

GIOVANNA RIBEIRO TREBISACCE

Avaliação de estirpes de bactérias ácido lácticas como
fermento adjunto na produção de cervejas ácidas



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO/2022

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Marco Antônio Lemos Miguel e coorientação do doutor José Roberto Ribeiro.

CIP - Catalogação na Publicação

R784a Ribeiro Trebisacce, Giovanna
Avaliação de estirpes de bactérias lácticas como
fermento adjunto na produção de cervejas ácidas /
Giovanna Ribeiro Trebisacce. -- Rio de Janeiro,
2022.
69 f.

Orientador: Marco Antônio Lemos Miguel.
Coorientador: José Roberto Ribeiro .
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. fermentação. 2. cerveja. 3. bactérias ácido
láticas. I. Antônio Lemos Miguel, Marco , orient.
II. Ribeiro , José Roberto, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO: **Giovanna Ribeiro Trebisacce**
DRE: 118087693

BANCA EXAMINADORA: Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)
Profª. Selma Gomes Ferreira Leite
Profª. Ana Maria Mazotto de Almeida
Profª. Raquel Regina Bonelli (Suplente)

Título da Monografia: **"Avaliação de estirpes de bactérias ácido láticas como
fermento adjunto na produção de cervejas ácidas"**

Local: **Sala I-02/ IMPG / CCS / UFRJ**
Data e hora de início: **10 de novembro de 2022 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 10 de novembro de 2022.

NOTA

10,0

10,0

10,0

Banca Examinadora

Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza

Profª. Selma Gomes Ferreira Leite

Profª. Ana Maria Mazotto de Almeida

Profª. Raquel Regina Bonelli

Aluno:

Giovanna R. Trebisacce

Giovanna Ribeiro Trebisacce

Orientador:

Prof. Marco Antônio Lemos Miguel / Coorientador: Dr. José Roberto Ribeiro

Coordenador
de TCC

Profª. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlo e Mônica, por terem me ensinado a importância de lutar pelos meus sonhos e por terem dedicado tanto esforço para que eu realizasse o meu, e às minhas irmãs Luanda, Michela e Dandara, que me deram força nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me guiado até aqui, pois sem Ele eu jamais teria conseguido. Também agradeço aos meus pais, Mônica e Carlo, que ao longo da minha vida me ensinaram o valor dos estudos, me incentivaram a correr atrás da liberdade que o conhecimento proporciona e nunca deixaram eu desistir. Obrigada pelo investimento, pelos colos, conselhos, orações, marmitas, caronas, mensagens de apoio e por terem cuidado de mim em todas as noites de desespero. Isso aqui é por vocês e para vocês.

Agradeço às minhas irmãs, Luanda, Michela e Dandara, que são as musas inspiradoras que me fazem querer crescer e ser melhor para mim e para o mundo. Obrigada pelas mensagens, pelos abraços, pelos conselhos e pelos mimos. Tudo isso foi combustível para eu continuar seguindo minha trajetória. Agradeço também à Rafaella e Aghata, minhas irmãs postiças que foram indispensáveis para eu chegar até aqui. Obrigada por todo apoio, mesmo estando distantes.

Agradeço ao meu namorado Igor pelas caronas, pelo aconchego, por sempre me ouvir e aturar todas minhas crises e estresses. Obrigada pelas palavras de afeto, por me acalmar e me lembrar diariamente do quanto eu sou capaz. Todo esse amor e cuidado foram essenciais para que eu não desistisse.

Agradeço à minha falecida tia Celda, que sempre me incentivou a fazer faculdade e sempre me ensinou o valor da independência, espero estar te orgulhando onde quer que você esteja.

Ao meu orientador Marcão, que além de orientador, se tornou um amigo e pai postiço e que me orientou para muito além do TCC, me orientou para a vida. Obrigada por confiar em mim e por fazer eu ganhar confiança em mim mesma.

Ao Antonio, ou também conhecido por nós como santo Antonio, por toda ajuda durante os experimentos, por somar tanto no meu conhecimento, por sempre deixar o clima mais leve com nossas risadas, cafés e conversas. Você é eterno na minha vida e marcou minha trajetória profissional.

Ao meu co-orientador José, que me passou diversos conhecimentos e tirou tantas dúvidas minhas. Sou grata especialmente a todas as minhas amigas do laboratório, Agnes, Laura, Lorena, Giovanna, Jéssika, Stella, Scarlatte e Natalia. Agnes, obrigada por ter me acolhido no laboratório e ter me ensinado tantas coisas. Sou grata pelos nossos cafézinhos todas as manhãs, pelas risadas e pelo colo que sempre me deu. Obrigada pelas loucuras que fizemos, por ter ficarmos até tarde juntas, por me fazer andar de ônibus e sempre compartilhar toda sua experiência comigo. Scarlate, obrigada por ter me acompanhado e auxiliado nos experimentos, além de sempre me passar tanta paz. Obrigada pelos dias em que compartilhamos doces e guaravitas, sempre vou guardar no coração esses momentos simples que aliviaram meus dias de estresse. Lorena, obrigada pela força que sempre me passou, por ter feito eu acreditar que eu era capaz e por não ter deixado que eu desistisse. Giovanna, minha xará, obrigada por ser minha dupla nas aulas de Microbiologia de Alimentos e no fluxo. Laura, obrigada por sempre ter as sacadas mais engraçadas e arrancar as gargalhadas mais sinceras. Jéssika, obrigada pela paciência em ensinar a

mexer em todos os programas, pelos papos sobre Flamengo e assuntos reflexivos sobre a vida. Stella e Natalia, obrigada por serem sempre tão atenciosas e solícitas, também sempre tornando os dias mais leves. Sou grata a toda minha equipe e as amizades que vou levar pra sempre.

Agradeço também à Adrielly, que me ensinou e inspirou ao longo desse caminho. Obrigada por ser força e me passar tanta força, por fazer eu acreditar em mim mesma e lutar por isso. Obrigada pelos seus doces que adoçavam meus dias. Obrigada pelo seu companheirismo, pelo seu colo e por todas as risadas que tornaram esse trajeto mais leve. Você faz parte da minha vida e da minha história para sempre. Também agradeço à Juliana, que dividiu tantos resumos de matéria comigo, que virou noites de estudo para irmos bem nas provas, que acolheu minhas dores e cuidou de mim como uma irmã. Amo vocês, minhas meninas.

Ao Yan, agradeço por ter sido meu melhor amigo da faculdade, parceiro de surtos, estresses, dúvidas e que nunca deixou de me incentivar. Obrigada por sempre ter as palavras certas nos momentos em que mais precisei.

Agradeço aos meus melhores amigos Arthur, Maria e Ana, por todas as vezes que me ouviram, aconselharam e não deixaram eu desistir. Obrigada pela força e incentivo de vocês, isso me motiva a ser melhor todos os dias. Por fim, agradeço a todos os professores e funcionários do IMPPG.

RESUMO

GIOVANNA RIBEIRO TREBISACCE

Avaliação de estirpes de bactérias lácticas como fermento adjunto na produção de cervejas ácidas

Orientador: Marco Antônio Lemos Miguel

Coorientador: José Roberto Ribeiro

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O mercado cervejeiro vem mostrando um crescimento significativo no Brasil nos últimos dez anos. Atualmente ele ocupa a terceira posição entre os países fabricantes e consumidores de cerveja em relação ao volume consumido. Junto a isso, soma-se a diversidade de cervejas artesanais que representam uma importante mudança no mercado nacional, correspondendo a 3% do comércio total de cerveja no país. Apesar de todo este crescimento e de sua rica biodiversidade, a cerveja produzida no Brasil ainda não adquiriu uma identidade própria. Entretanto, as cervejas leves e refrescantes têm sido a preferência nacional, como as Pilsen, entre outras Lagers. O uso de insumos cervejeiros como fermentos e lúpulo, quase que exclusivamente importados, também reflete a incompleta participação do Brasil neste mercado. Na cidade de Blumenau (Santa Catarina), iniciou-se um movimento que levou algumas microcervejarias locais a definirem um estilo de cerveja ácida, que foi considerado próprio da cidade. Ela foi chamada de Catarina Sour. Ainda que este apresente um sabor atípico para o atual paladar do consumidor brasileiro, as cervejas ácidas vão de encontro às características sensoriais desejáveis no Brasil em função de sua típica refrescância. Visando o futuro desenvolvimento de uma cerveja ácida com características sensoriais distintas, este estudo tem como objetivo avaliar o uso de bactérias ácido lácticas como fermentos adjuntos para a produção de cervejas ácidas. As estirpes de bactérias lácticas utilizadas fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IMPG/UFRJ, e foram previamente isoladas de alimentos, sendo elas: *Lactobacillus plantarum* (LP01), *Enterococcus faecium* (E86), *Lactococcus lactis* (61). Foram utilizadas como controle as estirpes de coleções internacionais (*Lactobacillus casei delbrueckii* CCT 3744, *Lactobacillus sakei* STCC 906, *Lactobacillus casei rhamnosus* GG ATCC 53103, *Lactobacillus brevis* 00221 (estirpe controle) e *Saccharomyces cerevisiae* US-05. As estirpes foram testadas quanto à capacidade de acidificar o mosto convencional e enriquecido com 2% de sacarose ou maltose, resistência ao mosto adicionado de lúpulo (2,5 a 7,5 IBU), crescimento em concentrações de 2 e 5% de etanol (vol./vol.) e multiplicação em co-cultivo com leveduras em mosto cervejeiro. A quantificação dos microrganismos foi realizada por contagem de células por microscopia na câmara de Neubauer e cultivo em ágar MRS. Ao longo dos experimentos, o crescimento dos microrganismos no mosto cervejeiro foi monitorado pela avaliação do pH e

densidade do mosto, verificada por refratometria. As estirpes *Lactobacillus plantarum* (LP01) e *Lactobacillus brevis* 00221 apresentaram uma boa acidificação do mosto convencional, mosto lupulado e mosto com adição de etanol em diferentes concentrações. As duas estirpes apresentaram um bom crescimento nos diferentes mostos testados, mas não reduziram a densidade do mosto como o esperado. Dessa forma, conclui-se que *Lactobacillus plantarum* LP01 mostrou potencial capacidade de ser um fermento adjunto na produção de cervejas ácidas.

Palavras-chave: fermentação, cerveja ácida, bactérias lácticas.

ABSTRACT

GIOVANNA RIBEIRO TREBISACCE

Evaluation of lactic acid bacteria strains as adjunct ferment in the production of sour beers

Orientador: Marco Antônio Lemos Miguel

Coorientador: José Roberto Ribeiro

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The beer commercialization has been showing significant growth in Brazil in the last ten years. Currently, it occupies the 3rd position among beer brewing and consuming countries in relation to the volume consumed. In addition, the number and diversity of craft beers has increasing also, corresponding to 3% of the total beer trade in Brazil. Despite all this growth and its rich biodiversity, the beer produced in Brazil has not yet acquired its own identity. However, light and refreshing beers have been the national preference, such as Pilsen, among other Lagers. The use of brewing ingredients acquired from foreign trade, such as yeast and hops, also reflects Brazil's incomplete participation in this market. In the city of Blumenau (Santa Catarina state - Brazil), a movement began that led some local craft breweries to define a style of sour beer, which was considered typical of the city. She was called Catarina Sour. Although it has an atypical flavor for the current taste of Brazilian consumers, sour beers meet the desirable sensory characteristics in Brazil due to their typical freshness. Aiming at the future development of a sour beer with distinct sensory characteristics, this study aims to evaluate the use of lactic acid bacteria as adjunct ferment to produce sour beers. The following strains of lactic acid bacteria used are part of the culture collection of the Laboratory of Food Microbiology at IMPG/UFRJ, and were previously isolated from foods: *Lactobacillus plantarum* (LP01), *Enterococcus faecium* (E86), *Lactococcus lactis* (61). Strains from international collections (*Lactobacillus casei* subsp. *delbrueckii* CCT 3744, *Lactobacillus sakei* STCC 906, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG ATCC 53103, *Lactobacillus brevis* 0022 (contro1) and *Saccharomyces cerevisiae* US-05) were used as controls. Concentration sucrose or maltose, resistance to wort added with hops (2,5 to 7,5 IBU), growth in concentrations of 2 and 5% ethanol (vol./vol.) and multiplication in co-cultivation with yeasts in brewer's wort. The microorganisms were counted by microscopy in a Neubauer chamber and cultivation on MRS agar. Throughout the experiments, the growth of microorganisms in the brewer's wort was monitored by evaluating the pH and density of the wort, verified by refractometry. The strains *Lactobacillus plantarum* LP01 and *Lactobacillus brevis* 00221 showed good acidification of conventional wort, hopped wort and wort with the addition of ethanol at

different concentrations. The two strains showed good growth in the different musts tested, but did not reduce the must density as expected. Thus, it is concluded that *Lactobacillus plantarum* LP01 showed potential ability to be an adjunct yeast in the production of acidic beers.

Key-words: fermentation, sour beer, lactic acid bacteria.

RESUMO PARA LEIGOS

GIOVANNA RIBEIRO TREBISACCE

**Avaliação de estirpes de bactérias lácticas para uso como fermento adjunto na indústria
cervejeira**

**Orientador: Marco Antônio Lemos Miguel
Coorientador: José Roberto Ribeiro**

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Apesar do Brasil ser o terceiro país que mais produz e consome cerveja no mundo, ele ainda depende de alguns ingredientes importados para garantir sua produção, como o lúpulo e o fermento. Da mesma forma, apesar de sua importância no mercado cervejeiro mundial, o país não apresenta uma cerveja que possa ser considerada tipicamente brasileira. Existem diversos tipos de cervejas, mas nem todas se enquadram no paladar do consumidor brasileiro, que prefere cervejas leves e refrescantes. Um tipo de cerveja ácida, produzida na cidade de Blumenau, no estado de Santa Catarina, é o resultado de um movimento de pequenas cervejarias para produzir e promover este tipo de cerveja como uma cerveja típica da região. As cervejas ácidas apresentam sabor e aroma diferentes da preferência nacional, mas sua característica refrescante e a possibilidade de associação com outros sabores pode representar um potencial para o aumento no seu consumo. Em função da necessidade de fazer o Brasil se tornar mais participativo no mercado de ingredientes cervejeiros, além de caminhar no sentido de criar um estilo próprio de cerveja, este estudo se propôs a procurar bactérias, que quando utilizadas juntamente com as leveduras, que são os fermentos cervejeiros típicos, possam produzir uma cerveja ácida de qualidade, resultando na disponibilização de um fermento cervejeiro nacional. Para produção de cerveja ácida, as bactérias ácido lácticas (muito comuns na produção de iogurte), são utilizadas para acidificar a cerveja. Nossa equipe propôs um estudo com diferentes bactérias ácido lácticas que foram submetidas a alguns testes, como a capacidade de acidificação e redução da densidade do mosto (líquido açucarado que antecede a produção da cerveja), capacidade de se multiplicarem nesse meio e co-fermentação com levedura. As bactérias testadas foram capazes de crescer bem no mosto, mesmo em condições de estresse para a célula bacteriana (presença de lúpulo e etanol), além de terem acidificado de maneira desejável a produção desse estilo de cerveja. Entretanto, não reduziram a densidade como o esperado. Quando testadas em co-fermentação com levedura, tiveram um bom crescimento e reduziram o pH do mosto de maneira desejável. Dessa forma,

conclui-se que a estirpe testada (*Lactobacillus plantarum LP01*) apresentou potencial capacidade em ser um fermento adjunto utilizado na produção de cervejas ácidas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O primeiro registro sobre cerveja – Monumento Blau (4000 a.C) mostra a cerveja sendo oferecida à deusa suméria NinHarra.....	21
Figura 2. Tipos de cerveja de acordo com o método de fermentação.....	27
Figura 3. Fluxograma das etapas de produção de cerveja e seus reservatórios típico na indústria.....	37
Figura 4. Técnicas de produção de <i>sour beer</i> . (A) Processo de produção tradicional com fermentação espontânea. (B) Pré-fermentação com BAL, seguida de fermentação com levedura. (C) Co-fermentação com levedura e BAL. (D) Fermentação secundária com BAL com carboidratos derivados da madeira como substrato.....	39
Figura 5. Crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> LP01 (A) e <i>Lactobacillus brevis</i> 00221 (B) em mosto com diferentes valores de IBU.....	51
Figura 6. Variação do pH durante o crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> LP01 (A) e <i>Lactobacillus brevis</i> 00221 (B) em mosto com diferentes valores de IBU.....	52
Figura 7. Crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> LP01 (A) e <i>Lactobacillus brevis</i> 00221 (B) em mosto com diferentes concentrações de etanol.....	53
Figura 8. Variação do pH durante o crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> LP01 (A) e <i>Lactobacillus brevis</i> 00221 (B) em mosto com diferentes concentrações de etanol.....	54
Figura 9. Efeito do co-cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> US-05 e <i>Lactobacillus plantarum</i> LP01 (A) e de <i>S. cerevisiae</i> US-05 cultivada isoladamente (B) em mosto cervejeiro.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais países produtores de cerveja em 2020.....	24
Tabela 2. Principais países consumidores de cerveja em 2021 (por volume total).....	24
Tabela 3. Enzimas envolvidas no processo de mosturação e suas condições ideais de atividade.....	32
Tabela 4. Avaliação da atenuação do mosto cervejeiro por bactérias ácido lácticas.....	50
Tabela 5. Efeito de diferentes concentrações de iso- α -ácidos na multiplicação e atenuação do mosto por <i>Lactobacillus plantarum</i> LP01 e <i>Lactobacillus brevis</i> 00221.....	52
Tabela 6. Crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> LP01 e <i>Lactobacillus brevis</i> 00221 em mosto contendo diferentes concentrações de etanol.....	54

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
RESUMO PARA LEIGOS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Definição de cerveja.....	18
1.2 História da cerveja.....	20
1.3 Aspectos sociais e nutricionais da cerveja.....	21
1.4 O mercado cervejeiro.....	23
1.5 Fermentos cervejeiros.....	26
1.5.1 Características desejáveis dos fermentos cervejeiros.....	27
1.6 Cervejas produzidas com leveduras diferentes de <i>Saccharomyces</i>	29
1.7 Tecnologia da produção de cerveja.....	30
1.8 Produção de cervejas ácidas.....	37
1.9 Fermentos cervejeiros bacterianos.....	39
1.9.1 O papel das BAL na produção de cerveja.....	40
1.9.2 <i>Lactobacillus brevis</i>	41
1.9.3 <i>Lactobacillus plantarum</i>	41
1.10 Legislação de acesso a patrimônio genético.....	42
2 JUSTIFICATIVA.....	44
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivos específicos.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Origem das estirpes.....	46
4.2 Manutenção e ativação das estirpes.....	46
4.3 Contagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> US-05 para inóculo.....	47

4.4 Preparo do mosto.....	47
4.5 Preparo do inóculo para os testes de fermentação.....	47
4.6 Capacidade de acidificação do mosto cervejeiro.....	48
4.7 Avaliação da Graduação alcoólica.....	48
4.8 Avaliação do pH.....	48
4.9 Resistência ao lúpulo.....	48
4.10 Resistência ao etanol.....	49
4.11 Avaliação da co-fermentação entre <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> US-05 na produção de cerveja.....	49
4.12 Análise estatística.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Resistência ao lúpulo.....	51
5.2 Resistência ao etanol.....	53
5.3 Avaliação da fermentação simultânea do mosto por bactérias lácticas e leveduras.....	54
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÃO.....	61
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição de cerveja

A cerveja é uma bebida alcoólica produzida a partir da fermentação de carboidratos derivados do amido presente em cereais maltados como a cevada, trigo e milho. Seus ingredientes principais são água, malte, fermento cervejeiro e lúpulo, que de acordo com a combinação do uso de diferentes variedades ou tratamentos tecnológicos, pode resultar em uma infinidade de sabores, cores e aromas. Além disso, podem ser utilizados outros ingredientes, de acordo com o objetivo comercial ou sensorial do produto. Fatores tecnológicos, como a temperatura da fermentação, também podem afetar as características da cerveja (Carvalho, Rossi e Silva, 2007; Afonso e Rosa, 2014).

A lei da pureza alemã, também conhecida como "Reinheitsgebot", é considerada a mais antiga lei em aplicação atualmente, e foi criada pelo Duque de Baviera - Guilherme IV. Ela determina que a cerveja deveria ser fabricada apenas com os seguintes ingredientes: água, malte de cevada e lúpulo. Nessa época, a levedura de cerveja ainda não era conhecida, mas hoje é aceita dentro dos parâmetros da lei. Essa lei tinha como principal objetivo estabelecer os preços de alguns estilos de cerveja da época. Além disso, a restrição da fabricação com grãos de cevada visava proibir a utilização dos grãos de trigo e centeio, pois eram necessários para a fabricação do pão, e muitas vezes ficavam em falta pela grande demanda dos cervejeiros (Geitner, 2011). Embora esta lei ainda seja uma tradição em alguns estilos de cerveja, vários outros componentes foram incorporados ao longo dos anos e amplamente aceitos.

Além da "Lei da Pureza", ou "Reinheitsgebot", outra referência jurídica diretamente ligada à produção da cerveja foi o Código de Hamurabi da Babilônia (1.770 a.C.), que é a mais antiga lei que se tem conhecimento e se baseava na Lei do Talião, que punia um criminoso de forma semelhante ao crime cometido, ou seja, "olho por olho, dente por dente". Hamurabi foi o fundador do primeiro Império Babilônico e a lei criada por ele declarava pena de morte aos que diluíssem a cerveja que vendiam (Kelly, 2019).

Segundo a legislação brasileira - Instrução Normativa No. 65 de 10 de dezembro de 2019 (IN65), para que uma bebida seja chamada de cerveja ela deve ser resultante da fermentação realizada por leveduras cervejeiras em mosto de cevada malteada ou de extrato de malte,

submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo. No processo pode ser considerada também a múltipla fermentação, onde são utilizados outros fermentos, inclusive bactérias. Além disso, podem ser acrescentados adjuntos cervejeiros que são matérias-primas que substituam, em até 45% em peso em relação ao extrato primitivo, o malte ou o extrato de malte na elaboração do mosto cervejeiro. Entende-se por extrato primitivo a quantidade de substâncias dissolvidas (extrato) do mosto que deu origem à cerveja, que deve ser sempre maior ou igual a 5,0% em peso. São utilizados como principais adjuntos a cevada cervejeira não malteada e os demais cereais malteados ou não-malteados, aptos para o consumo humano como alimentos, como trigo, milho e arroz. Também são considerados adjuntos cervejeiros o mel e ingredientes de origem vegetal, fontes de amido e de açúcares, também aptos para o consumo humano como alimento. Estes devem estar presentes em quantidade menor ou igual a 25% em peso em relação ao extrato primitivo (MAPA, 2019). A malteação é o processo composto pela indução da germinação das sementes e interrupção desta pelo calor. Durante a germinação, a semente produz enzimas, que posteriormente serão utilizadas na produção da cerveja, como aquelas capazes de quebrar o amido em açúcares menores, que serão utilizados pelos fermentos.

Segundo a IN65 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, as cervejas podem ser classificadas em relação à proporção de sua matéria prima, como: "cerveja 100% malte" ou "cerveja puro malte" quando elaborada a partir de um mosto, cujo extrato primitivo provém exclusivamente de cevada malteada ou de extrato de malte; "cerveja 100% malte de (nome do cereal malteado)" ou "cerveja puro malte de (nome do cereal malteado)", quando elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo provém exclusivamente de outro cereal malteado; "cerveja de (nome do cereal que compõe até 80% em peso da totalidade dos adjuntos cervejeiros)", quando elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo provém majoritariamente de adjuntos cervejeiros, com o mínimo de 20% em peso de malte de cevada ou malte de (nome do cereal utilizado).

Em relação ao seu conteúdo alcoólico, elas podem ser classificadas como:

I- "cerveja sem álcool" ou "cerveja desalcooolizada", aquela cujo conteúdo alcoólico é inferior ou igual a 0,5% em volume, que significa 0,5% volume/volume (v/v);

II - "cerveja com teor alcoólico reduzido" ou "cerveja com baixo teor alcoólico", aquela cujo conteúdo alcoólico é superior a 0,5% em volume (0,5% v/v) e inferior ou igual a 2,0% em volume (2,0% v/v); ou

III - "cerveja", aquela cujo conteúdo alcoólico é superior a 2,0% em volume (2,0% v/v). (Brasil, 2019)

1.2 História da cerveja

A origem da cerveja está diretamente relacionada com a origem da civilização humana, há aproximadamente 10 mil anos. À medida em que parte dos seres humanos mudou da condição de caçadores e coletores para uma sociedade agrícola, surgiram também as “bebidas sagradas”, resultantes da fermentação espontânea de frutas e cereais, cujo efeito entorpecente era vinculado ao poder divino e conexão com as entidades (Meussdoerffer, 2009).

Os primeiros registros sobre a cerveja foram pictogramas encontrados na Suméria, atual Iraque, e tratava-se de um dicionário sobre termos cervejeiros (figura 1). A região foi também o sítio da primeira linguagem escrita conhecida, além de ser um lugar em que a cevada crescia em estado selvagem. Segundo estes registros, no período de 2100 a.C., os sumérios alegravam-se com uma bebida fermentada obtida de cereais, período em que o processo empírico de fermentação foi descoberto pela humanidade e as primeiras bebidas alcoólicas foram produzidas. Esses documentos mostram que a bebida era difundida na sociedade, principalmente no contexto de ofertas aos templos. Além disso, também era utilizada como veículo para tratar os doentes com ervas medicinais. Acredita-se que a fabricação de cerveja difundiu-se da região da Mesopotâmia ao Egito, onde se tornou a bebida básica deste país em todos os níveis sociais, do Faraó aos camponeses (Sewell, 2014).



Figura 1. O primeiro registro sobre cerveja - Monumento Blau (4000 a.C) mostra a cerveja sendo oferecida à deusa suméria NinHarra. Fonte: <https://opabier.com.br/blog/historia-da-cerveja-no-mundo/>

Por conterem os mesmos ingredientes, acredita-se que a cerveja tenha sido descoberta por meio de um processo de fermentação não intencional da cevada utilizada para o preparo do pão. Mais tarde, o que havia sido acidental foi transformado num processo padronizado de fabricação (Meussdoerffer, 2009).

Alguns dados históricos também sugerem que o início da produção da cerveja tenha ocorrido quase que simultaneamente na Europa, onde os mosteiros tiveram grande importância neste processo. Com a expansão do Sacro Império Romano na Europa, diversos mosteiros foram construídos e muitos desses se tornaram centro de produção cervejeira. Inicialmente, a maior parte destes ficavam localizados no Sul da Europa, uma vez que o clima desta região permitia o cultivo de uvas e a consequente produção de vinho. Entretanto, a expansão continuou para o Norte da Europa, região mais fria que facilitou o cultivo de cevada. Assim iniciou-se a produção cervejeira denominada de “fabricação monástica”, a qual contava com o emprego de diversas ervas para aromatizar a bebida, como louro, gengibre e lúpulo (Poelmans e Swinnen, 2011).

1.3 Aspectos sociais e nutricionais da cerveja

A cerveja, assim como outras bebidas alcoólicas, exerce um importante papel social, onde já foi associada a atos religiosos, como oferendas, moeda ou até mesmo lazer. Seu consumo é considerado democrático, uma vez que é realizado por todas as classes sociais (Hales, 2010).

Na Idade Média os monges costumavam beber em torno de cinco litros de cerveja por dia. Isto justifica-se devido às condições higiênico-sanitárias da época, uma vez que consumir bebida alcoólica era mais seguro do que consumir água, já que a fermentação e o álcool inibiam os microrganismos patogênicos. Ela também era consumida como forma de refeição, já que os

cereais mantêm suas propriedades nutritivas. Além das razões nutricionais, a cerveja também era frequentemente usada em mosteiros para fins espirituais e medicinais (Poelmans e Swinnen, 2011).

Como outras bebidas fermentadas, a cerveja contém quantidades significativas de vitaminas do complexo B, principalmente folatos e riboflavina, além de selênio. A capacidade antioxidante da cerveja pode ser comparada à do vinho devido à presença de compostos antioxidantes. Entre eles estão o ácido ferúlico, catequina e a quercetina, que demonstram a capacidade de quelar radicais livres e inibir a enzima lipoxigenase, que promove o início da ruptura dos ácidos graxos insaturados (Siqueira, Bolini e Macedo, 2008). O lúpulo também é considerado uma erva com propriedades medicinais devido à presença de beta-ácidos, que possuem propriedades antimicrobianas, sendo considerado um antibiótico e um anti-inflamatório natural (Siqueira, Bolini e Macedo, 2008).

Alguns ensaios clínicos sugerem que o consumo moderado de cerveja resulte em benefícios para a saúde humana, principalmente devido aos antioxidantes (De Gaetano *et al.*, 2016), efeitos anti-inflamatórios (Chiva-Blanch *et al.*, 2015) e redução do risco de doenças cardiovasculares (Martinez, Urpi-Sarda *et al.*, 2010; Chiva-Blanch *et al.*, 2015; De Gaetano *et al.*, 2016). Os antioxidantes geralmente apresentam efeitos biológicos benéficos, prevenindo o estresse oxidativo e reduzindo o dano oxidativo às células. Os compostos fenólicos na cerveja incluem flavonóides como xanthohumol e não flavonóides como ácidos fenólicos, ambos amplamente encontrados (Venturelli *et al.*, 2016; Osorio-Paz, Brunauer e Alavez, 2020). Compostos fenólicos em cervejas também exercem atividades biológicas para prevenir o desenvolvimento de câncer, osteoporose, diabetes e doenças neurodegenerativas (Graf, Milbury e Blumberg, 2005; Chen *et al.*, 2010; De Gaetano *et al.*, 2016).

Além disso, a abstinência de álcool foi associada a um maior risco de demência em comparação com consumo de 1 à 14 unidades de álcool por semana. Uma unidade de bebida padrão representa uma forma simplificada de medir o volume de álcool puro numa bebida alcoólica, sendo usada em vários países para orientar e facilitar o cálculo da ingestão diária ou semanal de álcool. Neste caso, assume-se que uma unidade representa 10 a 12 gramas de álcool, que é o valor comum para uma dose da maioria das bebidas alcoólicas. A Organização Mundial da Saúde estabeleceu um valor máximo diário de 2 unidades diárias (20 g álcool). Cerca de duas latas de cerveja ou duas taças de vinho, diminuiu a incidência de demência em 47%. Por outro

lado, entre os indivíduos que bebiam mais de 14 unidades/semana, um aumento de 7 unidades no consumo de álcool foi associado a um aumento de 17% no risco de demência (Sabia *et. al*, 2018). Ainda que apresente benefícios nutricionais cientificamente comprovados, a natureza alcoólica da bebida é um fator restritivo a determinados grupos de consumidores, que exige atenção quanto ao volume de consumo pela população. Segundo a legislação brasileira atual, quem vender, fornecer, servir, ministrar ou entregar bebida alcoólica de qualquer forma à criança ou adolescente pratica crime e será punido com pena de detenção, com duração de 2 a 4 anos (Lei nº. 8.069/90, art. 243). Além disso, também não é recomendado o consumo de álcool por grávidas, visto que o álcool pode causar crescimento retardado, defeitos congênitos e danos cerebrais no feto.

Em 2011, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) adotou o “Plano de Ação para Reduzir o Uso Prejudicial do Álcool” (documento CD51/8, Rev. 1), que estabelece uma estratégia global para reduzir o uso nocivo do álcool. Dessa forma, o Plano de Ação visa identificar o consumo prejudicial do álcool por menores de idade como prioridade de saúde pública, promover programas de prevenção que eduquem crianças e jovens sobre como resistir à pressão social da bebida, assegurar que a prevenção eficaz, tratamento e serviços de atenção sejam acessíveis aos afetados pelo uso prejudicial do álcool e alocar recursos financeiros, técnicos e humanos para a implementação das atividades nacionais descritas no Plano de Ação (OMS, 2011).

1.4 O mercado cervejeiro

A cultura da produção artesanal de cerveja foi importante para sua difusão ao longo dos anos ao redor do planeta. Atualmente, sua produção e comercialização resultam principalmente de grandes operações industriais realizadas por empresas que exploram o mercado regional ou internacional.

Em 2021, o número de estabelecimentos produtores de cerveja artesanal registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) atingiu a marca de 1.549, o que representa um aumento de 12,0% em relação ao ano anterior, quando haviam 1.383 cervejarias registradas. Em 2021 foram registradas 200 novas cervejarias e outras 34 cancelaram seus registros, o que corresponde a um aumento líquido de 166 cervejarias em relação ao ano anterior. Apesar de toda a crise enfrentada devido à pandemia do COVID-19, o setor cervejeiro foi

destaque em 2020 e 2021. Como exemplo, a American Beverage Company (Ambev), que é a maior cervejaria do mundo, registrou crescimento nas vendas do segundo trimestre de 2021 em 115,9% quando comparado com o mesmo período de 2020 (Ferrari, 2021).

O mercado cervejeiro como um todo vem mostrando um crescimento significativo ao redor do mundo, onde a cerveja é bebida alcoólica líder globalmente. Neste comércio, o Brasil ocupa a 3º posição entre os países fabricantes e entre os consumidores de cerveja (tabelas 1 e 2).

De acordo com o estudo da Credit Suisse e Statista, o brasileiro ingere, em média, seis litros de cerveja por mês. O gasto médio por semana é de R\$ 46, totalizando R\$ 184 mensalmente, o que representa 16% do custo do salário mínimo nacional (Macedo, 2021).

Tabela 1. Principais países produtores de cerveja em 2020

País	Ranking de produção	Milhões de hectolitros
China	1º	341
EUA	2º	211
Brasil	3º	151
México	4º	107
Alemanha	5º	87

Fonte: Barth Hass (2020)

Tabela 2. Principais países consumidores de cerveja em 2021 (por volume total)

País	Ranking de produção	Consumo mundial (%)
China	1º	27
EUA	2º	13
Brasil	3º	7
Rússia	4º	5
Alemanha	5º	5

Fonte: Credit Suisse e Statista (2021)

Um fator que tem estimulado o aumento do número de consumidores é o aumento da disponibilidade de cervejas artesanais, que representou uma importante mudança no mercado nacional. Em 2020, o mercado artesanal representava 3% do comércio total de cerveja no país (Diário do Comércio, 2020).

Apesar da importância do Brasil no mercado cervejeiro mundial e de sua rica biodiversidade, o Brasil ainda é dependente de insumos importados. Este fato parece estar lentamente sendo modificado, como resultado da crescente produção de insumos cervejeiros nacionais.

A procura por cevada é crescente, assim como a produção cervejeira. Depois da água, ela é a matéria prima mais volumosa para a produção de cerveja. De acordo com a Agência de Notícias do Paraná (ANP), o maior produtor nacional de cevada é o Paraná, que em 2019 foi responsável por cerca de 60% do volume produzido no país. Além disso, segundo a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CervBrasil), o mercado brasileiro consome, em média, 1,5 milhão de toneladas de malte de cevada todos os anos. Desse valor, a produção nacional é responsável por 335 mil toneladas, representando cerca de 22%. Para cumprir com a demanda, importa-se cerca de 73% da Argentina e Uruguai, enquanto a Europa fornece 5%. Por conta disso, o Brasil ocupa o 11º lugar entre os maiores importadores de cevada do mundo. Em 2019 o país importou 1,09 milhão de toneladas de malte, ficando em primeiro lugar entre os maiores importadores mundiais de malte. A necessidade de importação ocorre principalmente por conta de fatores climáticos, tendo como principais obstáculos na produção as altas temperaturas e o excesso de chuvas (ANP, 2020).

Em relação ao lúpulo, de acordo com um levantamento realizado pela Associação Brasileira de Produtores de Lúpulo (Aprolúpulo), o Brasil tem cerca de 42 hectares cultivados, o que representa um crescimento de 110% com relação ao ano de 2019, e a produção total aproximada gira em torno de 24 toneladas. Os principais estados produtores são Santa Catarina, com 27% da produção, seguido por Rio Grande do Sul (22%), São Paulo (18%), Paraná (7%), Minas Gerais (6%) e Rio de Janeiro (5%) (Portal do Agronegócio, 2021). Entretanto, o país ainda importa praticamente 100% do lúpulo utilizado na produção industrial de cerveja.

Outro insumo importante é o fermento, ingrediente responsável pela fermentação que ocorre no mosto, resultando na bebida final. Apesar de sua rica biodiversidade, o Brasil utiliza fermentos comerciais importados.

A característica e personalidade da cerveja pode estar relacionada com as características dos insumos utilizados e dos aspectos tecnológicos. Em relação a eles, principalmente às condições climáticas, geográficas e do solo, podem conferir particularidades às matérias primas que vão conferir características distintas no produto.

Muito tem se experimentado em termos de ingredientes e misturas durante a fermentação cervejeira nos últimos anos. Variedades de lúpulos e maltes, assim como a adição de frutas e outros vegetais ao processo são frequentemente apresentadas em feiras e novos produtos comercializados. Apesar de seu importante papel nas características sensoriais do produto, pouco tem se inovado em relação aos fermentos na produção industrial.

1.5 Fermentos cervejeiros

As leveduras são organismos pertencentes ao domínio *Eukarya* e Reino *Fungi*, geralmente unicelulares de tamanhos e formas variados. Geralmente se reproduzem assexuadamente por brotamento, mas também podem crescer pela formação de pseudohifas e hifas (Kurtzman, Fell e Boekhout, 2011). Possuem um papel relevante na indústria alimentar devido às suas aplicações na panificação e na produção alcoólica. Além disso, pelas propriedades nutricionais destas células, como o teor de proteínas, minerais e vitaminas, especialmente as do complexo B, elas são empregadas para o enriquecimento das dietas humanas e animais.

As principais leveduras utilizadas na indústria cervejeira são do gênero *Saccharomyces*, sendo as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* (também conhecida como *S. Carlsbergensis*) as mais utilizadas. *S. pastorianus* é o resultado de uma hibridização entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces eubayanus* (Libkind *et. al.*, 2011).

De acordo com a levedura a ser utilizada na produção, originam-se dois estilos de cerveja: *Ale* e *Lager* (figura 2). As cervejas conhecidas como *Ale* utilizam a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que possui grande tolerância ao álcool, sendo capaz de produzir cervejas mais fortes. Neste estilo a fermentação ocorre em temperaturas entre 15 e 25 °C, quando são utilizadas temperaturas mais baixas a fermentação ocorre muito lentamente, o que resulta em menor rendimento alcoólico. Ao final desse processo, produz uma fina camada de espuma cremosa na superfície do tanque, sendo conhecida como levedura de alta fermentação (Karabin *et al.*, 2018).

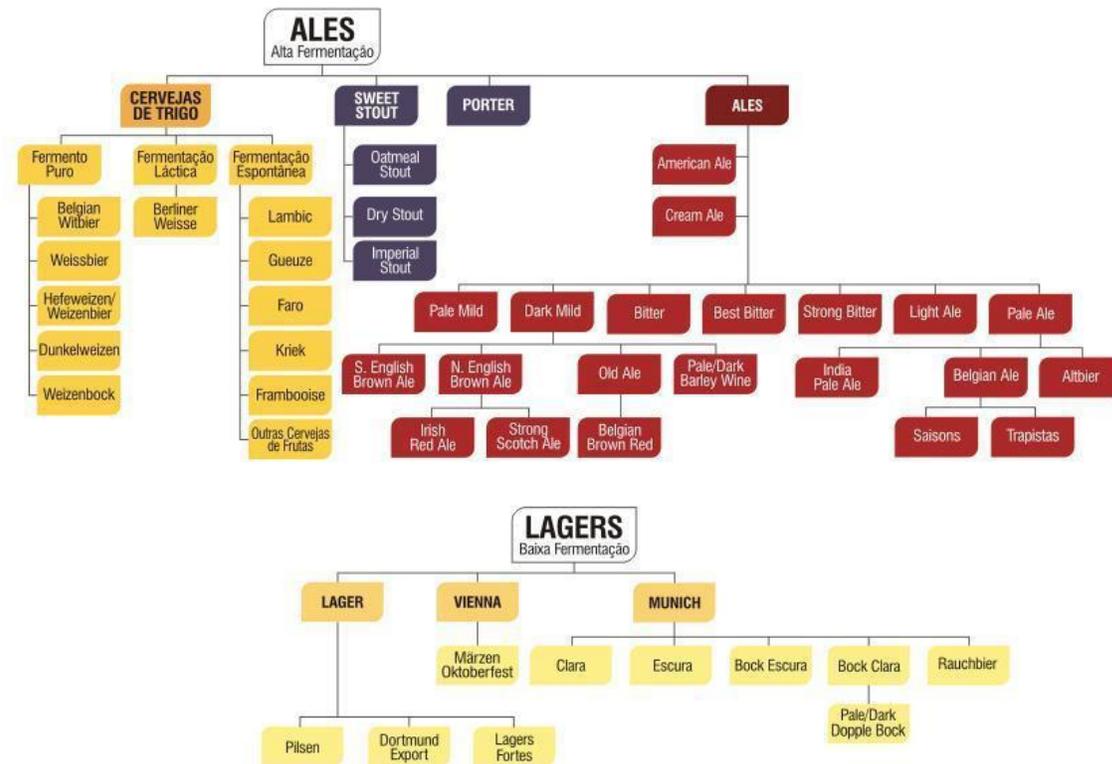


Figura 2. Tipos de cerveja de acordo com o método de fermentação. Fonte: <https://www.papodebar.com/wp-content/uploads/2008/06/img-estacao-beerstypetree-1.jpg>.

As cervejas *lager* utilizam a *Saccharomyces pastorianus*. Essa levedura apresenta um perfil de fermentação mais suave em função da menor tolerância ao álcool. A fermentação ocorre em temperaturas entre 9 e 15 °C, produzindo estilos mais leves em termos de aromas da fermentação, como as cervejas Pilsen. Na maioria dos casos, ao final da fermentação as leveduras concentram-se no fundo do fermentador e percebe-se pouca espuma na superfície, sendo por isso, conhecida como levedura de baixa fermentação (Karabin *et al.*, 2018).

1.5.1 Características desejáveis dos fermentos cervejeiros

Atualmente, para uso industrial existe uma pequena diversidade de fermentos cervejeiros quando comparado com a diversidade de estilos e marcas existentes. Entretanto, em sua quase totalidade, estes são oriundos de outros países, que não o Brasil (Bonatto, 2021). Estes fermentos normalmente são adaptados ou selecionados para desempenhar papéis específicos, que trazem

vantagem comercial ou sensorial ao processo ou produto. Segundo Saini *et al.*, (2018), entre estas vantagens estão:

- produção de uma cerveja sensorialmente agradável;
- velocidade do processo;
- resistência à pressão osmótica elevada do mosto concentrado;
- capacidade de atenuação de diferentes mostos (ex.: trigo);
- resistência a elevadas concentrações de etanol ou lúpulo;
- alta capacidade de agregação, que facilita na separação das células do líquido final.

A cerveja é ácida, com pH variando de pH 3,8 a 4,7, que é menor do que a maioria das bactérias pode tolerar para crescimento. Além disso, a alta concentração de dióxido de carbono (aproximadamente 0,5% p/p) e o teor extremamente baixo de oxigênio (< 0,1 ppm) torna a cerveja um meio anaeróbico. A cerveja também contém compostos de lúpulo como isoácidos (aproximadamente 17 a 55 ppm), que são tóxicos, especialmente para bactérias Gram-positivas (Sakamoto e Konings, 2003).

Os fermentos cervejeiros são submetidos a diversos estresses ambientais que influenciam no resultado da fermentação. Da mesma forma, sua fisiologia deve favorecer as manobras tecnológicas da produção, ser rápidas na fermentação e conferir características sensoriais adequadas ao produto. Uma importante característica dos fermentos cervejeiros é a capacidade de metabolização rápida do açúcar presente no mosto para a redução do custo operacional dos tanques de fermentação, além de diminuir os riscos de contaminação durante o processo (Vidgren *et al.*, 2010).

Uma vez que trata-se de um produto já fermentado, a cerveja é um ambiente pobre e bastante hostil para a maioria dos microrganismos. Sua concentração de etanol nas cervejas mais comercializadas está em torno de em torno de 4 à 14,9% (p/p) (Amaro *et al.*, 2009), mas existem cervejas com concentrações extremas de álcool, que podem atingir 70% (Clube do malte, 2021).

O etanol é um inibidor do crescimento das leveduras em concentrações relativamente baixas. Os fermentos cervejeiros mais utilizados normalmente são inibidos em concentrações superiores a 8 e 9% (vol/vol) de etanol (Stanley *et al.*, 2009). Exposição a concentrações superiores à ideal podem resultar em redução da vitalidade, inibição da divisão celular,

diminuição do volume celular e taxa de crescimento e aumentam a morte celular dos fermentos (Birch e Walker, 2000).

Para um melhor rendimento comercial, também é interessante que a levedura apresente uma floculação forte e completa durante o processo. A floculação do fermento consiste no processo no qual as células se aderem para formar flocos que consistem em milhares de células. Após a formação, esses flocos rapidamente se separam do meio por sedimentação (leveduras *lager*) ou subindo à superfície (leveduras *ale*). A capacidade de floculação pelas leveduras é de considerável importância para a indústria cervejeira, pois fornece uma maneira ecológica, simples e mais econômica de separar as células de levedura no final da fermentação (Verstrepen *et al.*, 2003).

Existe uma necessidade do mercado por novos fermentos, que vão cada vez mais de encontro a estas características tecnológicas com o objetivo de aumentar a produtividade e lucros no processo.

1.6 Cervejas produzidas com leveduras diferentes de *Saccharomyces*

Apesar do uso tradicional das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* na produção de cervejas *Ale* e *Lager*, respectivamente, algumas leveduras selvagens podem estar presentes nas etapas de produção de cervejas. Normalmente, elas são conhecidas por contaminar os estágios posteriores da produção, principalmente nas etapas de preparação do mosto, inoculação, fermentação e acondicionamento (Suiker e Wosten, 2022).

As principais leveduras selvagens encontradas na cerveja são *Saccharomyces* não *cerevisiae* e *Brettanomyces*. A espécie *Brettanomyces bruxellensis* influencia a cerveja através da produção de ácido acético e compostos fenólicos altamente voláteis, como 4-etil guaiacol e 4-etilfenol, que gera um aroma indesejado de fumaça, enquanto *Saccharomyces diastaticus* é responsável por cerca de dois terços da deterioração relacionada a produção de cerveja artesanal na Patagônia Andina (Suiker e Wosten, 2022).

A deterioração da cerveja por *S. diastaticus* se manifesta por fermentação de carboidratos residuais, incluindo dextrinas e amido, produzindo sabores fenólicos, turvação e super atenuação. Isto leva a percentual de álcool aumentado, carbonatação excessiva e corpo enfraquecido (Suiker e Wosten, 2022).

Atualmente, existem diferentes tipos de cervejas de fermentação mista espontânea, sendo a maioria ainda produzida na Bélgica por cervejarias tradicionais e especializadas, localizadas perto do vale do rio Senne e na Payottenland, uma região distinta dentro da província de Brabante Flamengo próxima à Bruxelas. Considera-se que essas regiões abrigam a microbiologia necessária para sua fermentação.

As cervejas Lambic belgas são produzidas pela fermentação espontânea da fermentação de água, malte de cevada, trigo não maltado e lúpulo seco em barris horizontais de carvalho ou castanheiro. O processo misto de fermentação e maturação pode prosseguir por até três anos e é caracterizada por uma sucessão microbiana de diferentes leveduras e espécies bacterianas, como bactérias do ácido acético, bactérias ácido lácticas e leveduras selvagens, como *Brettanomyces* (Bossaert *et. al.*, 2019).

As cervejas Lambic são a base de alguns tipos de cerveja, como a gueuze, faro e Lambics de frutas, entre as quais kriel é a mais popular. As cervejas faro são produzidas através de uma mistura de cervejas Lambic leves e velhas suplementadas com açúcar de rocha, que é um tipo de confecção composta por cristais de açúcar relativamente grandes. A produção da cerveja gueuze consiste na utilização de uma cerveja Lambic jovem de maturação de aproximadamente um ano com carboidratos residuais de dextrina misturada com cerveja Lambic velha (normalmente de três anos), que contém a microbiota que pode converter os carboidratos de dextrina em carboidratos fermentáveis mais simples (Verachtert e Iserentante, 1995 *apud*). Já as cervejas kriel são produzidas através da refermentação de cerveja Lambic jovem com cerejas azedas inteiras em barris. O envelhecimento pode durar mais de dez anos e, portanto, significa um investimento da cervejaria em produtos e espaço. No entanto, não está claro em que medida o processo de envelhecimento de longa duração contribui para a qualidade do sabor de cervejas gueuze (Spitaels *et al.*, 2014). O sabor das cervejas gueuze é um pouco diferente do sabor da maioria das cervejas, devido às altas concentrações de ácidos orgânicos (principalmente ácido láctico) que criam uma acidez profunda (Van Oevelen *et al.*, 1976 *apud*).

1.7 Tecnologia da produção de cerveja

A fabricação de cerveja consiste basicamente na conversão da fonte de amido em mosto, que é um líquido açucarado, e este é fermentado por leveduras para a produção de etanol. Para

isso, a produção de cerveja é estabelecida em diversas etapas, que vão desde a preparação dos ingredientes até a embalagem, sendo elas: maltagem, brassagem, filtração, fervura, resfriamento, fermentação, maturação e envase.

Para que a cevada possa ser utilizada, ela precisa passar pelo processo de malteação, a fim de que seu sistema enzimático possa transformar o amido em açúcares fermentáveis, os quais são necessários para a produção da cerveja (Kunze, 2006). Neste sentido, o principal objetivo do processo de malteação é diminuir as β -glucanas presentes nas paredes celulares e diminuir algumas proteínas insolúveis que dificultam o acesso das enzimas aos grânulos de amido (Hughes e Baxter, 2001). No processo de malteação, ocorre a produção e ativação de enzimas capazes de quebrar as cadeias de amidos e proteínas do grão, fornecendo substrato solúvel e aminoácidos, os quais são indispensáveis para a posterior produção de cerveja (Tancredo, 2015). O processo de malteação é dividido em quatro etapas principais: limpeza, classificação e armazenamento de cereais, maceração, germinação e secagem.

A cevada que chega às fábricas de malte geralmente contém muitas impurezas, que precisam ser removidas antes do processamento, como fragmentos de palha, poeira, pequenas pedras e pedaços de madeira. Para garantir a qualidade do malte homogêneo, é importante garantir o uso de cevada homogênea e limpa como matéria-prima. Portanto, quando a cevada chega à maltaria, ela é limpa e classificada. Como exemplo de classificação, os grãos grandes e de barriga grossa contém mais amido do que os grãos pequenos e finos. Os grãos pequenos absorvem água mais rápido do que os grãos maiores. Isso causaria tempos de germinação muito diferentes para grãos diferentes e resultaria em malte de qualidade inferior (por exemplo, malte heterogêneo). Portanto, a cevada é classificada em três frações diferentes (Portaria nº 691, 1996):

- fração 1: cevada de primeiro grau ou prumo (> 2,5 mm de diâmetro);
- fração 2: cevada de segundo grau (<2,5 mm e> 2,2 mm);
- fração 3: Peneiras (<2,2 mm)

Na maceração, espera-se que o grão alcance igual teor de água para dar início à ativação do metabolismo. Portanto, consiste na umidificação dos grãos com objetivo de fornecer água ao embrião para que sua umidade seja aumentada de 35,0 a 45,0% para iniciar a germinação, além do fornecimento de oxigênio visando suprir a necessidade dos grãos e estimular o desenvolvimento do embrião (Porto, 2011; Pinheiro, 2016).

A etapa de germinação inicia-se após a maceração, onde o embrião utiliza amido como fonte de alimento. Nesta etapa, objetiva-se o enriquecimento enzimático, aliado às transformações das substâncias de reserva. Assim, as transformações bioquímicas necessárias para a modificação do grão ocorrerão na etapa da germinação controlada, pois, com a absorção de água, o metabolismo será induzido e haverá a ativação e a formação de várias enzimas como as glucanases, amilases, parte das hemicelulases, lipases e proteases (Kuntz & Bamforth, 2007). A tabela 3 mostra as principais enzimas de importância na brassagem, bem como suas temperaturas de ação e inativação.

Tabela 3. Enzimas envolvidas no processo de mosturação e suas condições ideais de atividade.

Enzima	Atuação	pH	Temperatura (°C)
Hemicelulase	Decomposição da hemicelulose para glucanos de baixa e média massa molar	4,5 a 4,7	40 a 45
Exo-peptidase	Decomposição das proteínas de alta e média massa molar	5,2 a 8,2	40 a 50
Endo-peptidase	Decomposição das proteínas para produtos intermediários de alta e média massa molar	5,0	50 a 60
Dextrinase	Desagregação do amido para maltose e maltotriose pela desagregação das ligações alfa 1-6	5,1	55 a 60
β -amilase	Desagregação do amido para maltose pela desagregação das ligações beta 1-4	5,4 a 5,6	60 a 65
α -amilase	Decomposição do amido para dextrinas inferiores pela desagregação das ligações alfa 1-4	5,6 a 5,8	70 a 75

Fonte: Malting and Brewing Science, 1982.

Para que atuem perfeitamente, essas enzimas precisam de fatores físico-químicos específicos, como a temperatura, acidez do meio, tempo, constituição do malte moído, além da presença de água no meio (Venturini-Filho, 2010).

Por fim, ocorre a secagem, que é responsável por encerrar os processos químicos e biológicos, formando aroma, sabor e cor característica do malte (Barros, 2016). Quanto maior a intensidade da secagem maior será a intensidade da cor final do malte.

O preparo do mosto, que é o líquido obtido do malte de cevada (composto de carboidratos, açúcares simples, proteínas, aminoácidos e sais minerais) apresenta uma série de etapas, que são semelhantes tanto na produção industrial quanto na artesanal da cerveja. As etapas da produção de cerveja estão relacionadas abaixo:

- Moagem do malte;
- Mosturação;
- Filtração;
- Fervura do mosto e lupulagem;
- Resfriamento do mosto;
- Adição de fermento;
- Primeira fermentação;
- Segunda fermentação ou maturação;
- Decantação e filtragem;
- Envase;
- Pasteurização

É pela da moagem do malte que se inicia o processo de produção de cerveja, no qual o malte é colocado sob ação de moinhos de martelo ou de rolo (Santos, 2005). Tem como objetivo principal a exposição do endosperma do grão, facilitando a hidrólise do amido devido à maior superfície de contato com as enzimas do malte no processo de mosturação (Bortoli *et. al*, 2013). É responsável por determinar a velocidade das transformações físico-químicas, o tempo de filtração do mosto, a ação das enzimas, além do rendimento do processo.

Após todo o tratamento do malte, ocorre a etapa de brassagem, processo que visa a hidrólise de amido e de proteínas contidas nos grãos. Esse processo ocorre em ambiente úmido

com água aquecida em diferentes temperaturas que vão ativar as enzimas presentes nos grãos que promovem a quebra das substâncias complexas e insolúveis (Santos, 2005).

A última etapa da brassagem é chamada de “mash out” ou inativação térmica, onde a temperatura é elevada para a 75 a 78 °C de modo a inativar as enzimas que fazem parte do processo, interrompendo sua ação futura.

A recirculação é importante na remoção dos resíduos dos grãos e sêmola (pó derivado da maceração dos grãos) e é realizada utilizando a própria casca das sementes como material filtrante no fundo da panela, que ajuda a clarificar o mosto (Barros, 2016).

Depois de passar por essa etapa, o mosto é aquecido na caldeira de fervura até a ebulição (100 °C) para que se obtenha sua estabilização, de modo a continuar extraíndo os açúcares presentes no bagaço na panela de filtração. Esse processo inativa as enzimas, coagula e precipita as proteínas, principalmente a proteína Z e a proteína de transferência de lipídios (Lu, Bergenstahl e Nilsson, 2020), auxiliando na obtenção de um mosto mais cristalino. É nesta etapa que adiciona-se o lúpulo e outros aditivos sacaríneos como caramelo, açúcar, mel, extratos vegetais, entre outros (Júnior, Vieira e Ferreira, 2009). Desta forma, a maior quantidade de açúcares é extraída antes que o bagaço seja descartado do processo, podendo ser utilizado como ração animal.

O resfriamento tem como objetivo separar o material sólido em suspensão no mosto e resfriá-lo até uma temperatura média de 10 °C para que se inicie a fermentação, além de aerar o mosto de maneira estéril e com um conteúdo correto de oxigênio (Tschope, 2001). Esse resfriamento também é importante para que o fermento continue viável após o inóculo.

Após o mosto estar resfriado, adiciona-se a levedura para iniciar a fermentação, que é o processo de biotransformação do mosto em cerveja. O fermento está disponível no mercado na forma líquida ou seca, cada uma possuindo suas vantagens e desvantagens. O fermento seco é mais econômico e mais prático por ter mais células por gramas e maior densidade celular, além de ter maior durabilidade (2 a 3 anos). Já o fermento líquido possui a maior variedade disponível no mercado. Por outro lado, são mais caros, exigem que um *starter* seja feito, pois apresentam baixa contagem no número de células e tem um prazo de validade menor, entre 60 a 90 dias.

A etapa inicial de fermentação do mosto, denominada fermentação primária ou principal, é a fase de maior atividade metabólica da levedura, já que é uma fase aeróbia na qual as leveduras aumentam a quantidade de células de duas a seis vezes. Durante esse processo, quase todo o

extrato fermentescível é convertido em álcool e gás carbônico, além de algumas reações que resultam na formação de subprodutos (ésteres, álcoois superiores e outros) que exercem um importante efeito no sabor da cerveja. A temperatura do processo varia de acordo com o tipo de levedura a ser utilizado, sendo que as leveduras *ale* fermentam em temperaturas mais altas entre 18 e 22°C e as *lager* em temperaturas mais baixas, entre 7 a 15 °C (Silva, 2005).

O resultado da fermentação primária é uma cerveja denominada “cerveja verde” que precisa passar por outro processo fermentativo mais lento, chamado de maturação ou fermentação secundária. Esse processo ocorre em temperatura baixa, entre 0 e 3 °C e pode levar semanas ou até mesmo meses, dependendo do tipo de cerveja que está sendo feita (Cereda, 1983).

Segundo Dragone e Almeida e Silva (2010), a maturação ou fermentação secundária tem como objetivo principal estabilizar o diacetil, composto formado na fermentação primária, iniciar a clarificação da cerveja pela sedimentação de células de leveduras e proteínas, propiciar a carbonatação e melhorar o odor e sabor da cerveja, pela redução de diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico.

Antes de seguir para a etapa de envase, a cerveja é decantada para separar os sedimentos restantes do processo e em seguida realiza-se a filtração, que visa remover as impurezas que não decantam (Aquarone *et al.*, 1993). A filtração da cerveja tem como objetivo eliminar a turvação que persiste após o processo de maturação através da separação do bagaço de malte do mosto líquido, levando-se em conta os aspectos qualitativos (mosto límpido, com baixa turbidez) e econômicos, ou seja, obtenção do máximo de extrato e rapidez de operação. O bagaço de malte, separado nesta operação, pode ser utilizado para a fabricação de ração animal ou, quando acrescido de outros componentes, como leveduras, depósitos protéicos e resíduos de cereais, utiliza-se na melhoria de alimentos para consumo humano por seu valor nutritivo e teor em fibras (Junior, Vieira e Ferreira, 2009).

A gaseificação ou carbonatação é um processo físico-químico que consiste na reação do dióxido de carbono com a cerveja. O processo confere propriedades sensoriais importantes ao produto, além de contribuir para sua conservação, em função da produção de ácido carbônico na bebida, que ajuda na sua conservação.

Ainda que ocorra durante toda a etapa da fermentação, esta etapa apresenta diferentes modos de aplicação, que visam garantir concentrações desejáveis do gás e acidez no produto final. Assim, ao final do processo, o dióxido de carbono pode ficar naturalmente aprisionado na

garrafa, que para melhorar a eficiência recebe uma adição extra açúcar. Este método é chamado priming. Ele resulta em uma bebida com uma gaseificação mais suave. Outro tipo de carbonatação é a chamada forçada, onde o CO₂ é injetado no líquido, cuja dissolução deste, principalmente em baixas temperaturas, resulta em uma gaseificação geralmente mais intensa.

A etapa de maturação ou armazenamento a 0 °C, durante semanas, permite a precipitação de proteínas instáveis, leveduras e resinas.

A filtração da bebida final tem como objetivo clarificar a cerveja, de modo que fique mais atraente ao consumidor e mantenha suas características sensoriais por mais tempo. Ela pode ser realizada com o uso de filtros sintéticos ou naturais, sendo neste último caso usada a terra de diatomácea. Esta é obtida de exoesqueleto fossilizado de algas diatomáceas unicelulares revestidas com uma camada de sílica. O limite de células residuais de leveduras após a filtração deve ser menor que 10/100mL de cerveja (Junior, Vieira e Ferreira, 2009).

Na etapa de envase a bebida é acondicionada em embalagens que mantêm suas propriedades sensoriais, físico-químicas e microbiológicas até o consumo. Atualmente utiliza-se principalmente as garrafas de vidro ou plástico, barris ou latas. Cada tipo de embalagem exige um maquinário específico para seu enchimento em uma planta industrial de forma a garantir a segurança e qualidade do processo.

Após todas essas etapas, a cerveja é acondicionada em latas e garrafas e segue para o tratamento térmico de pasteurização. A pasteurização é realizada elevando-se a temperatura da cerveja a 60 °C, seguido de um rápido resfriamento até 4 °C (Buzrul, 2007). O produto pasteurizado apresenta maior estabilidade e durabilidade sua vida útil chega a seis meses em função da eliminação de microrganismos (Santos, 2005). As etapas de todo o processo estão apresentadas na figura 3.

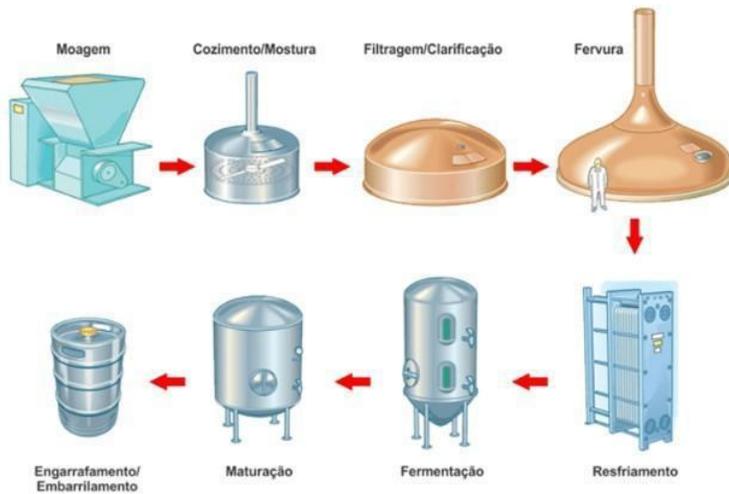


Figura 3. Fluxograma das etapas de produção de cerveja e seus reservatórios típico na indústria. Fonte: Análise de desperdícios: um estudo de caso em uma empresa de cervejas artesanais, 2021.

1.8 Produção de cervejas ácidas

Cervejas ácidas são aquelas que apresentam um sabor ácido intencionalmente introduzido, como resultado de processos tecnológicos, como o uso de fermentos adicionais. Neste caso, as tradicionais leveduras cervejeiras exercem seu papel primário, que é apoiada por outras leveduras ou bactérias (Li e Liu, 2015). Esta fermentação adicional pode resultar da inoculação de fermentos adjuntos ou de uma fermentação espontânea.

Existem diferentes técnicas para a produção de uma cerveja ácida (*sour beer*), como é demonstrado na figura 4. Uma delas é o *wort souring*, que é o processo de acidificação realizado por bactérias ácido lácticas, que ocorre antes da fermentação alcoólica, produzindo uma quantidade significativa de ácido láctico. Esse método é vantajoso devido ao fato de ser rápido. Um outro método é o de maturação, que ocorre em *sour beer* em barris de madeira por meses ou até anos (Dysvik *et al.*, 2020b).

Além do *wort souring*, existem outros métodos para acidificação do mosto, como o *kettle souring*, que é um método em que a acidificação ocorre na panela de fervura antes da pasteurização. Uma vez que todo o mosto estiver na panela de fervura, ele será resfriado entre 37 e 46 °C, o que varia de acordo com a estirpe de lactobacilos que está sendo utilizada. Após alcançar a temperatura apropriada, a estirpe é inoculada no mosto na panela de fervura. Neste método, o lúpulo não deve ser adicionado antes do inóculo dos lactobacilos, visto que este

ingrediente apresenta propriedades antimicrobianas. O recipiente deve ser mantido na temperatura desejada por até 5 dias, variando de acordo com a estirpe fermentadora e o nível de acidez desejado. Este método é vantajoso pois permite a inoculação do fermento sem o risco da contaminação por lactobacilos após a fervura (Dysvik *et al.*, 2020b).

O método de acidificação no fermentador primário ocorre antes da adição de outras leveduras e sua vantagem está na capacidade de produzir cervejas com níveis de acidez mais complexos. O processo é similar ao do método *kettle souring*, porém o mosto nunca é pasteurizado após ter sido acidificado. Portanto, após a fervura, a cerveja é refrigerada até a temperatura ideal para a estirpe de lactobacilos. Ao atingir a temperatura entre 32 a 46 °C, o mosto é transvasado para o fermentador primário onde o fermento (lactobacilos) será diretamente adicionado. A bactéria fica incubada entre 1 a 3 dias, sem adição de leveduras, até que o nível de acidez desejada seja alcançado. Após atingir esse nível, o fermentador será resfriado até a temperatura desejada para que a levedura possa realizar a fermentação primária (Dysvik *et al.*, 2020b).

Em cervejas, como as Lambic, uma típica cerveja ácida de origem belga, o processo de fermentação é natural, ou seja: os microrganismos não são inoculados, mas derivam do ambiente, ocorre por uma sequência de eventos dominados por diferentes grupos microbianos. Esta são baseados em 4 fases, quando analisados por métodos dependentes de cultivo:

- (i) o início é caracterizado pela fermentação de enterobactérias e leveduras selvagens (oxidativas) e um crescimento limitado de bactérias acéticas.
- (ii) A fase de produção de álcool é dominada principalmente pela fermentação produzida por *S. cerevisiae* ou *S. pastorianus*;
- (iii) Uma fase de acidificação realizada por bactérias lácticas como *Pediococcus damnosus* ou *Lactobacillus brevis*;
- (iv) fase de maturação realizada normalmente por *P. damnosus* e *Brettanomyces bruxellensis*.

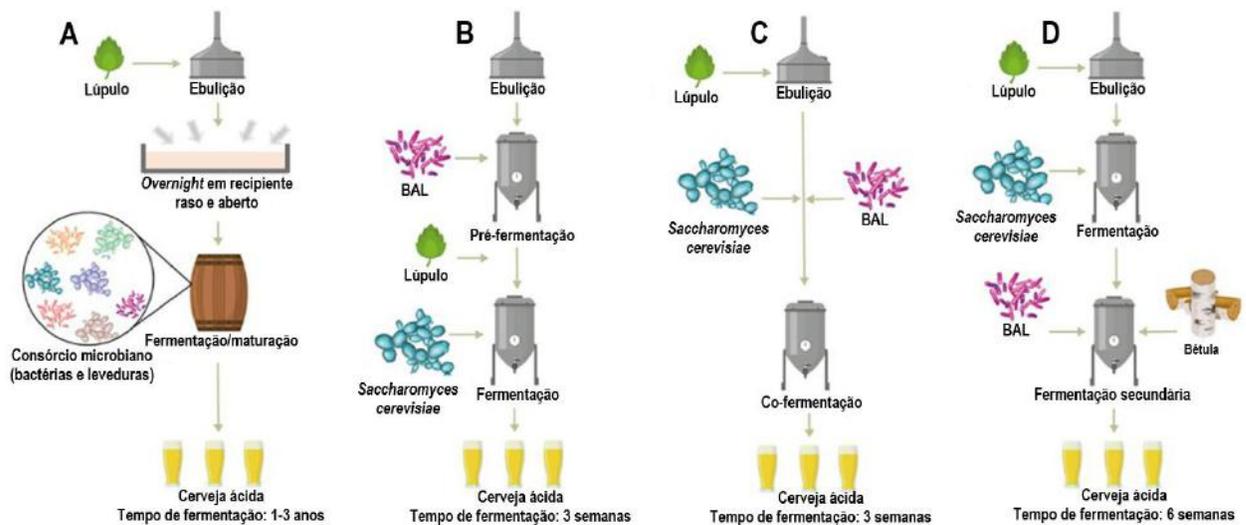


Figura 4. Técnicas de produção de *sour beer*. (A) Processo de produção tradicional com fermentação espontânea. (B) Pré-fermentação com BAL, seguida de fermentação com levedura. (C) Co-fermentação com levedura e BAL. (D) Fermentação secundária com BAL com carboidratos derivados da madeira como substrato. Adaptado de: Microbial Dynamics in Traditional and Modern Sour Beer Production, 2020.

1.9 Fermentos cervejeiros bacterianos

Apesar do tradicional uso das leveduras na produção de cerveja, outros microrganismos também podem ser utilizados no processo, como as bactérias lácticas, bactérias acéticas e enterobactérias, que podem participar em uma etapa da fermentação.

As bactérias do ácido láctico (BAL) são um grupo heterogêneo de bactérias que desempenham um papel significativo em uma variedade de processos de fermentação. São classificadas em dois grandes grupos: homofermentativas, que tem como principal produto o ácido láctico a partir da fermentação da glicose e as heterofermentativas, que além de produzirem ácido láctico, ainda produzem dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (Narvhus e Axelsson, 2003).

Estas bactérias são a principal fonte de ácido láctico em alimentos fermentados como iogurte, chucrute, pickles, sourdough e cervejas ácidas, além de que, a degradação de proteínas e lipídios e produção de vários álcoois, aldeídos, ácidos, ésteres e compostos de enxofre contribuem para o sabor, odor, cor e textura em diferentes produtos alimentícios fermentados

(Bintsis, 2018). Também podem produzir substâncias antimicrobianas, incluindo bacteriocinas que têm a capacidade de inibir patógenos de alimentos (Zacharof e Lovitt, 2012).

Lactobacillus e *Pediococcus* representam dois gêneros de BAL que são fortemente associados à produção de ácido lático em cerveja ácida, embora outras BAL (*Oenococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp.) também foram isolados de cerveja ácida (Bokulich e Bamforth, 2013). Porém, as espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus delbrueckii* são as mais importantes na produção (Simpson, 1993). Espécies do gênero *Lactobacillus* spp. podem diminuir o pH da cerveja ácida para aproximadamente 3,3-3,4 (Peyer *et. al*, 2017). As cepas de lactobacilos são geralmente sensíveis ao lúpulo, embora ocorra variação (Sakamoto e Konings, 2003).

1.9.1 O papel das BAL na produção de cerveja

Em relação às demais bactérias lácticas, os lactobacilos apresentam vantagem de uso na acidificação de cervejas pela sua rápida produção de ácido lático e baixa produção de metabólitos que podem resultar em características sensoriais indesejáveis, como a dextrana que aumenta viscosidade. Além disso, a maioria das estirpes apresenta sensibilidade ao etanol e lúpulo, presentes na fase final de produção da bebida, que limitam ou impedem a multiplicação das bactérias lácticas na bebida final.

Os resultados sensoriais da multiplicação de bactérias lácticas em cervejas ácidas é normalmente limitado à acidificação do mosto, onde os ácidos orgânicos são os mais influentes, como o ácido lático. Também são importantes os ésteres, como o etil acetato e álcoois superiores, aldeídos, cetonas, componentes fenólicos e heterocíclicos (Salmeron *et al.*, 2009). Entretanto, devemos considerar que bactérias lácticas deterioradoras apresentam resistência a estes compostos em concentrações normalmente encontradas no produto final (Hieronymus, 2012).

1.9.2 *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis é uma espécie heterofermentativa obrigatória que apresenta ótimo crescimento a 30 °C e pH entre 4 e 5. Devido a isso, ela pode causar diversos problemas no produto final, como por exemplo a “super atenuação” devido à sua capacidade de fermentar dextrinas e amido (Priest, 1996; Vaughan *et al.*, 2005).

Para a produção de ATP, essa espécie utiliza citrato, piruvato, malato, arginina e tirosina da cerveja como substrato (Suzuki *et al.*, 2006). Além disso, algumas cepas apresentam resistência às substâncias amargas do lúpulo, dentre elas as isohumulonas (iso α -ácidos), o que possibilita sua multiplicação na cerveja (Sakamoto *et al.*, 2001).

Devido a essa resistência, *Lactobacillus brevis* é considerado a espécie mais tolerante ao lúpulo de todos os lactobacilos. Essa propriedade é conferida por uma proteína transportadora codificada por plasmídeo HorA e um transportador multidrogas ORF5, que permitem o transporte de compostos antimicrobianos de lúpulo para fora do citoplasma. Dessa forma, *Lactobacillus brevis*, além de participar no processo de produção intencional, é a bactéria de deterioração de cerveja mais comumente encontrada em cervejarias produtoras de cervejas não ácidas (Sakamoto *et al.*, 2001).

As espécies de BAL têm a capacidade de produzir metabólitos organolépticamente ativos além do ácido láctico em bebidas à base de malte de cevada. Esses metabólitos incluem outros ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido fórmico, ésteres como acetato de etila e uma ampla gama de álcoois superiores, aldeídos, cetonas, fenólicos e compostos heterocíclicos (Dysvik *et al.*, 2019).

1.9.3 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum coloniza naturalmente o trato gastrointestinal de humanos, possui propriedades probióticas (Axling *et al.*, 2020) e algumas subespécies são produtoras de (GABA), um neurotransmissor inibitório na região central do sistema nervoso de mamíferos que possui múltiplas funções fisiológicas e propriedades anti-hipertensivas, diuréticas e de relaxamento (Zhang *et al.*, 2020).

Lactobacillus plantarum é uma espécie de bactéria ácido láctica heterofermentativa facultativa frequentemente utilizada na produção de laticínios, como queijos, kefir e iogurte (Todorov e Franco, 2010). Sua versatilidade fisiológica e produção de compostos de interesse oferecem várias propriedades benéficas para os seres humanos (Seddik *et al.*, 2017). Tem a alegação de status de segurança do European Food Safety Authority-(EFSA) e um título de Amplamente Reconhecido como Seguro (GRAS) da Food and Drug Administration dos EUA (Gao *et al.*, 2020).

1.10 Legislação de acesso a patrimônio genético

O mercado de cervejas ácidas no Brasil vem ganhando cada vez mais força, principalmente após o lançamento da cerveja Catharina *Sour*, que é produzida por cervejarias catarinenses. A cerveja é baseada na *Berliner Weisse*, que é uma “denominação de origem controlada”, ou seja, por lei, só as cervejas fabricadas em Berlim podem ser assim denominadas. A Catharina *Sour* foi o primeiro estilo de cerveja a ser reconhecido como brasileiro pelo *Beer Judge Certification Program* (BJCP).

O interesse dos consumidores por cervejas ácidas nos últimos anos tem levado à crescente necessidade de inovações tecnológicas nesta área. Entre elas, o desenvolvimento de novos fermentos e metodologias de produção, que assim como para os fermentos clássicos, aumentem a produtividade e diversidade de sabores. Atualmente a comercialização de bactérias lácticas como fermento cervejeiro, bem como sua caracterização quanto à resistência às condições de produção é extremamente limitada.

Ao isolar um microrganismo do Brasil, este deve ser considerado propriedade do patrimônio genético (PG) nacional, que é conceituado como informação de origem genética de espécies vegetais, animais, microbianas ou espécies de outra natureza, incluindo substâncias oriundas do metabolismo destes seres vivos. Atualmente, para que o pesquisador possa registrar a descoberta de novos fermentos cervejeiros, ele precisa agir de acordo com o Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen) que têm como objetivo principal de ajudar o Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGen) na gestão de patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado. Todo pesquisador que

coordena pesquisas envolvendo patrimônio genético brasileiro e/ou conhecimento tradicional deve se cadastrar no Sisgen de acordo com a Lei nº 13.123 de 2015 (Brasil, 2015).

O SisGen foi instaurado pelo Decreto nº 8.772, que regulamenta a Lei nº 13.123. Como uma ferramenta online, é administrado pela Secretaria Executiva do CGen e proporciona ao usuário funções como (Brasil, 2016):

- Cadastrar acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado;
- Cadastrar envio de amostra que contenha patrimônio genético para a prestação de serviços no exterior;
- Cadastrar remessa de amostra de patrimônio genético;
- Notificar produto acabado ou material reprodutivo;
- Solicitar autorização de acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado e de remessa ao exterior com anuências do Conselho de Defesa Nacional e do Comando da Marinha;
- Solicitar credenciamento de instituições mantenedoras das coleções ex situ que contenham amostras de patrimônio genético;
- Obter comprovantes de cadastros de acesso, cadastros de remessa e de notificações;
- Obter certidões do procedimento administrativo de verificação; e
- Solicitar atestados de regularidade de acesso.

O objetivo dessa lei é promover o uso sustentável dos recursos genéticos da biodiversidade e suscitar o interesse das empresas para o uso e regularização de suas atividades, por meio de um sistema autodeclaratório de cadastro das atividades que utilizam a biodiversidade brasileira.

2 JUSTIFICATIVA

No crescente mercado cervejeiro mundial, o Brasil ocupa uma posição de destaque, tanto como produtor quanto consumidor. Entretanto, seu papel como produtor de insumos para o este mercado permanece pequeno, ou praticamente nulo, no que se refere ao lúpulo e principalmente aos fermentos. Em relação à produção de cerveja, o Brasil segue os padrões mundiais em termos de características, não tendo ainda desenvolvido um estilo próprio de impacto comercial significativo e mundialmente reconhecido. Este fato contrasta com a rica biodiversidade brasileira, que é destaque em quase todos os aspectos biotecnológicos. Outro fator importante é a crescente busca dos consumidores por novas características sensoriais. Neste sentido, entendendo a necessidade de inovação no processo, existe atualmente a busca por outros fermentos alternativos, que permitam a implantação de uma identidade sensorial à cerveja brasileira.

A equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IMPG vem trabalhando no desenvolvimento de fermentos cervejeiros isolados em território nacional. O objetivo desta linha de pesquisa é buscar uma identidade na cerveja produzida no Brasil e valorizar sua biodiversidade. O importante papel que o Brasil desempenha no mercado mundial como produtor e consumidor de cerveja não condiz com sua dependência por insumos importados, principalmente o fermento, apesar da característica biodiversidade do país. Uma linha de pesquisa no desenvolvimento de uma levedura cervejeira já está em desenvolvimento e avançada no laboratório. Com o crescimento do interesse dos consumidores por cervejas especiais e do aumento nas vendas de cervejas especiais, esta é uma oportunidade para iniciar a prospecção por fermentos lácticos cervejeiros.

Sabendo que a cerveja Catharina Sour foi reconhecida como estilo de cerveja brasileiro pela BJCP, torna-se interessante a busca por novos fermentos que possam ser aplicados na desse estilo de cerveja. Desta forma, o presente estudo buscou a aplicação de bactérias ácido lácticas como fermentos adjuntos para cervejas ácidas.

3 OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo avaliar o uso de bactérias lácticas previamente isoladas e de coleção de culturas como fermentos adjuntos para a produção de cervejas ácidas.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade das bactérias lácticas de acidificação do mosto cervejeiro;
- Verificar a resistência das bactérias ao etanol;
- Verificar a capacidade das bactérias lácticas estudadas em se multiplicarem no mosto com diferentes concentrações de lúpulo;
- Verificar a capacidade das bactérias lácticas em participar de co-cultivo com leveduras em mosto cervejeiro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem das estirpes

Foram utilizadas as seguintes estirpes de bactérias lácticas, todas pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFRJ.

- *Lactobacillus plantarum* LP01 - isolado de alimento
- *Enterococcus faecium* estirpe E86 - isolado de alimento
- *Lactococcus lactis* 61- isolado de alimento;
- *Lactobacillus brevis* - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) 00221;
- *Lactobacillus delbrueckii* - Coleção de Culturas Tropicais (CCT) 3744;
- *Lactobacillus sakei* - Spanish Type Culture Collection (CECT) 906;
- *Lactobacillus rhamnosus* GG - American Type Culture Collection 53103;
- *Saccharomyces cerevisiae* US0-05 - FERMENTIS USA.

4.2 Manutenção e ativação das estirpes

Foram utilizadas estirpes descritas no item anterior. As estirpes estocadas congeladas de bactérias ácido-lácticas foram ativadas em caldo MRS - de Man, Rogosa and Sharpe (Himedia, Índia) por 48h a 30 °C. A estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* US-05 foi ativada em caldo formulado para levedura glicose-maltose - GYMP 2% por 24h em 25 °C segundo Lodder (1952). A partir deste cultivo, as estirpes de bactérias ácido lácticas foram inoculadas na superfície de ágar MRS, incubadas em anaerobiose nas mesmas condições de tempo e temperatura. A estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* US-05 foi inoculada em ágar GYMP por 24h em 25 °C.

Das colônias de bactérias ácido lácticas isoladas, foram preparados estoques mantidos em ágar MRS inclinado. A estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* US-05 foi mantida em estoque em ágar GYMP inclinado. Todos os estoques foram mantidos sob refrigeração e substituídos a cada três meses.

A estirpe *Lactobacillus brevis* 00221 foi utilizada como estirpe controle do estudo.

4.3 Contagem de *Saccharomyces cerevisiae* US-05 para inóculo

Para determinar o inóculo inicial da levedura em mosto, a contagem de células foi realizada por microscopia óptica em câmara de Neubauer, contando os quatro quadrantes internos aplicando-se ao final a fórmula para obter o número total de células determinada por Phelan e Lawler, (2001).

$$\text{n}^\circ \text{ de células/mL} = \text{n}^\circ \text{ total de células} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

4.4 Preparo do mosto

Como mosto foi utilizado o extrato de malte (Maltessência, Florianópolis) diluído em água destilada estéril à 16%, conforme a instrução do fabricante. A concentração de açúcares presentes em 1 Kg de extrato de malte corresponde à concentração encontrada em 1,6 Kg de malte em grão. O mosto foi autoclavado a 121 °C por oito minutos e utilizado como meio para as fermentações.

Para o preparo do mosto lupulado, o mosto foi adicionado de extrato de lúpulo (Prodooze, São Paulo) nas proporções de de 2,5, 5 e 7,5% (vol/vol) de iso-a-ácidos. O pH inicial do mosto foi ajustado para 5,2 com hidróxido de sódio, quando necessário.

4.5 Preparo do inóculo para os testes de fermentação

As BAL foram propagadas em ágar MRS por 48h em microaerofilia à 30 °C. Após este período, uma suspensão foi realizada em solução salina 0,85% (p/v) equivalente à escala 0,5 de Mcfarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Esta suspensão foi utilizada para inóculo nos testes a seguir.

4.6 Capacidade de acidificação do mosto cervejeiro

Para avaliar a sua capacidade de acidificação e conseqüente atenuação do mosto cervejeiro, 100µL da suspensão bacteriana foram inoculados em 10mL de mosto 16% (p/p) contendo 0 ou 2% de glicose ou sacarose (p/vol).

Os tubos foram incubados à 30 °C por 48 horas. Durante a incubação foram coletadas amostras para a contagem de células viáveis, determinação do pH e densidade do mosto por refratometria.

4.7 Avaliação da Graduação alcoólica

Foi realizada conforme descrito por Papazian (1991), que utiliza os dados de atenuação do mosto durante a fermentação.

$$ABV = 131,25 (OG - FG)$$

Onde: ABV: álcool por volume; OG: Densidade inicial; FG: Densidade final

4.8 Avaliação do pH

Para determinar o pH dos mostos inoculados com bactérias ácido lácticas, foi utilizado phmetro de bolso (Kasvi, China). Os tubos foram incubados a 30 °C por 48h e destes foram retiradas alíquotas para verificação do pH a cada 24h.

4.9 Resistência ao lúpulo

O teste de resistência ao lúpulo foi realizado conforme a metodologia descrita por Behr, Ganzle e Vogel, 2006. Os mostos foram adicionados de 0, 2,5, 5 e 7,5% de iso- α -ácidos. Tubos contendo 10mL de mosto foram inoculados com 100µL da suspensão em salina foi transferida para tubos contendo 10 mL de mosto e incubados à 30 °C durante 48 horas. A resistência ao lúpulo foi considerada pelo crescimento da estirpe. A contagem dos microrganismos foi realizada a cada 24 horas durante a incubação.

4.10 Resistência ao etanol

O teste de resistência ao etanol foi realizado conforme a metodologia descrita por Jin *et. al*, 2022. As estirpes foram propagadas em meio de extrato de malte e incubadas a 30 °C por 48 horas. O meio foi adicionado das seguintes concentrações de etanol: 0, 2,5 e 5%. Nestes, foram inoculados 100µL da suspensão em salina, como previamente descrito. A resistência ao etanol foi considerada pelo crescimento da estirpe. A contagem de microrganismos foi realizada a cada 24 horas durante a incubação (30 °C por 48h) e foram retiradas amostras para a verificação do pH e a densidade por refratometria.

4.11 Avaliação da co-fermentação entre *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* US-05 na produção de cerveja

A co-fermentação foi realizada conforme descrito por Dysvik *et. al*, 2020a. O mosto cervejeiro foi inoculado com uma concentração inicial de 10^7 UFC/mL de *Lactobacillus plantarum* e incubado por 30 °C por 48 horas. Após este período, foi adicionado ao mosto o inóculo com aproximadamente 10^6 células/mL de *Saccharomyces cerevisiae* US-05 previamente ativada e o mosto foi incubado à 23 °C por 48 horas. Durante as incubações, em diferentes intervalos foram retiradas amostras para contagem de células viáveis, medição do pH e da densidade por refratometria.

Para contagem de células viáveis, a estirpe *Lactobacillus plantarum* LP01 foi propagada em ágar MRS por 48 horas a 30 °C em condições de anaerobiose, enquanto a levedura cervejeira foi propagada em ágar Sabouraud 2% formulado a 23 °C por 48 horas.

4.12 Análise estatística

Foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e em caso de diferença estatística, foi aplicado o teste de Tukey. As análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 7.04 com nível de confiança de 95% e todos os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata.

5 RESULTADOS

O teste de fermentação do mosto pelas diferentes bactérias lácticas resultou na acidificação, mas não em uma redução significativa da densidade do mosto, mesmo quando este foi adicionado de glicose ou sacarose (tabela 4). As maiores acidificações foram obtidas por espécies de *Lactobacillus*, sendo tanto para as estirpes de coleções de culturas internacionais (*Lactobacillus delbrueckii* 3744; *Lactobacillus plantarum* 8414; *Lactobacillus rhamnosus* GG 53103), quanto para a isolada por nossa equipe (*Lactobacillus plantarum* LP01). *Lactococcus lactis* 61 e *Enterococcus faecium* E86, que são duas estirpes produtoras de bacteriocinas, não foram capazes de acidificar ou alterar significativamente a densidade do mosto. Com base nestes resultados o estudo passou a ser conduzido utilizando-se como teste somente a estirpe *Lactobacillus plantarum* LP01 e a estirpe *Lactobacillus brevis* 00221 (de coleção de cultura), que foi usada como controle.

Tabela 4. Avaliação da atenuação do mosto cervejeiro por bactérias ácido lácticas.

Estirpe	Mosto original (pH 4,6 – dens 1.042)		Mosto com 2% de glicose (pH 4,5 – dens 1.052)		Mosto com 2% de sacarose (pH 4,5 – dens 1.049)	
	pH final	Densidade final	pH final	Densidade final	pH final	Densidade final
<i>L. delbrueckii</i> 3744	3,4	1040	3,5	1049	3,5	1047
<i>L. sakei</i> 906	3,5	1041	3,4	1049	3,5	1046
<i>L. rhamnosus</i> GG 53103	3,5	1040	3,5	1048	3,6	1046
<i>L. plantarum</i> 8414	3,4	1040	3,5	1049	3,4	1046
<i>Lactococcus lacti</i> 61	4,3	1040	4,3	1050	4,3	1047
<i>E. faecium</i> 86	4,3	1041	4,3	1050	4,3	1047
<i>L. plantarum</i> LP01	3,4	1040	3,4	1048	3,4	1047

5.1 Resistência ao lúpulo

A avaliação da multiplicação de *L. plantarum* e *L. brevis* em mosto adicionado de lúpulo mostrou que os microrganismos foram capazes de se multiplicar em todas as concentrações de iso- α -ácidos (IBU) testadas. Os efeitos das diferentes concentrações de iso- α -ácidos testadas parecem ter sido mais evidentes na multiplicação de *L. plantarum* do que em *L. brevis*. Este último mostrou um crescimento bastante similar em todas as concentrações, diferente de *L. plantarum* que mostrou uma contagem final de microrganismos ligeiramente maior nos menores valores de IBU testados, conforme observado nas figuras 5A e 5B e na tabela 5. As duas estirpes foram capazes de acidificar o mosto a valores próximos de 3,5 de forma similar nos diferentes valores de IBU (figuras 6A e 6B; tabela 5).

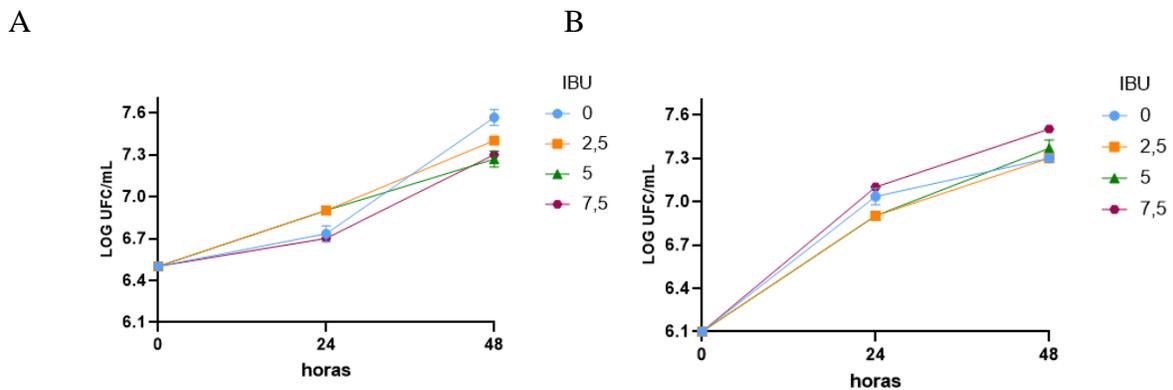


Figura 5. Crescimento de *Lactobacillus plantarum* LP01 (A) e *Lactobacillus brevis* 00221 (B) em mosto com diferentes valores de IBU. Log UFC/mL: unidade formadora de colônia por miligramas. IBU: International Bitterness Units Scale (Escala Internacional de Unidades de Amargor).

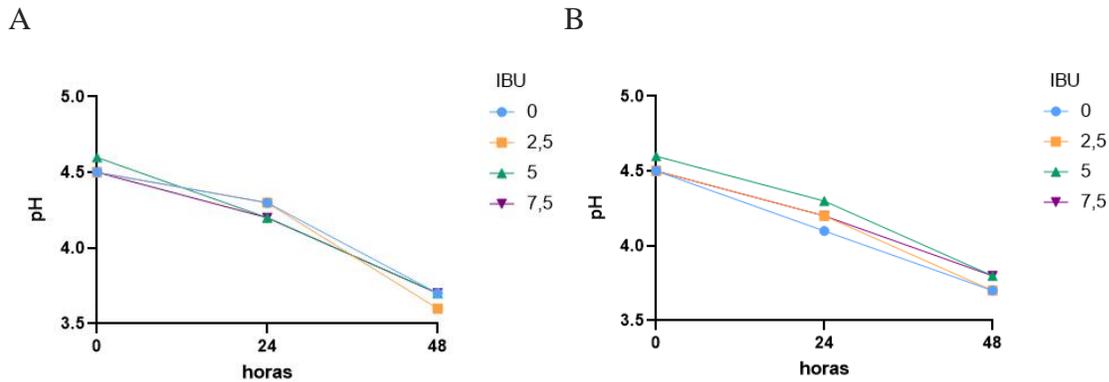


Figura 6. Variação do pH durante o crescimento de *Lactobacillus plantarum* LP01 (A) e *Lactobacillus brevis* 00221 (B) em mosto com diferentes valores de IBU. IBU: International Bitterness Units Scale (Escala Internacional de Unidades de Amargor).

Tabela 5. Efeito de diferentes concentrações de iso- α -ácidos na multiplicação e atenuação do mosto por *Lactobacillus plantarum* LP01 e *Lactobacillus brevis* 00221.

Estirpe/IBU	Densidade			pH			Contagem em placa (Log UFC/mL)		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
<i>L. plantarum</i> LP01									
0 IBU	1053	1052	1052	4,5	4,3	3,7	6,5	6,7	7,6
2,5 IBU	1043	1050	1047	4,5	4,3	3,6	6,5	6,9	7,4
5 IBU	1046	1046	1047	4,6	4,2	3,7	6,5	6,9	7,3
7,5 IBU	1047	1047	1047	4,5	4,2	3,7	6,5	6,7	7,3
<i>L. brevis</i> 00221									
0 IBU	1053	1052	1052	4,5	4,1	3,7	6,1	7,0	7,3
2,5 IBU	1043	1050	1049	4,5	4,2	3,7	6,1	6,9	7,3
5 IBU	1046	1049	1048	4,6	4,3	3,8	6,1	6,9	7,4
7,5 IBU	1047	1047	1047	4,5	4,2	3,8	6,1	7,1	7,5

5.2 Resistência ao etanol

Quando testados para multiplicação em diferentes concentrações de etanol, tanto *L. plantarum* quanto *L. brevis* conseguiram iniciar o crescimento em 2,5 e 5% de álcool. Em todas as concentrações testadas as duas estirpes aumentaram sua concentração celular em aproximadamente 1-1,2 log UFC/mL ao longo de 48 horas de cultivo. Na concentração de 5% foi observada uma fase adaptativa ao longo das primeiras 24 horas de cultivo, mas o número final de células foi semelhante às demais concentrações, incluindo o teste sem álcool (figuras 7A e 7B; tabela 6). As duas estirpes foram capazes de acidificar igualmente o mosto, sendo a acidificação ligeiramente menor na concentração de 5% de etanol (figuras 8A e 8B; tabela 6).

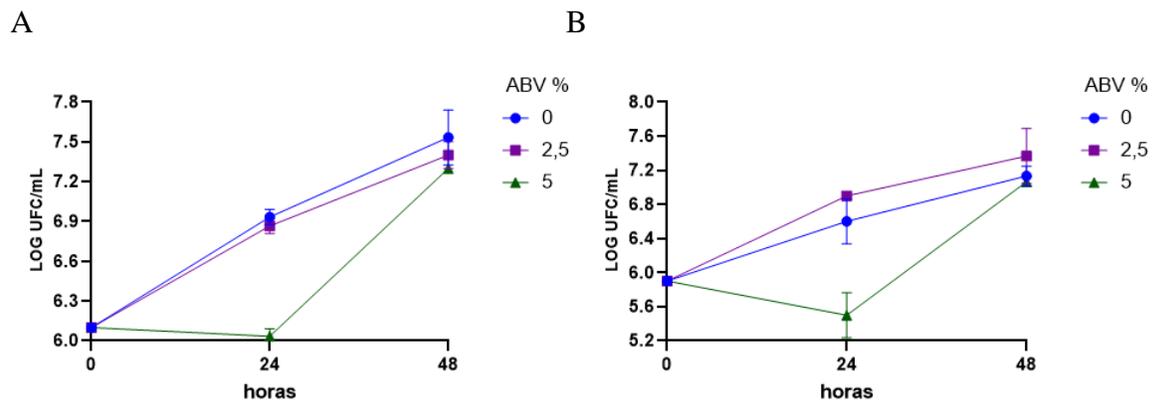


Figura 7. Crescimento de *Lactobacillus plantarum* LP01 (A) e *Lactobacillus brevis* 00221 (B) em mosto com diferentes concentrações de etanol. Log UFC/mL: unidade formadora de colônia por miligrama. ABV: Alcohol by Volume (Álcool por volume).

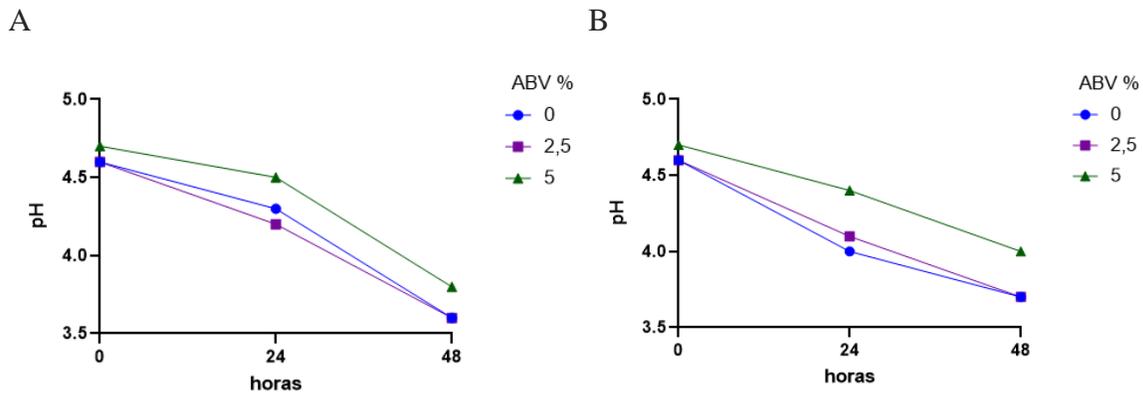


Figura 8. Variação do pH durante o crescimento de *Lactobacillus plantarum* LP01 (A) e *Lactobacillus brevis* 00221 (B) em mosto com diferentes concentrações de etanol. ABV: Alcohol by Volume (Álcool por volume).

Tabela 6. Crescimento de *Lactobacillus plantarum* LP01 e *Lactobacillus brevis* 00221 em mosto contendo diferentes concentrações de etanol.

	densidade			pH			Contagem em placa (Log UFC/mL)		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
<i>L. plantarum</i> LP01									
0% ABV	1.041	1.040	1.041	4,6	4,3	3,6	6,1	6,9	7,6
2,5% ABV	1.047	1.043	1.043	4,6	4,2	3,6	6,1	6,9	7,4
5% ABV	1.045	1.045	1.045	4,7	4,5	3,8	6,1	6	7,3
<i>L. brevis</i> 00221									
0% ABV	1.041	1.041	1.041	4,6	4	3,7	5,9	6,7	7,2
2,5% ABV	1.047	1.043	1.043	4,6	4,1	3,7	5,9	6,9	7,5
5% ABV	1.045	1.045	1.045	4,7	4,4	4	5,9	5,6	7,1

5.3 Avaliação da fermentação simultânea do mosto por bactérias lácticas e leveduras

Seguindo a base do protocolo de preparo de cervejas ácidas, o mosto cervejeiro foi fermentado pela bactéria láctica (*Lactobacillus plantarum* LP01) e posteriormente pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae* US-05). Conforme desejado, a estirpe *L. plantarum* LP01 foi capaz de

reduzir o pH do mosto para 3,6 nas primeiras 48 horas de fermentação. Após a adição do fermento houve uma redução adicional do pH para 3,3, que se manteve até o final da fermentação. Foi detectada uma redução da taxa de crescimento da levedura no co-cultivo, quando comparada com sua multiplicação isoladamente no mosto (figuras 10A e 10B).

O teor alcoólico resultante da co-fermentação entre *L. plantarum* LP01 e *S. cerevisiae* US-05 foi mais baixo (6,5%) quando comparado a produção isolada pela levedura, que resultou em 7,9%.

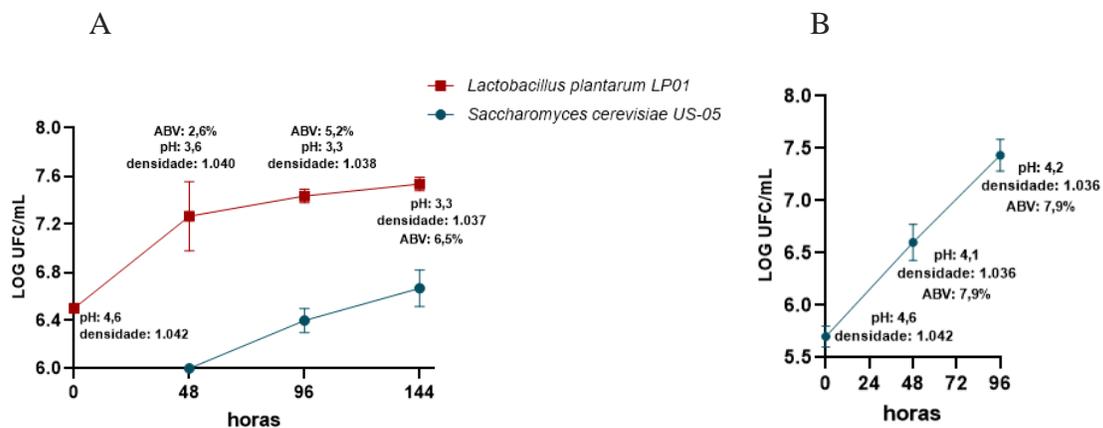


Figura 9. Efeito do co-cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* US-05 e *Lactobacillus plantarum* LP01 (A) e de *S. cerevisiae* US-05 cultivada isoladamente (B) em mosto cervejeiro.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, inicialmente um conjunto de bactérias lácticas isoladas de alimentos no Brasil foi avaliado quanto à capacidade de acidificar o mosto cervejeiro. Estirpes de coleção de cultura de espécies associadas ao ambiente cervejeiro foram utilizadas como controle. Entre as bactérias lácticas isoladas, apenas as pertencentes ao gênero *Lactobacillus* foram capazes de acidificar o mosto. Este estudo vai de encontro aos dados da literatura, que mostram que a acidificação do mosto tem sido realizada basicamente por *Lactobacillus* (Ciosek, Rusiecka e Poreda, 2019). Estes podem ser encontradas neste ambiente como produtoras ou, de forma indesejável, como deterioradoras (Sakamoto e Konings, 2003; Tyakht *et al.*, 2021).

A busca por novos fermentos pode ser considerada uma das mais conservadoras barreiras da tecnologia de produção cervejeira a ser derrubada. Nos últimos anos, que têm sido bastante inovadores no setor cervejeiro, uma série de marcas e tipos de cerveja foram desenvolvidos, onde variações como a inclusão de novos ingredientes, principalmente frutas e cervejas com baixo teor alcoólico e calórico parecem ser alvos dos avanços, que fazem alguma diferença para os consumidores. Como exemplo disso, a cervejaria Budweiser lançou em 2022 a cerveja Bud Zero® uma versão sem álcool da Budweiser (Oliveira *et al.*, 2021; Pacheco, 2022), além da Cervejaria Doktor Bräu, que em 2020 lançou três cervejas da linha Be Fit: uma Pilsen e uma IPA low carb e de baixo valor calórico, além da Isotonic Fruit Beer® que além dessas qualidades, também não apresenta álcool (Junior, 2022). Além disso, a fim de atender a demanda por produtos mais saudáveis, a cervejaria Ambev lançou a cerveja Michelob® conhecida por ter 80% menos carboidratos que as cervejas comuns (Ambev, 2021). Já na produção de cervejas frutadas, a Cervejaria Invicta (Ribeirão Preto, SP) produziu uma sour beer com carambola (*Averrhoa carambola*).

Algumas iniciativas em relação à busca de novos fermentos têm sido feitas em todo o mundo, onde sua origem, assim como da água utilizada no processo, parecem exercer um grande apelo comercial, agregando uma história ao produto comercializado. Como exemplo, o estilo de cerveja Leipzig Gose® é produzido no Norte da Alemanha com sementes de coentro, malte de trigo e água ligeiramente salgada proveniente dos aquíferos ricos em minerais em Goslar e seus arredores (Pellaud, 2016). Da mesma forma, em relação ao fermento, algumas marcas têm valorizado os chamados fermentos selvagens, que são aqueles que não são normalmente

utilizados na produção cervejeira. Atualmente, estes são considerados componentes importantes em cervejas de alto valor agregado, pois podem produzir sabores e aromas (*flavor*) particulares durante a fermentação (Maximilian *et al.*, 2016). Em relação ao uso de bactérias ácido lácticas, muitos estudos mostram que os principais gêneros normalmente envolvidos são *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Entretanto, as espécies de *Lactobacillus* são preferencialmente utilizadas devido à sua capacidade de rápida acidificação pela produção de ácido lático e baixo rendimento de metabólitos potentes de sabor associados a propriedades sensoriais indesejadas (Dysvik *et. al*, 2019).

Duas estirpes inicialmente testadas (*E. faecium* E86 e *Lactococcus lactis* 61) são produtoras de bacteriocinas, que são compostos antimicrobianos com ação principalmente contra microrganismos semelhantes, podendo ser utilizados como conservantes naturais. Ainda que estas estirpes tenham demonstrado capacidade de fermentar a maltose em estudos anteriores, elas não foram capazes de acidificar o mosto no período de incubação testado, mesmo quando este foi adicionado de glicose ou sacarose, que também podem ser fermentados por estes microrganismos. Estes resultados podem sugerir uma inadequação do mosto para sustentar a multiplicação destes microrganismos, como pressão osmótica ou algum outro fator intrínseco. Um fato importante é que as espécies dos gêneros *Enterococcus* e *Lactococcus* são menos exigentes nutricionalmente do que as do gênero *Lactobacillus*, que sugere que o fator nutricional não tenha sido um dos mais importantes no impedimento da multiplicação.

No trabalho de Basanta *et al.* (2008), *Enterococcus faecium* L50 demonstrou características desejáveis como bioconservante de cerveja, já que as bacteriocinas EntL50A e EntL50B inibiram o crescimento de muitas estirpes de BAL de deterioração de cerveja, além dessa estirpe ter apresentado suscetibilidade à maioria dos antibióticos clinicamente relevantes. Além disso, *E. faecium* L50 não foi capaz de crescer em mosto e em cervejas *Lager*, que mostra que não seriam responsáveis pela deterioração do produto. Apesar disso, a estirpe cresceu e produziu as bacteriocinas EntL50A e EntL50B em mosto modificado, podendo ser usado para bioacidificação e biocontrole de deterioração em mosto. Essas bacteriocinas testadas, principalmente EntL50A e EntL50B, exercem um efeito bactericida contra os deterioradores de cerveja *Pediococcus damnosus* CECT4797 e *Lactobacillus brevis* NFBC108 em caldo MRS, mosto e cervejas *lager*. Semelhante a esse estudo, apesar de ser produtora de duas bacteriocinas

(enterocina P e enterocina TW21) (Farias *et al.*, 2021), *Enterococcus faecium* E86 não foi capaz de crescer em mosto.

Ainda que não tenha acidificado a cerveja produzida pela nossa equipe, a estirpe *Lactococcus lactis* já foi isolada de cerveja de cevada (Todorov e Dicks, 2004). Já no estudo realizado por Bokulich e Bamforth (2013), diversas estirpes de *Lactobacillus* e *Pediococcus* foram isoladas de cerveja, espécies de *Enterococcus* e *Lactococcus*, normalmente associadas à fermentação de bebidas, não foram encontradas neste estudo. Apesar disso, de acordo com Sawadogo-Lingani *et al.* (2007) e Christine *et al.* (2016), a presença dos lactococos está mais associada às cervejas produzidas com sorgo.

A incapacidade de acidificar o mosto cervejeiro e a produção de compostos antimicrobianos contra bactérias lácticas pode abrir uma nova perspectiva de estudos, como o efeito protetor destas estirpes contra a contaminação por bactérias lácticas deterioradoras durante a fermentação cervejeira. A nisina é uma bacteriocina termoestável produzida por *Lactococcus lactis* e é a única bacteriocina com status GRAS (*Generally Regarded As Safe*) para uso em alimentos. Ela foi utilizada na forma purificada na prevenção da contaminação da cerveja, sem influenciar na capacidade fermentativa da levedura e nas características sensoriais do produto, conforme mostrado por Sun *et al.* (2012). Além disso, o trabalho de Todorov e Dicks (2004), avaliou a capacidade antimicrobiana da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* isolada de cerveja de cevada, que demonstrou inibir o crescimento de algumas bactérias lácticas, além de ter apresentado atividade contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A aplicação de bacteriocinas na cerveja, em conjunto com outras estratégias, como pasteurização e filtração, pode representar uma estratégia de biopreservação atraente para obter cervejas mais seguras e estáveis. O trabalho de Vaughan, Rouse e van Sinderen (2004), demonstrou que a atividade da bacteriocina de *Lactococcus lactis* M30 poderia ser aplicada nos casos em que o nível de contaminação seria relativamente baixo (por exemplo, na cerveja envasada), a fim de atuar como um seguro contra deterioração, mantendo o número de células em um nível que é muito baixo para causar deterioração da cerveja.

Em relação à resistência de bactérias ácido lácticas ao etanol, o trabalho de Liu e Qureshi (2009) demonstra que as bactérias gram-positivas, especialmente as bactérias do ácido láctico (BAL) são conhecidas por sobreviver e crescer em ambientes com maiores teores de etanol,

sendo que as principais cepas tolerantes ao etanol foram *L. plantarum*, *L. confusus*, *L. casei* e *L. brevis*. Além disso, o estudo de Pittet, Morrow e Ziola (2011) demonstra que a maioria das bactérias ácido lácticas têm altos níveis de tolerância ao etanol que são conservados dentro de isolados da mesma espécie em comparação com outros organismos. Apesar disso, demonstra que esses níveis de tolerância não garantem a capacidade de deteriorar a cerveja. Nosso resultado também vai de encontro com o trabalho de G-Alegría *et. al* (2004), que demonstrou que algumas linhagens *L. plantarum* se adaptaram às condições de pH ácido e presença de etanol, revelando uma alta tolerância para concentração de etanol até 13% (v/v) no meio e a valores pH na faixa de 3,2 a 3,4, além de possuírem mecanismos de resistência para sobreviver e proliferar em meios de vinho hostis. Dessa forma, nossos resultados em relação às duas estirpes de bactérias ácido lácticas vão de encontro com a literatura.

O teor alcoólico obtido na nossa cerveja ácida está dentro do valor médio comparado com o trabalho de Bossaert *et al.* (2021), no qual foram produzidas três cervejas ácidas em barril, em que a concentração de etanol ficou entre 3,8% e 10% ABV. Além disso, também se assemelha ao teor alcoólico de algumas cervejas ácidas já vendidas no mercado brasileiro, como as cervejas Bodebrown Regina Sour Limoncello Com Hortelã® produzida pela Cervejaria Bodebrown (Curitiba, Brasil) e Ignorus King Octopus Sour Ale® produzida pela Cervejaria Ignorus (Colombo, Brasil).

De acordo com Makanjuola, Tymon e Springham (1992), o resultado da adição de bactérias lácticas no mosto foi a diminuição progressiva no rendimento de etanol, na contagem final de levedura e no pH final do meio, mas ao contrário disso, a contagem bacteriana final aumentou. Já no trabalho de Ciosek, Rusiecka e Poreda (2019), foi demonstrado que, ao adicionar a estirpe de BAL antes da levedura, o pH decaiu para valores abaixo de 4 somente após 72 horas. Em nosso estudo, foi obtida uma rápida acidificação do mosto em 48 horas de fermentação por *L. plantarum* LP01, tempo este que pode reduzir as chances de contaminação do mosto ou multiplicação deste por microrganismos já presentes em baixas concentrações, como as leveduras selvagens e outras bactérias.

De acordo com Abdel-Rahman, Tashiro e Sonomoto (2013), a principal característica do sabor azedo das cervejas é decorrente da produção de ácido láctico pelas estirpes de BAL, obtendo um pH entre 3,3 a 3,9 (ideal para cervejas ácidas). No nosso estudo, no maior tempo de fermentação avaliado (144 horas) os valores de pH mais baixos obtidos foram em torno de 3,3.

Os níveis de resistência ao etanol e valores de IBU testados são compatíveis com a maioria das cervejas leves comercializadas, onde *L. plantarum LP01* apresentou resistência a todas as concentrações testadas, perfil de comportamento semelhante ao da estirpe controle.

A resistência ao lúpulo por estas bactérias é um importante fator uma vez que o mosto pode ser acidificado já tendo passado pela fervura e lupulagem, que ajudam na redução do risco de contaminação. De acordo com Dysvik *et al.* (2020b), o método mais utilizado para produção de cervejas ácidas consiste na fermentação da estirpe de BAL em mosto sem lúpulo antes da fermentação da levedura dentro de um curto período de tempo (24 a 48 horas), e após o nível de ácido láctico ser obtido, o mosto é adicionado de lúpulo e fervido para interromper a fermentação bacteriana.

Ainda que a atenuação do mosto tenha sido semelhante tanto na fermentação isolada pela levedura *S. cerevisiae US-05*, quanto em co-cultivo com *L. plantarum LP01*, a quantidade final de células e a concentração final de etanol foram maiores na fermentação realizada isoladamente por *S. cerevisiae* (Figuras 10A e 10B). Os fatores que resultaram na redução no números de células de leveduras no final da fermentação não foram investigados neste estudo. No estudo realizado por Dysvik *et al.* (2020a), a presença de lactobacilos não interferiu na viabilidade e contagem final de células de *S. cerevisiae*, além de ter demonstrado que a co-fermentação controlada entre *S. cerevisiae* e *L. plantarum* para produzir cerveja ácida dentro de um período de fermentação de 21 dias, resultou em um produto com maior intensidade de sabor total, odor frutado e odor de frutas secas.

Uma estirpe da espécie *L. plantarum* vem sendo comercializada pela Lallemand Inc., que é uma das líderes do mercado de fermentos no mundo. Este é utilizado para a produção de cervejas Berliner Weisse, Gose, estilo lambic, American Wild e Sour IPA.

A rápida acidificação do mosto causada por *L. plantarum LP01*, assim como a resistência ao etanol e lúpulo sugerem a realização de estudos adicionais visando uma potencial utilização industrial desta estirpe, sendo estes o estudo dos principais compostos aromáticos e metabólitos secundários que interferem no sabor produzidos pela estirpe, observar a fermentação em maiores intervalos de tempo e realizar análises sensoriais da cerveja ácida produzida com a estirpe.

7 CONCLUSÃO

Entre as estirpes testadas, *Lactobacillus plantarum* LP01 foi a única espécie que mostrou acidificar rapidamente o mosto sem reduzir significativamente o teor de açúcares, permitindo a posterior multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae* US-05.

A estirpe *Lactobacillus plantarum* LP01 mostrou resistência às concentrações de etanol testadas e aos diferentes valores de IBU empregados na maioria das cervejas comerciais.

A estirpe mostrou potencial para atuar como fermento na produção de uma cerveja ácida experimental.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, Volume 31 (6), pp. 877-902.

Agência de notícias do Paraná (2020) Produtor de cevada comemora colheita, qualidade e preço. Agência de notícias do Paraná (ANP), 30 nov. 2020. Disponível em:

<<https://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=109874>>. Acesso em: 15/09/2022.

Amaro A. D. J., Vieira A. G., Ferreira T. P. (2009). Processo de Produção de Cerveja. *Revista Processos Químicos*, pp. 61-71.

AS 10 CERVEJAS MAIS ALCOÓLICAS DO MUNDO. CLUBE DO MALTE, 2021. DISPONÍVEL EM:

<HTTPS://WWW.CLUBEDOMALTE.COM.BR/BLOG/CURIOSIDADES/AS-10-CERVEJAS-MAIS-ALCOOLICAS-DO-MUNDO/>>. ACESSO EM: 18/10/2022.

Associação Brasileira de Bares e Restaurantes (2022). Bebida com baixo teor alcoólico vira tendência no Brasil.

Abrasel, São Paulo, 08 jun. 2022. Disponível em: <<https://sp.abrasel.com.br/noticias/noticias/bebida-com-baixo-teor-alcoolico-vira-tendencia-no-brasil/>>. Acesso em: 03/10/2022.

Aquarone, E. (2013). Biotecnologia na Produção de Alimentos. *Biotecnologia Industrial*. pp. 91-144.

Axling U., Önning G., Combs M. A., Bogale A., Högström M., Svensson M. (2020) The Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on Iron Status and Physical Performance in Female Iron-Deficient Athletes: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients*, Volume 12 (5):1279.

Barros, C. R., Ghesti, G. F. (2016). Malte: essência da cerveja; edição e redação Chiara Rêgo Barros e Grace Ferreira Ghesti. Brasília: Universidade de Brasília, 30 p.: il.

Basanta A., Sánchez, J., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Hernández, P. E., Cintas, L. M. (2008). Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer-spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 125 (3), pp. 293–307.

Baxter, E. D., Hughes, P. S. (2001). An overview of the malting and brewing processes. pp. 1-13.

Behr J., Ganzle, M. G., Vogel, R. F. (2006). Characterization of a Highly Hop-Resistant *Lactobacillus brevis* Strain Lacking Hop Transport. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 72 (10), pp. 6483-6492.

Birch, R. M., Walker, G. M. (2000). Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 26 (9-10), pp. 678-687.

Bortoli, D. A. S., Santos, F., Stocco, N. M., Orelli Jr, A. A., Ton, A., Neme, F. F., Nascimento, D. D. (2013). Leveduras e produção de cervejas - revisão. *Bioenergia em revista: diálogos*, Volume 3 (1), pp. 45-58.

BJCP (2021). Beer Judge Certification Program. Beer Style Guidelines.

Bintsis T. Lactic acid bacteria: their applications in foods. *J Bacteriol Mycol Open Access*. 2018;6(2):89–94.

Bossaert, S., Crauwels, S., De Rouck, G., Lievens, B. (2019) The power of sour – A review: Old traditions, new opportunities. *Brewing Science* 72, pp. 78-88.

Bossaert, S., Winne, V., Opstaele, F. V., Buyse, J., Verreth, C., Herrera-Malaver, B., Geel, M. V., Verstrepen, K. J., Crauwels, S., Rouck, G., Lievens, B. (2019). Description of the temporal dynamics in microbial community composition and beer chemistry in sour beer production via barrel ageing of finished beers. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 339, 109030.

Bokulich, N. A., & Bamforth, C. W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Volume 77 (2), pp. 157–172.

Bonato, D. (2021). The diversity of commercially available ale and lager yeast strains and the impact of brewer's preferential yeast choice on the fermentative beer profiles. *Food Research International*, 141, 110125.

Brasil (1996). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 691 de 22 de novembro de 1996. Disponível em: <<http://www.masterinspect.com.br/pdfs/cevada.pdf>>. Acesso em: 21/09/2022.

BRASIL (1990). Lei nº 8.069, 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1990/lei-8069-13-julho-1990-372211-publicacaooriginal-1-pl.html>>. Acesso em: 26/09/2022.

BRASIL (2016). Decreto nº 8.772, 11 de maio de 2016. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/decreto/D8772.htm>. Acesso em: 26/09/2022.

Buzrul, S. (2007). A suitable model of microbial survival curves for beer pasteurization. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 40 (8), pp. 1330-1336.

Carvalho, G.B.M.; Rossi, A.A.; Almeida e Silva, J.B. (2007). Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2ª parte – A fermentação. *Revista Analytica*, n. 26, pp. 46-54.

Cereda, M. P. Cervejas. In: AQUARONE et al. *Biotecnologia alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. São Paulo: Edgar Blücher, 1983. Cap. 3, p. 46.

Chen, Zhao, J., Zhang, X., Yu, Z., e Ding. (2010). Determination of xanthohumol in beer based on cloud point extraction coupled with high performance liquid chromatography. *Talanta*, 81, 692–697.

Chiva-Blanch, Magraner, C., Valderas-Martínez, Roth, A., Casas, N., Hervas, S., et al. (2015). Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: A randomized feeding trial. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 25, pp. 36–45.

Ciosek, A., Rusiecka, I., Poreda, A. (2019). Sour beer production: impact of pitching sequence of yeast and lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 126, pp. 53-58.

Christine, N., Polycarpe, K. A. P., Adolphe, A., Haziz, S., Rolland, T. G., Aly, S., Mamoudou, D. H., Lamine, B. (2016). Diversity of lactic acid bacteria isolated from "kpètèkpètè" a ferment of traditional beer "tchoukoutou" produced in Benin. *African Journal of Microbiology Research*, Volume 10 (16), pp. 552-564.

De Gaetano, Costanzo, Di Castelnuovo, Badimon, B., Alkerwi, C.-B., Estruch, La V. (2016). Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 26, pp. 443–467.

A., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Westereng B., Rukke, E-O, Rouck, G., Wicklund, T. (2019). Pre-fermentation with lactic acid bacteria insour beer production. *Journal of the Institute of Brewing*, 125, pp. 342–356.

Dysvik A., La Rosa S.L., Liland K.H., Myhrer K.S., Østlie H.M., De Rouck G, Rukke E-O, Westereng B., Wicklund T. (2020a). Co-fermentation Involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* Species Tolerant to Brewing-Related Stress Factors for Controlled and Rapid Production of Sour Beer. *Front. Microbiol.* 11:279.

Dysvik, A., La Rosa, S. L., De Rouck, G., Rukke, E.-O., Westereng, B., & Wicklund, T. (2020b). Microbial dynamics in traditional and modern sour beer production. *Applied and Environmental Microbiology*.

Dragone, G.; Almeida E SILVA, J. B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). *Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia*. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. cap. 2, pp. 15-50.

Educa Mais Brasil (2020). Os acádios lideravam junto aos sumérios a região onde hoje fica o Iraque. Disponível em: <<https://www.educamaisbrasil.com.br/enem/historia/acadios>>. Acesso em: 21/09/2022.

Farias, F. M., Teixeira, L. M., Vallim, D. C., Bastos, M. do C. de F., Miguel, M. A. L., Bonelli, R. R. (2021). Characterization of *Enterococcus faecium* E86 bacteriocins and their inhibition properties against *Listeria monocytogenes* and vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, Volume 52 (3), pp. 1513–1522.

Ferrari, H. (2021). Ambev lucra R\$ 2,96 bilhões no 2º trimestre, alta de 116%. *Poder 360*, 29 jul. 2021. Disponível em: <<https://www.poder360.com.br/economia/amev-lucra-r-296-bilhoes-no-2o-trimestre-alta-de-116/>>. Acesso em: 20/09/2022.

G-Alegría, E., López, I., Ruiz, I. I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 230 (1), pp. 53–61.

Gao, Y., Liu, Y., Sun, M., Zhang, H., Mu, G., Tuo, Y. (2020). Physiological function analysis of *Lactobacillus plantarum* Y44 based on genotypic and phenotypic characteristics. *Journal of Dairy Science* Volume 103 (7).

Geitner, L. (2011). Reinheitsgebot: Political and Economic Context. Pub and Ale, Forthcoming. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=1744490>

Graf B. A., Milbury P. E., Blumberg J. B. (2005). Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food*, 8, pp. 281–290.

Hales, S. D., Marina Herrmann (trad.). (2010) *Cerveja e filosofia*, 1. ed., Rio de Janeiro: Tinta Negra Bazar Editorial, 2010. 288p.

Hieronymus, S. (2012) *For the Love of Hops: The Practical Guide to Aroma, Bitterness and the Culture of Hops*. Boulder: Brewers Publications, 2012

Himedia (2022). Technical Data. Disponível em: <<https://www.himedialabs.com/TD/M369.pdf>>. Acesso em: 21/09/2022.

Iserentant, D., Verachtert, H. (1995). Cloning and sequencing of the LEU2 homologue gene of *Schwanniomyces occidentalis*. *Yeast*, Volume 11 (5).

Jin, G., Jiranek, V., Hayes, A. M., Grbin, P. R. (2022). Isolation and Characterization of High-Ethanol-Tolerance Lactic Acid Bacteria from Australian Wine. *Foods* 11, 1231.

Junior, A. A. D., Vieira, A. G., Ferreira, T. P. (2009). *Revista Processos Químicos*, Volume 3 (6).

Junior, L. C. (2022). Cervejas funcionais crescem no Brasil. *Cervejar*, 14 abr. 2022. Disponível em: <<https://cervejar.com/cervejas-funcionais-crescem-no-brasil/>>. Acesso em: 03/10/2022.

Karabín, M., Jelínek, L., Kotrba, P., Cejnar, R., & Dostálek, P. (2018). Enhancing the performance of brewing yeasts. *Biotechnology Advances*, 36(3), pp. 691–706.

Kelly, Jared. (2019) An Ancient Elixir: Beer in Sumer. *International Social Science Review*: v. 95, Iss. 3, article 1.

Kuntz, R. J., Bamforth, C. W. (2007). Time Course for the Development of Enzymes in Barley. *Journal of The Institute of Brewing*, Volume 113 (2), pp. 196–205.

Kurtzman, C., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011). The Yeasts: a taxonomic study definition, classification and nomenclature of the yeasts. *The yeasts a taxonomic study*, pp. 3-9.

Kunze, W. (2006). *La cerveza terminada. Tecnología para Cerveceros y Malteros*. Berlín: VLB Berlin, 2006. cap. 7, pp. 826-885.

Li, H., Liu, F. (2015). The chemistry of sour taste and the strategy to reduce the sour taste of beer. *Food Chemistry*, Volume 185, pp. 200-204.

Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P., Sampaio J.P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Volume 108 (35):14539-44.

Liu, S., Qureshi, N. (2009). How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnology*, Volume 26 (3,4), pp. 117-121.

Lodder, J.; Rij, N. K. *The yeasts-a taxonomic study*. The yeasts-a taxonomic study., p. 2363, 1952.

Lu, Y., Bergenstahl, B., Nilsson, L. (2020). Interfacial properties and interaction between beer wort protein fractions and iso-humulone. *Food Hydrocolloids* 103.

Macedo, N. (2021) Brasil é o 3º país que mais consome cerveja no mundo. Edição do Brasil, [S.I], 11 de jun. de 2021. *Economia*. Disponível em: <<http://edicaodobrasil.com.br/2021/06/11/brasil-e-o-3o-pais-que-mais-consome-cerveja-no-mundo/>>. Acesso em: 20/09/2022.

Makanjuola, D. B., Tymon, A., Springham, D. G. (1992). Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. *Enzyme Microb. Technol.*, Volume 14.

MAPA (2021). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário da cerveja. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/arquivos/anuario-da-cerveja-2021.pdf>>. Acesso em: 21/09/2022.

MAPA (2019). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº65, de 10 de dezembro de 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-65-de-10-de-dezembro-de-2019.pdf>. Acesso em: 27/09/2022.

Martinez, U.-S., Martinez-Gonzalez, Andres-Lacueva, & Mitjavila. (2010). Dealcoholised beers reduce atherosclerosis and expression of adhesion molecules in apoe-deficient mice. *British Journal of Nutrition*, 105, 721–730.

Maximilian, M., Kopecká, J., Meier-Dornberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., Hutzler, M. (2015). Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspota delbrueckii* as model. *Yeast*, Volume 33 (4), pp. 129-144.

Meussdoerffer, F. G. (2009). A Comprehensive History of Beer Brewing. In: Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets. Stewart, G. G.; Russell, I.; Anstruther, A.; eds. (Boca Raton, CRC Press). pp. 1-42.

Narvhus J. A., Axelsson, L. (2003). Lactic acid bacteria. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition), pp. 3465-3472.

Número de cervejarias cresce 30% no país. Diário do comércio, [S.I], 3 de mar. de 2020. Negócios. Disponível em: <<https://diariodocomercio.com.br/negocios/numero-de-cervejarias-cresce-30-no-pais/>>. Acesso em: 14/09/2022.

Oliveira, M. S.R., Franzen F. L, Machado A. C. A., Bassaco, C. P., Manfio, M. (2021). Elaboração de cervejas artesanais com o uso de adjuntos cervejeiros regionais e flores comestíveis. *Brazilian Journal of Development* ISSN: 2525-8761.

OMS (2011). Organização Mundial da Saúde. Resolução CD51.R14. Disponível em: <<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/1716/CD51.R14-p.pdf?sequence=4&isAllowed=y>>. Acesso em: 21/09/2022.

Osorio-Paz, Brunauer, & Alavez. (2020). Beer and its non-alcoholic compounds in health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 3492–3505.

Pacheco, B. (2022). Adeus ao álcool? Bebidas com baixo e nenhum teor alcoólico são tendência entre consumidores da geração Z. Isto é dinheiro, 30 mar. 2022. Disponível em: <<https://www.istoedinheiro.com.br/adeus-ao-alcool-bebidas-com-baixo-e-nenhum-teor-alcoolico-sao-tendencia-entre-consumidores-da-geracao-z/>>. Acesso em: 03/10/2022.

Papazian, C. The complete joy of home brewing. 2. ed. Avon Books, 1991.

Pellaud, J. (2016). Tendências mundiais sobre diferentes ingredientes na cerveja, por Jerome Pellaud. All beers, 16 dez. 2016. Disponível em: [All Beers: Tendências mundiais sobre diferentes ingredientes na cerveja, por Jerome Pellaud](#). Acesso em: 04/10/2022.

Peyer, L. C., Zarnkow, M., Jacob, F., De Schutter, D. P., & Arendt, E. K. (2017). Sour Brewing: Impact of *Lactobacillus Amylovorus* FST2.11 on Technological and Quality Attributes of Acid Beers. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 75(3), pp. 207–216.

Phelan, MC, & Lawler, G. (1997). Contagem de Células. *Protocolos atuais em citometria*, 00(1), A.3A.1–A.3A.4.

Pinheiro, L.D.G.S. Caracterização e processamento de cevada cultivada no cerrado brasileiro. Dissertação 31 f. 2016. (Mestrado em Tecnologias Químicas e Biológicas). Instituto de Química da Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2016.

Pittet, V., Morrow, K., Ziola, B. (2011). Ethanol Tolerance of Lactic Acid Bacteria, Including Relevance of the Exopolysaccharide Gene Gtf. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Volume 69 (1), pp. 57–61.

Poelmans, E., & Swinnen, J. F. M. (2011). From Monasteries to Multinationals (and Back): A Historical Review of the Beer Economy. *SSRN Electronic Journal*.

Portal do Agronegócio (2021). Mercado cervejeiro cresce no Brasil e aumenta interesse pela produção nacional de lúpulo e cevada. Portal do Agronegócio, 13 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.portaldoagronegocio.com.br/agroindustria/processamento/noticias/mercado-cervejeiro-cresce-no-brasil-e-aumenta-interesse-pela-producao-nacional-de-lupulo-e-cevada#:~:text=Levantamento%20da%20Associa%C3%A7%C3%A3o%20Brasileira%20de,gira%20em%20torno%20de%2024>>. Acesso em: 30/09/2022.

Porto, P. D. Tecnologia de Fabricação de Malte: Uma Revisão. 58f, 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. 2011.

Rosa, N. A., Afonso, J. C. (2014). A química da cerveja. *Química nova escola*, Volume 37 (2), pp. 98-105.

Sabia, S., Fayosse, A., Dumurgier, J., Dugravot, A., Akbaraly, T., Britton, A., Singh-Manoux, A. (2018). Alcohol consumption and risk of dementia: 23 year follow-up of Whitehall II cohort study. *BMJ*, k2927.

Sawadogo-Lingani, H., Lei, V., Diawara, B., Nielsen, D. S., Møller, P. L., Traoré, A. S., Jakobsen, M. (2007). The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort for the production of sorghum beer. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 103 (4), pp. 765-777.

Sakamoto, K., A. Margolles, H. W. van Veen, and W. N., Konings. (2001). Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. *J. Bacteriol.* 183:5371-5375.

Sakamoto, K., Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 89, pp. 105-124.

Salmeron, I., Fucinos, P. (2009). Volatile compounds produced by the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in cereal-based substrates. *Food Chemistry*, Volume 117 (2), pp. 265-271.

Saini P., Beniwal A., Kokkiligadda A., Vij S. (2018). Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. *Process Biochemistry* 72. pp. 1-12.

Santos, M. S. dos. (2005). Produção de cerveja. Cervejas e refrigerantes. 21 ed. (São Paulo: CETESB) p. 16.

Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., Drider, D. (2017). Lactobacillus plantarum and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics Antimicrob Proteins*. PMID: 28271469.

Sewell, S. L. (2014). The Spatial Diffusion of Beer from its Sumerian Origins to Today. In: *The Geography of Beer*, M. Patterson, N. Hoalst-Pullen (eds.), pp. 23-29.

Silva, J. B. A. Cerveja. In: Venturini, W. G. Filho. *Tecnologia de bebidas*. São Paulo: Edgar Blücher, 2005. Cap. 15 p. 353.

Simpson, W. J. (1993). Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *Journal of The Institute of Brewing*, Volume 99 (5), pp. 405-411.

Siqueira, P. B., Bolini, H., Macedo G. A. (2008). O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, Volume 19 (4), pp. 491-498.

Spitaels, F., Kerrebroeck, S. V., Wieme A. D., Snauwaert I., Aerts M., Landschoot A. V., Vuyst L., Vandamme P. (2015). Microbiota and metabolites of aged bottled gueuze beers converge to the same composition. *Food Microbiology*. pp. 1-11.

Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., Stanley, G. A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* 109, pp. 13-24.

Suiker I. M., Wosten H. AB. (2022). Spoilage yeasts in beer and beer products. *Current Opinion in Food Science* 44:100815.

Sun, J., Zhu, R. X., Guo, J., Xiao, D. J. (2012). The Bacteriostasis Study of Nisin for the Raspberry Health Draft Beer. *Physics Procedia* 25, pp. 973-977.

Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M., Yamashita, H. (2006). A Review of Hop Resistance in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. *Journal Of The Institute Of Brewing*, Volume 112 (2), pp. 173-191.

Tancredo, J.T. Estudo de caso de melhoria na etapa de secagem de uma maltaria no RS. 48f. 2015. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2015.

Todorov, S. D., Dicks, L. M. T. (2004). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis subsp. lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *Journal Basic Microbiology*, Volume 44 (4), pp. 305-316.

Tyakht, A., Kopeliovich, A., Klimenko, N., Efimova, D., Dovidchenko, N., Odintsova, V., Kleimenov, M., Toshchakov, S., Popova, A., Klomyakova, M., Merkel, A. (2021). Characteristics of bacterial and yeast microbiomes in spontaneous and mixed-fermentation beer and cider. *Food Microbiology*, Volume 94.

Tschope, E. C. 2001. *Microcervejarias e Cervejarias. A História, a Arte e a Tecnologia*. Editora Ad. São Paulo.

Van Oevelen, D., L'Escaille F. De., Verachtert, H. (1976). Synthesis of aroma components during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze. *Journal of the Institute of Brewing*, Volume 82, pp. 322-326.

Vaughan, A., Rouse, S., Sinderen, D. V. (2004), Investigating the Antimicrobial Efficacy of a Lactococcal Bacteriocin for the Development of Microbiologically Stable Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, Volume 110, pp. 181-188.

Vaughan, A., O'Sullivan, T., Van Sinderen, D. (2005). Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer — A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, Volume 111, pp. 355-371.

Venturelli, B., Biendl, L., Frank, & Busch. (2016). Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition*, 32, 1171–1178.

Venturini Filho, W.G. (2005). *Tecnologia das bebidas*, 1ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2007.

Vidgren, V., Multanen, J. P., Ruohonen, L., Londesborough J. (2010). The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeast. *FEMS Yeast Res* 10(4):402-11.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Delvaux, F. R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol*, n. 61, p. 197-205.

Zacharof, M. P., Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria - a review article. *APCBEE Procedia*, Volume 2, pp. 50-56.

Zhang, Q., Sun, Q., Tan, X., Zhang, S., Zheng, L., Tang, J., Xiang, W. (2020). Characterization of g-aminobutyric acid (GABA)-producing *Saccharomyces cerevisiae* and coculture with *Lactobacillus plantarum* for mulberry beverage brewing. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Volume 129 (4), pp. 447-453.

