo. De modo geral, a célula de levedura pode crescer em uma faixa de pH entre 3 e 6.

Mesmo com essa evolução decrescente do pH, foi observado que existe diferença significativa entre as leveduras, entre a composição dos substratos testados e entre o tempo do processo fermentativo. Já para as interações levedura e composição do mosto, levedura e tempo testado, composição do mosto e tempo, como também para a interação levedura em função da composição do

mosto e do tempo, não existem diferenças significativas. Tais observações são importantes no monitoramento das variáveis de controle do processo de fermentação, em que o pH tem influência decisiva para o bom andamento do sistema.

Através da diminuição do °Brix (extrato aparente) pode-se determinar a captação pela levedura dos açúcares do mosto e estimar a porcentagem de atenuação.

Existe diferença entre as leveduras, entre a composição dos substratos testados e entre o tempo do processo fermentativo. Existe também diferença para as interações levedura e composição do mosto, levedura e tempo testado, composição do mosto e tempo, assim como a interação levedura em função da composição do mosto e do tempo na evolução do extrato aparente e atenuação nos sistemas testados. Dependendo do grau de diferenciação desses fatores, podem-se determinar a eficiência do processo e sua utilização em padrões comerciais de fermentação industrial.

Entre as cervejas produzidas, avaliadas por consumidores através de escala hedônica, apresentaram menor aceitação as produzidas a partir do sorgo, como adjunto do malte, devendo ser ressaltado que as cervejas produzidas a partir de milho, caldo de cana, xarope de *high* maltose e arroz não diferiram significativamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, e apresentaram médias de aceitação entre os atributos “gostei moderadamente” e “indiferente”.

Estudos mais detalhados da composição do meio de crescimento ou da descrição sensorial com provadores treinados e não-treinados são necessários para a comprovação dos resultados e melhores conclusões. Com o objetivo de obter uma avaliação sensorial mais relevante, devem ser realizados testes descritivos (ADQ) com provadores treinados e testes de aceitação em paralelo para uma melhor qualificação de parâmetros sensoriais, de modo a descrever a atitude e a aceitação do consumidor diante dos produtos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGAS, 1, 2000, Brasília. **Anais...** Brasília: AMBEV, 2000. 96 p.

ALBERTYN, J.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; PRIOR, B.A. *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, p. 4135-4144, 1994.

ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica.** 1994. 251 f. Dissertação (Mestrado Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

AMBEV. **Cervejas.** Fabricação. Disponível em: <<http://www.ambev.com.br/produtos/cervejas/fabricacao>>. Acesso em: 04 out. 2003.

ANSELL, R.; GRANATH, K.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; ADLER, L. The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. **EMBO J.**, v. 16, p. 2179-2187, 1997.

ANZALDUA-MORALES, A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica.** Zaragoza: Acribia, 1994. 198 p.

AQUARONE, E., LIMA, U. A., BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação.** v.1 São Paulo : Edgard Blücher, 1983. 243p.

ARAÚJO, F. B. **Perfil sensorial, cromatográfico e características físico-químicas de cervejas provenientes de dois segmentos de mercado.** 2000.

109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

ATKINSON, B.; MAVITUNA, F. **Biochemical engineering and biotechnology handbook**. 2. ed., New York: M. Stockton Press, 1991.

BAIRD-PARKER, A. C.; BRYAN, F. L.; CRRISTIAN, J. H. B. CLARK, D. S.; OLSON, J.C.; ROBERTS, T. A. **Microbial ecology of foods: factors affecting life and death of microorganisms**. Vol. 1, Orlando: Academic Press, 1980.

BADZIONG W, HABERMANN P, MOELLER J, WERNER A. **Process for using the yeast ADH II promoter system for the production of heterologous proteins in high yields**, US Patent 5.866.371, 1999.

BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; VAN MARIS, A. J.; KÖTTER, P.; LUTTIK, M. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, p. 15-37, 2001.

BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; ORELLI, V. F. D. M.; CAMPOS, A. A.; GALLO, C. R.; AMORIM, H. V. **Dominância das leveduras contaminantes sobre linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem**. STAB: Piracicaba, 1991.

BEAL, A. D.; MOTTRAM, S. Na evaluation of the aroma characteristics of malted barley by free-choice profiling. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v .61, p.17-22, 1992.

BEERS, M. B.; COOLERS, M. Intercept Ltd.: Andover, England, 1991; p 191-193.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Adv. Microb. Physiol.**, v. 33, p. 145-212, 1992.

BOEHRINGER. **Methods of enzymatic food analysis**. Boehringer Mannheim/R-Biopharm. Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis, 2003.

BOULTON, C. A.; BOX, W. G.; QUAIN, D. E.; MOLZAHN, S. W. Vicinal diketone reduction as a measure of yeast vitality. **MBAA – Technol. Quart.**, v. 38, p. 89-93, 2001.

BRAHMA. **Maturação etapas de fabricação**. 1998 Disponível em: <<http://www.brahma.com.br/produtos/cervejas/inst/cerv/fabcerv5.htm>>. Acesso em: 3 out. 2004.

BRAVO, A.; SCHERER, E.; MADRID, J.; HERRERA, J.; VIRTANEN, H.; RANGEL-ALDAO, R. Identification of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in aged beers: their role in beer aging process. **Proceedings 28<sup>th</sup> European Brewing Convention Congr.**, Budapest: Fachverlag Hans Carl: Nurnberg, Germany, p. 602-611, 2001.

BREJNING, J.; ARNEBORG, N.; JESPERSEN, L. Identification of genes and proteins induced during the lag and early exponential phase of *lager* brewing yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 261, 2005.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. Cap. 9. New Jersey: Prentice Hall, Inc., 7. ed., 1994.

BVOCHORA, J. M.; ZVAUYA, R. Biochemical changes occurring during the application of high gravity fermentation technology to the brewing of Zimbabwean traditional opaque beer. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 365-370, 2001.

CALDWELL, D. R. **Microbial physiology and metabolism**. Belmont: Star Publishing Company, 2. ed., 2000. Cap. 5.

CARLSEN, M., JOCHUMSEN, V. K., EMBORG, C.; NIELSEN J. Modeling the growth and proteinase A production in continuous cultures of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Bioeng**, v. 55, p. 447-454, 1997.

CASTILLO, C. M. O. Factors affecting the consumption of 2,3-butanedione by *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in Applied Microbiology**, p. 132-134, 1993.

CASTRO, I. M. **Estudo da utilização de glicerol, ácido láctico e proteínas por *Fusarium oxysporum* var. lini**. 1991. 196 f. Tese (Doutorado Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1991.

CEREDA, M. P. Cerveja. In: AQUARONE, E. et al. (Ed.) **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1983. p. 44-78. Cap. 3.

CERVESIA. **Tecnologia cervejeira**. Disponível em: <<http://www.cervesia.com.br>>. Acesso em: 01 ago. 2003.

CHAVES, J. B. P. **Métodos de diferença em avaliação sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993. 91 p.

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa-MG: Editora UFV, 1999. 81 p.

CIACCO, C. F. **Hidrolise enzimática do amido**. Disponível em: <<http://www.igsc.sc.usp/pet/petamido.htm>>. Acesso em: 08 fev. 1998

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução a bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1984. 525 p.

COOPERATIVA DOS PRODUTORES DE CANA, AÇUCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Fermentação**. São Paulo, 1987. 434 p.

COOPER, T. G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. W.; BROACH, J. R. (Ed.) **The molecular biology of the yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

COOPER, S. **Bacterial growth and division**. New York: Academic Press, Inc 1991.

DANIELSSON, O.; JÖRNVALL, H. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 9247-9251, 1992.

DANIELSSON, O.; ATRIAN, S.; LUQUE, T.; HJELMQVIST, L. ; GONZALEZ-DUARTE, R. AND JÖRNVALL, H. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 4980-4984, 1994.

DAWSON, R. M. C. et al. **Data for biochemical research**. 3. ed. Oxford Scien. Publish, 1984.

DE CLERK, **A text book of brewing**. London: Chapman & Hall 1957. v.1, 587p

DELLA LUCIA, F. **Avaliação físico-química e sensorial de leite UAT (ultra alta temperatura) produzido no Brasil e na Argentina**. 1999. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 26-31, 2000,

DANIELS, R. **Brewing theory 1001**. Chautaugua Inc. Disponível em: <<http://www.allaboutbeer.com/homebrew/theory.html>>. Acesso em: 23 set. 1996.

DEQUIN, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, p. 577-588, 2001.

DICKINSON, F.M.; DACK, S. The activity of yeast ADH I and ADH II with long chain alcohols and diols. **Chem Biol Interact**, v. 130-132, p. 417-423, 2001.

DUESTER, G.; FARRÉS, J.; FELDER, M. R.; HOLMES, R.; SHÖÖG, J. O.; PARÉS, X.; PLAPP, B. V.; YIN, S. J.; JÖRNVALL, H. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, p. 389-395, 1999.

DUNTZE, W.; NEUMANN, D.; GANCEDO, J.M.; ATZPODIEN, W.; HOLZER, H. Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomices cerevisise*. **Eur. J. Biochem.**, v. 10, p. 83-89, 1969.

EHRHARDT, P.; SASSEN, H. **Fermentação**. Vassouras: SENAI-DR/RJ, 1995. 37 p.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica – EBC**. 4. ed. Zúrique Brauerei – und Getranke – Rundschau, 1987. 271 p.

FELDMANN, H. **Yeast molecular biology**. Adolf-Butenandt-Institute, University of Munich, 2001.

FIECHTER, A.; SEGHEZZI, W. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. **J. Biotechnol.**, v. 27, p. 27-45, 1992.

FONTES, R. **Glicólise**. São Paulo, 2003. (Apostila).

FUNDAÇÃO ANDRÉ TOSELLO. **Coleção de culturas tropical**. Disponível em: <<http://www.cct.org.br>>. Acesso em: 25 nov. 2002.

GALLO, L. A. **Metabolismo de carboidratos**. Piracicaba-SP: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2000.

GAN, Q.; HOWELL, J. A.; FIELD, R.W.; ENGLAND, R.; BIRD, W. M. R.; GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 6. ed., São Paulo: Nobel, 2001. 430 p.

GARCIA, A. I.; GARCIA, L. A.; DÍAZ, M. Fusel alcohols in beer fermentation process. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 303-309, 1994.

GOLDBETER, A. **Biochemical oscillations and cellular rhythms**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

GUIDO, L. F.; RODRIGUES, P. G.; RODRIGUES, J. A.; GONÇALVES, C. R.; BARROS, A. A. The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. **Food Chemistry**, v. 87, p. 187-193, 2004.

GUTIERREZ, L. E.; ANNICHINO, A. V. K. O.; LUCATTI, L.; STIPP, J. M. S. Efeito do ácido acético sobre a fermentação alcoólica. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 34, n. 2, p. 235-42, 1991.

HARADA, T.; HIRABAYASHI, T. Pyruvate dehydrogenase from *Hansenula*. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. (Ed.) **Methods in enzymology**, v. 89, p. 420-423, 1982.

HAMMOND, J. R. M.; ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts**. Vol. 5, Brewer's Yeasts, 2. ed., London: Academic Press Inc. Ltd., p. 7-67, 1993.

HARDWICK, W. A. **Handbook of brewing**. New York: Dekker, 1995. 713 p.

HYNNE F.; DANO S.; SØRENSEN, P. G. Full-scale model of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biophys Chem.**, v. 94, p. 121-163, 2001.

HORNSEY I. S. **Elaboración de cerveza**. Microbiología, bioquímica y tecnología, Editora Acribia, S.A., 2003. 229 p.

HOUGH, J. S. **The biotechnology of malting and brewing**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 159 p.

HUG, H.; PFENNINGER, H. Cassava as a raw material for beer production. **Brauerei-Rundschau**, Zuriue, v. 91, n. 9, p.149-153, 1980.

IGYOR, M. A. A. C.; OGBONNA, A. C.; PALMER, G. H. Effect of malting temperature and mashing methods on sorghum wort composition and beer. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 11, p. 1039-1044, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz** métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 2.ed. São Paulo: Coordenadoria dos Serviços Técnicos Especializados, Secretaria de Estado da Saúde, 1976. 371 p.

JANE, J. L. **Structural aspects of starch granules**. Ames: Iowa State University, 1998. Disponível em: <<http://www.zestec.com/crf/starch/Speakers/Jane/abstractjane.htm>>. Acesso em: 9 Set. 1998.

JEFFRIES, T. W. The complete genome sequence of the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis* provides new opportunities for industrial alcohol fermentation. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 40-41, 2005.

JÖRNVALL, H.; HÖÖG, J.O.; PERSSON, B.; PARÉS, X. **Pharmacology**, v. 61, p. 184-191, 2000.

LEE, B. H. **Fundamentals of food biotechnology**. New York, 1996. 431 p.

- LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing**. London: Chapman & Hall, 1995. 260 p.
- LESKOVAC, V.; TRIVIÆ, S.; PERIÈIN, D. The three zinc-containing alcohol dehydrogenase from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 2, p. 481-494, 2002.
- LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTALÂ, M. Recent advances in the malting and brewing industry. **Journal of Biotechnology**, v. 36, p. 85-98, 1998.
- MADRID, A. et al. **Manual de indústrias de alimentos**. 1.ed. São Paulo: Varela, 1996. 599 p.
- MADSEN, M. F.; DANØ, S.; SØRENSEN, G. P. On the mechanisms of glycolytic oscillations in yeast. **FEBS Journal**, v. 272, p. 2648, 2005.
- MADSEN, M. F. **The glycolytic oscillophore**. M.Sc. Thesis, University of Copenhagen, Copenhagen. 2004.
- MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen utilization. In: JONES, E. W.; PRINGLE, J. R.; BROACH, J. R. (Ed.). **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
- MAUGARD, T.; LAMARE, S.; LEGOY, M.D. Gas phase biotransformation reaction catalyzed by baker's yeast. **Biotechnol Bioeng**, v. 73, p. 164-168, 2001.
- MAHLER, H. R.; CORDES, E. H. **Biological chemistry**. 2. ed. 1971.
- McFADDEN, B.; HOWES, W. The determination of glyoxylic acid in biological systems. **Anal. Biochem.**, v. 1, p. 240-248, 1960.
- MEINANDER, N.; HAHN HAGERDAL, B.; LINKO, M. Fed batch xylitol production with recombinant XYL 1 expressing *S. cerevisiae* using ethanol as a co substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 42, n. 2-3, p. 334-339, 1994.
- MONTGOMERY, R.; DRYER, R. L. CNWAY, T. W. & SPECTOR, A. A. **Biochemistry: A case- oriented approach**. 3. ed. C.V. Mosby Comp. 1980.
- MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8. ed. Campinas-SP, 1993. 93 p.

MULLER, R. A mathematical model of the formation of fermentable sugars from starch hydrolysis during high-temperature mashing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3-5, p. 337-344, 2000.

MUNOZ, A. M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evolution in quality control**. New York, 1992. 240 p.

MYLLARINEN, P. **Variation of cultivating and properties of small starch granules in barley**. Disponível em: <<http://www.zestec.com/crf/tc/4/ph-myllariinen-97-01-20/>>. Acesso em: 10 jan. 1998.

NICHOLS, B. J.; RIGOULET, M.; DENTON, R. M. Comparison of the effects of Ca<sup>2+</sup> adenine nucleotides and pH on the kinetic properties of mitochondrial NAD<sup>+</sup> isocitrate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase from the yeast *S. cerevisiae* and rat heart. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 303, n. 2, p. 461-465, 1994.

NAKANO, V. M. **Teoria da Fermentação e Maturação**. In: WORKSHOP, 2000.

NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; SCHAECHTER, M. **Physiology of the bacterial cell: a molecular approach**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 1990. Cap. 7

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, p. 21, p. 231-241, 1997.

NEVOIGT, E.; PILGER, R.; MAST-GERLACH, E.; SCHMIDT, U.; FREIHAMMER, S.; ESCHENBRENNER, M.; GARBE, L.; STAHL, U. Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 225-232, 2002.

NOONAN, G. J. **Brewing lager beer**. Colorado. 1996. 363 p

OMORI, T.; OGAWA K.; UMEMOTO, Y.; YUKI, K.; KAJIHARA, Y.; SHIMODA, M. WADA, H. Enhancement of glicerol production by brewing yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with heat. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 82, n. 2, p. 187-190, 1996.

ORLICH, B., BERGER, H.; LADE, M.; SCHOMÄCKER, R. Stability and activity of alcohol dehydrogenases in w/o-microemulsions: enantioselective reduction including cofactor regeneration. **Biotechnol. Bioeng**, v. 70, p. 638-646, 2000.

KOIVUSALO, M.; BAUMANN, M.; UOTILA, L. **FEBS Lett.**, v. 257, p. 105-109, 1989.

KOTIAHO T.; LAURITSEN, F. R.; DEGN, H.; PAAKKANEN, H. Membrane inlet ion mobility spectrometry for on-line measurement of ethanol in beer and in yeast fermentation. **Analytica Chimica Acta**, v. 309, p. 317-325, 1995.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. 7.ed. Berlin: VLB, 1996.

PAL, D.; SACHDEVA, S.; SINGH S. Methods for determination of sensory quality of foods: a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 32, n. 5, p. 357-367, 1995.

PAMPULHA, M. E. F. S.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Activity of glycolitic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 34, p. 375-80, 1990.

PANCHUK, K.; VERDE, B.; McLELLAND, M.; CAMPBELL, D.; HARVEY, B.; AYNTER, B.; DUNKERTON, P. **Malting barley-right protein new varieties**. Avon Districts Agriculture centre, Northam, 1998. Disponível em: <<http://www.agric.wa.gov.au/programs/cereals/wheat/PAYNTER.htm>>. Acesso: 18 Ago. 1998.

PENFIELD, M. P.; CAMPBELL, A. M. **Experimental food science**. London, v.1, 1990. 541 p.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S. R.; MORAIS, P. B.; LINARDI, V. R.; ROSA, C.C R. Physiological characterization of yeast isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 104-108, 1998.

PERPÈTE, P.; COLLIN, S. Influence of beer ethanol content on the wort flavour perception. **Food Chemistry**, v. 71, p. 379-385, 2000.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiology**, v. 1, p. 566, 1980.

PHOWCHINDA, O.; DELIA DUPUY, M. L.; STREHAIANO, P. Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *S. cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, London, v. 17, n. 2, p. 237-242, 1995.

PIERCE, J. S. Horace brown memorial lecture: the role of nitrogen in brewing. **J. Inst. Brew.**, v.93, p. 378-81, 1987.

PINTO, M. G. V; PASTERIS, S. E.; SAAD, A. M. S. Glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from beer. **Food Microbiology**, v. 21, p. 111-118, 2004.

- PRIOR, B. A.; HOHMANN, S. Glycerol production and osmoregulation. In: ZIMMERMANN, F. K.; ENTIAN, K.D. (Ed). **Yeast sugar metabolism**. p. 313-337. Technomic Publishing Co., Lancaster, 1997.
- PRIEST, F. G.; CAMPBELL, I. **Brewing microbiology**. 2. ed, London, 1996. 306 p.
- RATLEDGE, C.; EVENS, C. T. Lipids an their metabolism. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.) **The Yeasts**, v. 3, **Metabolism and physiology of yeasts**. London: Academic Press, 1991. p. 367-455.
- REMIZE, F.; ROUSTAN, J.L.; SABLAYROLLES, J.M.; BARRE, P.; DEQUIN, S. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to stimulation of fermentation rate in stationary phase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 143-149, 1999.
- REINOLD, R. M. **Manual prático de cervejaria**. 1. ed. São Paulo: Aden, 1997. 213 p.
- RICHARD, P.; TEUSINK, B.; HEMKER, M. B.; VAN DAM, K.; WESTERHOFF, H. V. Sustained oscillations in free-energy state and hexose phosphates in yeast. **Yeast**, v. 12, p. 731-740, 1996.
- ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts**. vol. 5, 2. ed. San Diego, Academic Press. 1993.
- SAKAMOTO, K.; MARGOLLES, A.; VAN VEEN, H.W.; KONINGS, W.N. Hop resistance in the beer-spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5371-5375, 2001.
- SAKAMOTO, K.; VAN VEEEN, H. W.; SAITO, H.; KOBAYASHI, H.; KONINGS, W. N. Membrane-bound ATPase contributes to hop resistance of *Lactobacillus brevis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5374-5378, 2002.
- SALGADO, A. P. C.; SCHULLER, D.; CASAL, M.; LEÃO, C.; LEIPER, F. C.; CARLING, D.; FIETO, L. G.; TRÓPIA, M. J.; CASTRO, I. M.; BRANDÃO, R. L. Relationship between protein Kinase C and derepression of different enzymes. **FEBS Letters**, v. 532, p. 324-332, 2002.
- SCHULZE, U. **Anaerobic physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. Tese de Ph.D., Technical University of Denmark, 1995.

SCHWARTZ, M. Clinical aspects of aspartate and alanine aminotransferases. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N.O. (Ed.) **Methods in enzymology**, v. 17, p. 866-874, 1971.

SILVA, P. H. A. **Etude cinétique et enzymatique au cours de la fermentation primaire en brasserie**: influência des recoltes, de la concentration cellulaire, de la densité du mout. Lorraine. 1989. 147 f. These (Docteur Biotechnologies et Industries Alimentaires) – Institut National Polytechnique de Lorraine – École Nationale Supérieure d' Agronomie et des Industries Alimentaires, Paris. 1989.

SIMPSON, B. **The importance of yeast and fermentation**. 2.ed. London: Cara Technology, 1996. 34 p.

SONNLEITNER, B.; HAHNEMANN, U. Dynamics of the respiratory bottleneck of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biotechnol.**, v. 38, p. 63-79, 1994.

STELLWAGEN, E.; WILGUS, H. Phosphofrutokinase of yeast. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in Enzymology**, v. 42, p. 78-85, 1975.

STOMER, F. C. Diacetyl (acetoin) reductase. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in Enzymology**, v. 41, p. 529-533, 1975.

SUZUKI, K.; SAMI, M.; KADOKURA, H.; NAKAJIMA, H.; KITAMOTO, K. Biochemical characterization of *hopA*-independent hop resistance mechanism in *Lactobacillus brevis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p. 223-230, 2002.

TAYLOR, M.; FARADAY, D. B. F., O'SHAUGHNESSY, C. L.; UNDERWOOD, B. O., REED, R. J. R. Quantitative determination of fouling layer composition in the microfiltration of beer. **Separation and Purification Technology**, v. 22-23, p. 133-142.

TERSCHURE, E.G.; van RIEL, N. A. W.; VERRIPS, C. T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 67-83, 1995.

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e cervejarias**: A história, a Arte e a Tecnologia. 1. ed. São Paulo: Aden, 2001. 223 p.

VALENCIA E., LARROY, C., OCHOA, W. F., PARÉS, X., FITA, I. AND BIOSCA, J.B. *Apo* and *Holo* Structures of an NADP(H)-dependent Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 341, p. 1049-1062, 2004.

VARNAM, A.; SUTHERLAND, J. **Bebidas**. Tecnología, química y microbiología. Zaragoza: Acribia, 1994. p. 307-365.

VASAVADA A. Improving productivity of heterologous protein in recombinant. *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Applied Microbiol.*, v. 41, p. 25-54, 1995.

VENTURINI FILHO, W. G. **Fécula de mandioca como adjunto de malte na fabricação de cerveja**. 1993. 233 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu-SP, 1993.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *Journal of General Microbiology*, p. 405-12, 1990.

VERDUYN, C. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 60, p. 325-53, 1991.

VICENTE, M. A. **Seleção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com maior capacidade de produção de agentes aromatizantes para utilização na fabricação da cachaça de alambique**. 2003. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2003.

VICENTE, A. M.; CENZANO, I.; VICENTE, J. M. **Manual de indústria dos alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. p. 285-313.

VISSER, R. G. F. **Modification of starch biosynthesis by genetic engineering**. Wageningen: Graduate School experimental Plant Science, Agricultural University, 1998. Disponível em: <<http://www.zestec.nl/crf/starch/Speakers/Visser/abstractvisser.html>>. Acesso em: 12 out. 1998.

ZASTROW, C. R.; STAMBUK, B. U. Transporte e fermentação de açúcares por leveduras da indústria cervejeira. *Revista Univille*, v. 5, n. 1, 2000.

WANG, N. S. **Starch hydrolysis by amylase**. Department of Chemical Engineering, University of Maryland, 1998. Disponível em: <<http://www.engr.umd.edu/~nsw/ench485/lab5.htm>>. Acesso em 12 out. 1998.

WANG, H.T.; RAHAIM, P.; ROBBINS, P.; YOCUM, R. R. Cloning, sequence and disruption of the *Saccharomyces diastaticus* *DAR1* gene encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *J. Bacteriol.*, v. 176, p. 7091-7095, 1994.

WATIER, D.; DUBOURGUIER, H. C.; LEGUERINEL, I.; HORNEZ, J. P. Response surface models to describe the effects of temperature, pH, and ethanol concentration on growth kinetics and fermentation end products of a *Pectinatus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 4, p. 1233-1235, 1996.

WHARTON, D. C.; MCCARTY, R. E. **Experiments and methods in biochemistry**. 1. ed. 1972.

WORONICK, C. L. Alcohol dehydrogenase from human liver. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in Enzymology**, v. 41, p. 369-374.