



Avaliação do comportamento e viabilidade celular de levedura em diferentes alturas durante a fermentação de cerveja Ale

Onildo Ribeiro Lima¹; Guilherme Lorencini Schuina²; Vanildo Luiz Del Bianchi³

Como Citar:

LIMA, Onildo Ribeiro; BIANCHI, Vanildo Luiz.; SCHUINA, Guilherme Lorencini. Avaliação de comportamento e viabilidade celular de levedura em diferentes alturas na fermentação de cerveja ale. Revista Sociedade Científica, vol. 7, n. 1, p.1042-1062, 2024.
<https://doi.org/10.61411/rsc202434017>

DOI: [10.61411/rsc202434017](https://doi.org/10.61411/rsc202434017)

Área do conhecimento: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Palavras-chaves: Leveduras, viabilidade celular, microbiologia, produção de cerveja, Fermentação

Publicado: 23 de fevereiro de 2024

Resumo

As leveduras influenciam o aroma, sabor, cor, turbidez, formação de espuma, e portanto a qualidade final da cerveja, e sua escolha depende do tipo de cerveja que será produzida. As leveduras mais usadas no processo de produção de cerveja são as do gênero *Saccharomyces*, sendo classificadas em alta fermentação (Ale), atuando próximo da superfície do mosto, e fermentação baixa (Lager) atuando no fundo do reator. Mas é isso mesmo que acontece com uma levedura de fermentação alta, como por exemplo a *Saccharomyces cerevisiae*? O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento e a viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (S-04) durante a fermentação em duas diferentes temperaturas: 12°C e 18°C, em diferentes alturas no reator, sendo no topo do reator, no meio do reator e próximo ao fundo. Os resultados mostraram que sendo uma levedura de fermentação alta, atuou em todo o reator, nas duas temperaturas, e nas três alturas analisadas, e a fermentação da cerveja ocorreu em todo o reator, e não somente no topo, a viabilidade celular ficou semelhante nas duas temperaturas, assim como também as análises físico-químicas de °Brix, pH, e teor alcoólico. Com isso chega-se à conclusão que a levedura atuou por todo o reator, a fermentação ocorreu nas três alturas analisadas, sendo assim conclui-se que não é correto afirmar que uma levedura de fermentação alta atue somente no topo ou na superfície do mosto.

1. Introdução

A cerveja foi descoberta de forma acidental a milhares de anos onde hoje encontra-se a China e o Oriente médio, e desde então vem sendo aprimorada, melhorando as técnicas de produção. Por volta do início do século XIX, Louis Pasteur

¹Universidade Estadual Paulista Ibilce, São José do Rio Preto -SP-Brasil ✉

²Universidade Estadual Paulista Ibilce, São José do Rio Preto -SP-Brasil ✉

³Universidade Estadual Paulista Ibilce, São José do Rio Preto -SP-Brasil ✉



concluiu que as leveduras eram as responsáveis pela fermentação . A principal responsável pela transformação da água, malte e lúpulo em cerveja são as leveduras, que fazem o trabalho de fermentação, transformando os açúcares presentes no malte em álcool e CO₂, e como resultado final temos a cerveja.

As leveduras influenciam o aroma, sabor, cor, turbidez, formação de espuma, e portanto a qualidade final da cerveja, e sua escolha depende do tipo de cerveja que será produzida. As leveduras mais utilizadas na produção de cerveja são as do gênero *Saccharomyces*, sendo essas classificadas com base na temperatura e comportamento durante fermentação, sendo alta (Ale), atuando com temperatura que varia de 14°C a 25°C, e predominantemente na superfície do mosto, como exemplo a *Saccharomyces cerevisiae*, e fermentação baixa (Lager), atuando com temperatura que varia de 4°C a 12°C e atuando predominantemente no fundo do reator, exemplo a *Saccharomyces pastorianus* .

Conhecer a viabilidade celular e o comportamento das leveduras, durante a fermentação resulta em melhor rendimento na produção de cerveja, onde quanto maior o número de células viáveis (leveduras vivas), melhor será o rendimento e a qualidade do produto final, sendo este um dos aspectos mais importantes no processo de fermentação. Entre as variáveis que influenciam na viabilidade, está o controle de temperatura, muito importante para o crescimento celular e conseqüentemente para a viabilidade celular .

A levedura utilizada neste estudo foi a *Saccharomyces cerevisiae* S-04, e esta foi submetida a duas temperaturas diferentes, 12°C e 18°C, as amostras foram coletadas em um período de 10 dias a cada 24h fase durante a fermentação, e em três diferentes alturas nos reatores, sendo próximo à superfície do mosto, no meio e próximo ao fundo do reator, foram analisados o comportamento e a viabilidade celular em cada uma das alturas, e também foram realizadas as físico-químicas de °Brix, pH, teor alcoólico. Entender o real comportamento das leveduras, auxilia na escolha da levedura, de acordo



com o tipo de cerveja que se deseja produzir, conferindo características particulares de cada levedura, e com isso melhorando o rendimento do processo de produção.

2. Referencial teórico Leveduras

A transformação da água, malte e lúpulo em cerveja, acontece por meio do trabalho das leveduras. As leveduras mais usadas na indústria cervejeira são as do gênero *Saccharomyces*, a sua reprodução acontece por brotamento ou gemulação de forma rápida. Quando adicionadas ao mosto elas metabolizam a mistura de malte e água e lúpulo, rica em açúcares, as transformando em álcool e CO₂.

A classificação das leveduras tem como base na temperatura e no seu comportamento durante a fermentação, leveduras de alta fermentação (Ale), tem como característica subir à superfície durante a fermentação, em temperatura de 14°C a 25°C, (Figura 1: 1), e leveduras de baixa fermentação (Lager), que tem como característica decantar durante a fermentação, em uma temperatura mais baixa, de 4°C a 12°C (Figura 1: 2) (9)

A *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada em cervejas tipo ale, atuam predominantemente na superfície do mosto (alta fermentação), possui ação rápida de reprodução, mas não consomem todo o açúcar presente no malte. Devido a isto a cerveja pode apresentar um sabor frutado, complexo e doce. A fermentação ocorre por um curto período de tempo, e possui como característica a formação de flocos. A *Saccharomyces pastorianus*, utilizada na cerveja tipo lager, atua predominantemente no fundo do fermentador (baixa fermentação), possui uma reprodução mais lenta e menos densa, sendo mais eficaz, resultando em uma cerveja mais limpa e com sabor seco. A fermentação ocorre por um período de tempo maior (10).

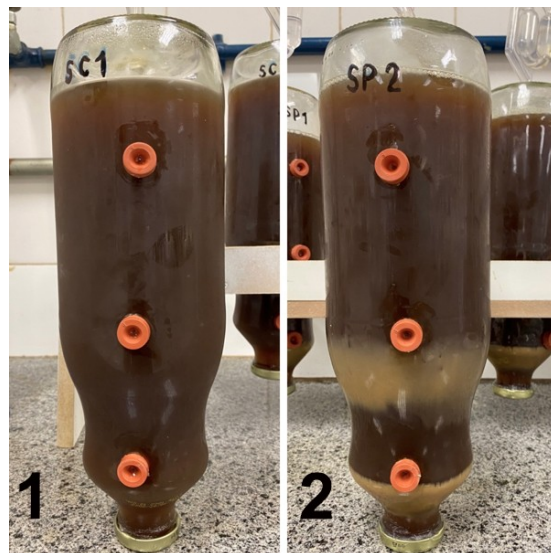


Figura 1 - Levedura de alta fermentação *Saccharomyces cerevisiae* (1) e levedura de baixa fermentação *Saccharomyces pastorianus* (2). Fonte: Autor, 2023.

As leveduras além de transformarem os açúcares do malte em álcool e CO₂ podem produzir diversos ácidos orgânicos, como ácidos acético, lático e succínico, gerando também álcoois como etanol e glicerol, que atuam diretamente na qualidade e no tipo de cerveja a ser produzida, definindo sabores e aromas caraterísticos (4; 17)

Existem diversas cepas de leveduras do gênero *Saccharomyces*, cada uma com as características do tipo de cerveja a ser produzida, principalmente cervejas artesanais. Quando o objetivo é produzir uma cerveja onde se evidencie um sabor lupulado ou maltado, escolhe-se uma levedura neutra, com perfil baixo de sabor, para não se sobressair ao sabor desejado. Se o objetivo é produzir uma cerveja com sabor frutado, utiliza-se uma levedura que evidencie esse sabor. As cervejas do tipo Sour, são fermentadas com cepas de leveduras que acidificam o mosto, produzindo ácido lático e acético, que irá dar a cerveja um sabor ácido, típico deste tipo de cerveja 16; 12

As *Saccharomyces* e suas cepas são as mais utilizadas na indústria, atualmente grande parte das leveduras são híbridas, isso significa que existe mais de uma espécie ou cepa em conjunto, e podem ser criadas ou obtidas naturalmente, ou obtidas em



laboratório. A *Saccharomyces pastorianus*, é um híbrido entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Sacharomyces eubayanus*, com esse cruzamento a *Saccharomyces pastorianus* herdou a utilização eficiente da maltotriose da *Saccharomyces cerevisiae*, e a tolerância ao frio da *Sacharomyces eubayanus* (7; 1)

A reprodução e o crescimento das leveduras possuem três fases durante a fermentação, começando pela fase lag, onde as leveduras passam por um processo de adaptação ao meio (mosto), não acontecendo crescimento celular, após sua adaptação começa a fase exponencial, começando a reprodução das leveduras através da divisão das células, com rápido consumo de substrato e consequente aumento da massa celular. Após o crescimento exponencial das leveduras, elas entram na fase estacionária, com o número de células viáveis e não viáveis se mantendo constante. Na última fase as leveduras não viáveis ultrapassam a quantidade de viáveis, devido as condições do mosto ficarem impróprias para as leveduras sobreviverem, pois o substrato foi consumido durante as fases exponencial e estacionária (18).

Durante a fermentação do mosto, os açúcares são parcialmente quebrados, sendo os principais: a maltose (40 a 65%), maltotriose (15 a 20%) e glicose (10 a 15%), juntos compõem até 80% dos carboidratos que estão presentes no mosto, os outros 20% são compostos pela frutose (2 a 5%), sacarose (3 a 6%) e açúcares não fermentáveis (20 a 30%), que as leveduras metabolizam de forma lenta ou não metabolizam W (19;8).

Durante a fermentação as leveduras consomem e metabolizam esses açúcares em sequência, começando com a sacarose, e ao mesmo tempo metabolizando a glicose, consumindo por volta de 50%, quando começa metabolizar a maltose, e finalmente metabolizando a maltotriose, sendo que a maltotriose é metabolizada de forma lenta, o que pode ocasionar menor rendimento, resultando em cervejas com baixo teor alcoólico, e níveis de açúcar elevados 11.

A viabilidade celular pode sofrer diversas interferências, como por exemplo as contaminações que podem ser microbianas, que podem ser de uma enorme variedade de fontes, e classificadas em: primários, originados das matérias-primas e equipamentos de



produção, e os secundários, quando a cerveja é contaminada durante a fase de engarrafamento 14;15

3. **Metodologia**

Foram realizados ensaios em pequena escala, sendo utilizados reatores de vidro, com capacidade de 1,5L cada (Figura 2), Foi produzido o mosto para a cerveja, Lager, utilizando extrato de malte seco (DME), sendo adicionado o extrato de malte na proporção de 150 g/L, tendo como resultado 15°Brix, foi iniciada a fervura do mosto por 30 minutos, após trinta minutos foi adicionado o lúpulo Saas 7,5% (Republica Tcheca), na proporção de 1 g/L, e continuou a fervura por mais 30 minutos, finalizando com 1 hora de fervura. Esperou-se vinte minutos para a decantação do trub (resíduo do lúpulo), e então o mosto foi resfriado em um trocador de calor de placas tipo chiller, bombeando com controle de vazão, utilizando água em temperatura ambiente para o resfriamento, baixando a temperatura de 80°C para 25°C, para então fazer a transferência do mosto para outro recipiente.

Então foi adicionada a levedura ao mosto para cerveja ale, utilizando a levedura Saf ale S-04 *Saccharomyces cerevisiae*, marca Fermentis®, na proporção de 1,2g/L, e realizada a homogeneização.



Figura 2: Reatores de vidro utilizados. Fonte: Autor, 2023.

Os reatores foram resfriados nas temperaturas de 12°C e 18°C por um período de 10 dias. A coleta das amostras foi realizada a cada 24 horas (sempre no período da manhã), e foram avaliadas a viabilidade e o comportamento da levedura durante a fermentação em três diferentes alturas nos reatores, sendo a Altura 1 (A1) na superfície, Altura 2 (A2) no meio do reator e Altura 3 (A3) próximo ao fundo do reator, Figura 3. As amostras foram coletadas nas diferentes alturas dos reatores, utilizando uma seringa de 3ml e agulha, Figura 3.

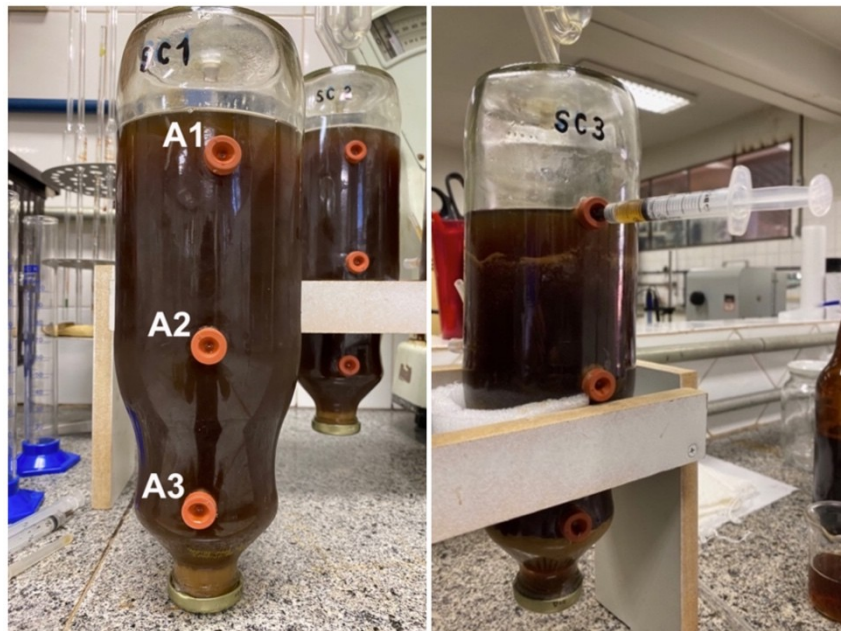


Figura 3: Altura de retida das amostras e método de coleta das amostras com agulha e seringa

4. Método de análise de viabilidade e análises físico-químicas

Para a análise de viabilidade celular foi utilizado o método do azul de metileno, onde as células viáveis ficam sem coloração e células não viáveis com coloração azul, e dessa forma é realizada a contagem. Para o início da contagem primeiro foi necessário realizar a diluição das amostras de cerveja (todas em triplicata), uma vez que sem diluição, em alguns casos não é possível realizar a contagem, devido a elevada quantidade de células, então diluiu-se a amostra na proporção de 1/10, sendo adicionado em um tubo de ensaio 9ml de água deionizada e 1ml da amostra. Após a diluição transferiu-se se 1ml da amostra diluída em um tubo de ensaio e em seguida foi adicionado 1ml da solução de azul de metileno a 0,01%, com uma pipeta Pasteur foi adicionada uma pequena quantidade de amostra em um dos canais da câmara de Neubauer, até que os canais da câmara estivessem preenchidos juntamente com espaço entre a lamínula e a câmara na sua parte espelhada.



Então foram colocadas microscópio (Marca MLW-Junior Lab), primeiro utilizando a objetiva de 10x para localizar os quadrantes, e após usando a objetiva de 40x para realizar contagem, sendo definido que contagem seria realizada nos quadrados médios no centro da câmara, realizando a contagem em 4 quadrados situados nos cantos, circulado em vermelho, de acordo com a Figura 4(6;20)

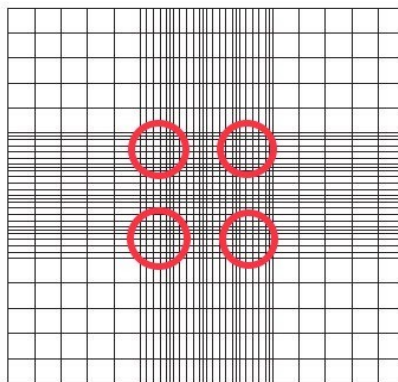


Figura 4: Método de contagem de leveduras utilizado. Fonte: Adaptado pelo autor.

Após a contagem foram realizados os cálculos de quantidade de células presentes em cada um dos pontos dos reatores (equação 1) e a porcentagem de células viáveis, (equação 2):

$$\text{Quantidade de células: } (\text{número de células contadas} / 4 \times 25) \times 4 \times 10^6 \quad (1)$$

Onde: 4 é o número de sub-quadrantes onde foi realizada a contagem, 25 é o número de sub-quadrantes presentes no quadrante central e 4×10^6 é a extrapolação entre a quantidade de células em um quadradinho para a quantidade de células por ml.

$$\text{Porcentagem de células viáveis: } (\text{quantidade de células viáveis} / \text{quantidade de células totais}) \times 100 \quad (2)$$

Foram realizadas as análises físico-químicas de (todas em triplicata) de sólidos solúveis totais (°Brix) realizada através de refratometria, pH utilizado um pHmetro portátil; concentração de biomassa celular, utilizando como amostra de referência uma



cubeta com água deionizada (Branco), no espectrofotômetro (Marca: Bioespectro, modelo: SP-22), sendo escolhido o comprimento de onda de 600nm; e teor alcoólico, utilizando uma proveta de 100ml e um mini densímetro, onde foi adicionado 100ml da amostra de cerveja, coletada na altura 2 dos reatores, através desta leitura realizou-se o cálculo para a obtenção do teor alcoólico utilizando o método ABV (Alcohol By Volume) através da seguinte equação 3: (21)

$$D_i - D_f \times 131,25 = \text{Teor Alcoólico} \quad (3)$$

Onde:

D_i : Densidade inicial

D_f : Densidade Final

A análise dos dados das análises físico-químicas foi realizada através dos softwares Microsoft Excel® e Minitab®, com os resultados sendo mostrados em média \pm desvio padrão e avaliada através de análise de variância fator único (Anova fator unico) e teste de comparação múltipla de Tukey com significância de 0,05% .

5. **Desenvolvimento e discussão**

Análise de viabilidade celular e comportamento da *Saccharomyces cerevisiae*:

Altura 1 do reator (Próximo da superfície do mosto)

A *Saccharomyces Cerevisiae* tem como característica ser uma levedura de fermentação alta, como já dito anteriormente, com temperaturas de fermentação entre 14 e 25°C, sendo assim a temperatura de 12°C causa possível estresse estando abaixo da temperatura ideal, e 18°C estando dentro de sua faixa de temperatura ideal.

Nas figuras 5 e 6, temos os dados de viabilidade celular e quantidade total de células por ml obtidos na altura 1 (próximo da superfície do mosto) no reator, (reator de vidro de 1,5L) em 12°C e 18°C, no período do tempo 0 ao 9. Pode-se ver nas figuras 5 e



6, que a viabilidade celular e a quantidade total de células (viáveis e não viáveis) durante a fermentação ocorreu de forma semelhante ao longo do tempo nas duas temperaturas, nas duas temperaturas a fase exponencial (Figura 5) aconteceu do tempo 0 ao 2, ficando em 10^7 (com excessão do tempo 1 em 12°C), e se estabilizando a partir do tempo 5 para o 6 até tempo 8 aconteceu uma segunda fermentação em 18°C .

A temperatura de 12°C inibiu a segunda fermentação na superfície do mosto, mas do tempo 0 a 9, tanto a quantidade de leveduras viáveis quanto a quantidade total de células por ml, ficaram praticamente estabilizadas. É importante notar que em 12°C , a mesma quantidade de leveduras viáveis presentes no tempo 0 ($1,02 \times 10^7$) se manteve no final da fermentação tempo 9, finalizando com $1,00 \times 10^7$, e o mesmo se aplica para quantidade total de leveduras, quando se observa o tempo 0 e o tempo 9. A porcentagem de células viáveis ao longo dos tempos foi semelhante nas duas temperaturas, maior em 18°C , iniciando em 81%, e diminuindo a partir do tempo 1, finalizando em 56% no tempo 9. Em 12°C , a porcentagem de leveduras viáveis iniciou-se com 77% diminuindo também a partir do tempo 1 e finalizando a partir do tempo 9 em 68%, Tabela 1.

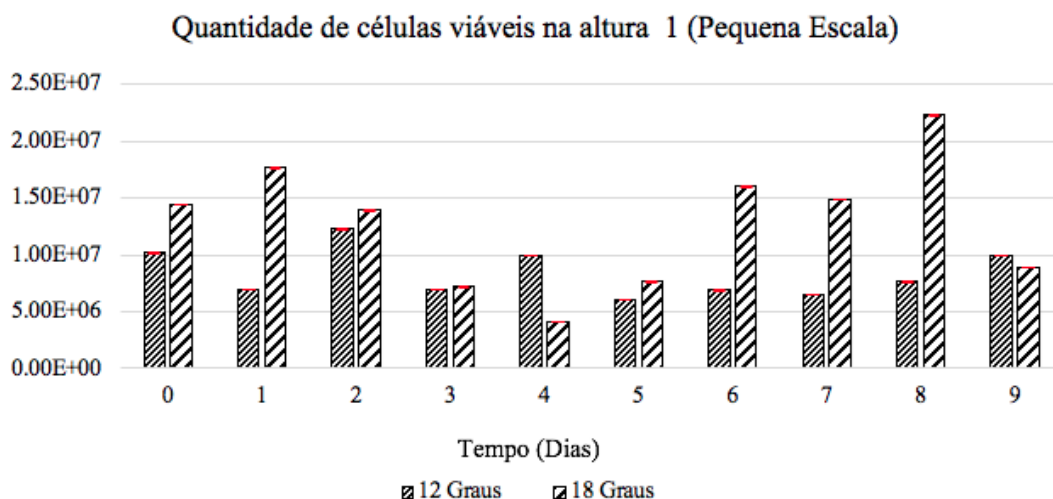


Figura 5: Quantidade de células viáveis por ml na altura 1 em 12°C e 18°C . Fonte: Autor, 2023.

Quantidade total de células na altura 1 (Pequena Escala)

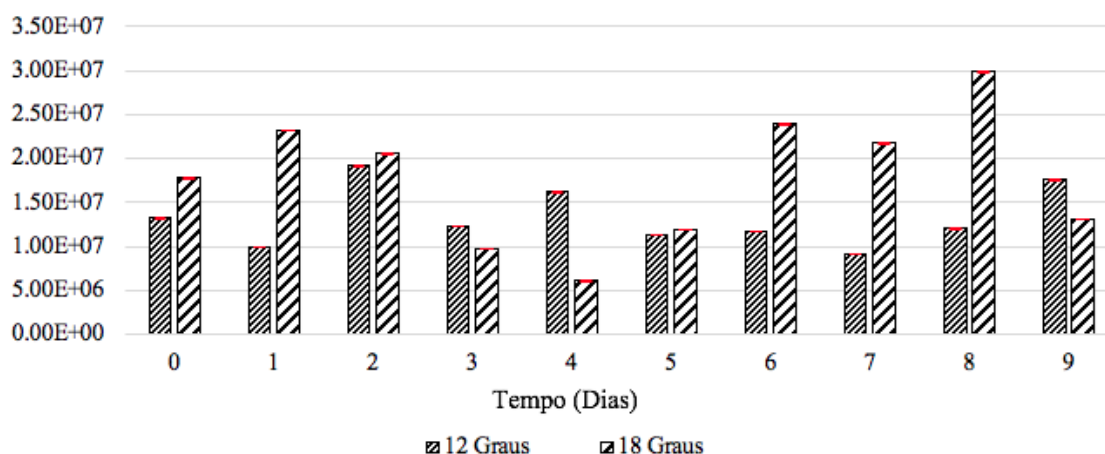


Figura 6: Quantidade total de células por ml na altura 1 em 12°C e 18°C. Fonte: Autor, 2023.

Tabela 1: Porcentagem de viabilidade celular na altura 1

Altura 1		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	77%	81%
1	63%	69%
2	64%	68%
3	56%	74%
4	67%	62%
5	54%	65%
6	59%	76%
7	70%	68%
8	64%	74%
9	68%	56%

Altura 2 do reator (Meio do Reator)

Na altura 2 vemos que a fermentação teve uma menor quantidade de células viáveis por ml (Figura 7), tendo uma fase de subida ou fase exponencial em 18°C no tempo 0 e 1, se mantendo em 10^7 , caindo e ficando estável até o tempo 5, o mesmo acontecendo com a quantidade total de células por ml nesta altura do reator, ou seja no



meio do reator (Figura 8), do tempo 6 ao 7 houve um salto tanto na quantidade de leveduras viáveis quanto na quantidade de leveduras totais em 18°C, tendo uma segunda fermentação.

Em 12°C, a fase lag da levedura foi maior, e a fase de crescimento celular foi no tempo 2 e logo após decaindo e voltando a subir a partir do tempo 6 até o 9, onde pode ser observado uma segunda fermentação, mais lenta que em 18°C, tanto para quantidade de leveduras viáveis quanto para células totais (Figuras 7 e 8). Até esta altura no reator, a fermentação ocorreu de forma semelhante não se limitando apenas a altura 1. Na tabela 2, temos as porcentagens de leveduras viáveis na altura 2 do reator, iniciou com as mesmas porcentagens da altura 1, e foi reduzindo a partir do tempo 1, e finalizando com 63% para 12°C e 59% para 18°C.

Quantidade de células viáveis na Altura 2 (Pequena Escala)

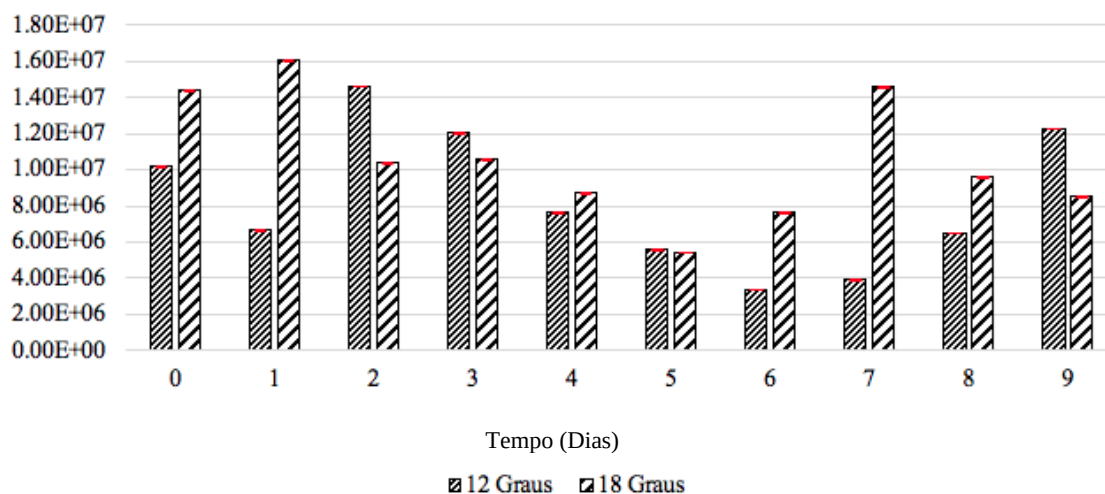


Figura 7: Quantidade de células viáveis na altura 2 em 12°C e 18°C. Fonte: Autor, 2023.

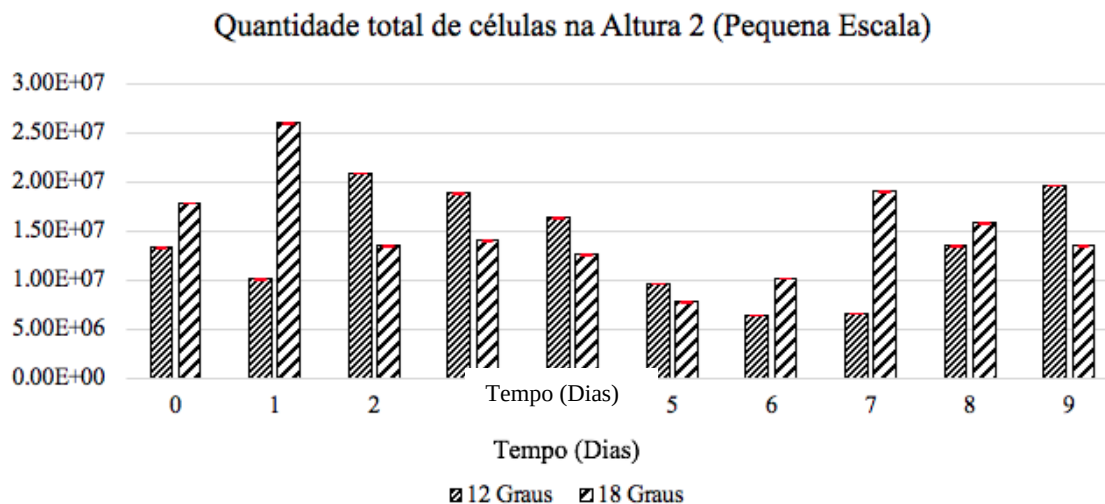


Figura 8: Quantidade total de células na altura 2 em 12°C e 18°C. Fonte: Autor, 2023.

Tabela 2: Porcentagem de viabilidade celular na altura 2

Altura 2		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	77%	81%
1	59%	65%
2	70%	77%
3	64%	75%
4	69%	47%
5	59%	68%
6	52%	76%
7	59%	76%
8	48%	61%
9	63%	59%

Altura 3 do reator (Próximo ao fundo do Reator)

Descendo para a altura 3, que é próximo ao fundo do reator, vemos que a fermentação não ocorreu de forma uniforme, tanto em relação a quantidade de leveduras viáveis por ml, quanto em relação a quantidade total de leveduras por ml (viáveis e não viáveis), Figuras 9 e 10. Em 18°C a viabilidade celular e a quantidade total de leveduras ficaram oscilando entre os tempos 0 e 4, entre 10^6 e 10^7 , caindo no tempo 5 e subindo



levemente até o tempo 9, o mesmo acontecendo com a quantidade total de leveduras, se estabilizando e indicando o final da fermentação. Em 12°C a viabilidade celular se manteve estável nos tempos 0 e 1, estando em 10^7 e caindo para 10^6 no tempo 2, nos tempos 3 e 4 a viabilidade aumentou novamente para 10^7 e a partir do tempo 4 foi diminuindo para 10^6 novamente, indicando o fim da fermentação. No ponto 9 houve um aumento tanto da quantidade de leveduras viáveis quanto da quantidade total de leveduras, sendo o início de uma segunda fermentação.

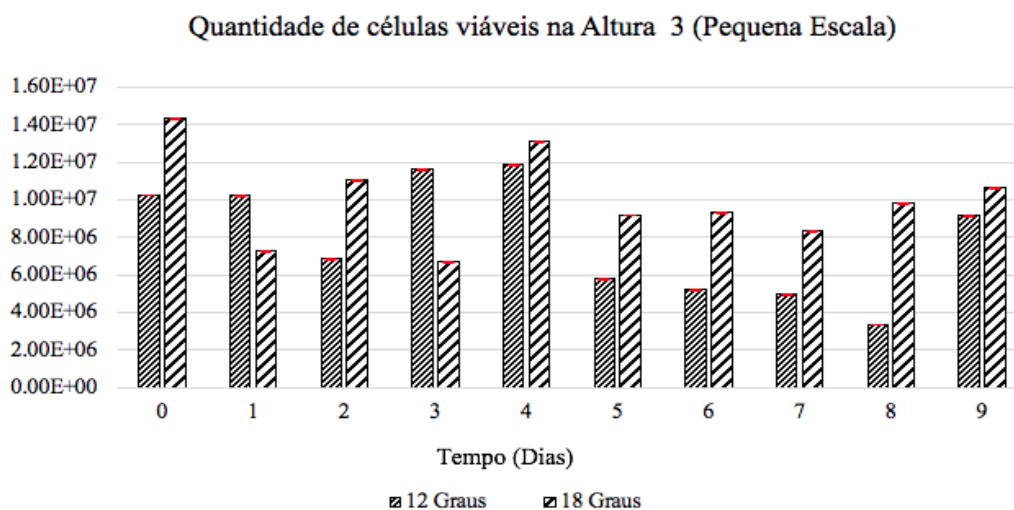


Figura 9: Quantidade total de células na altura 3 em 12°C e 18°C. Fonte: Autor, 2023.

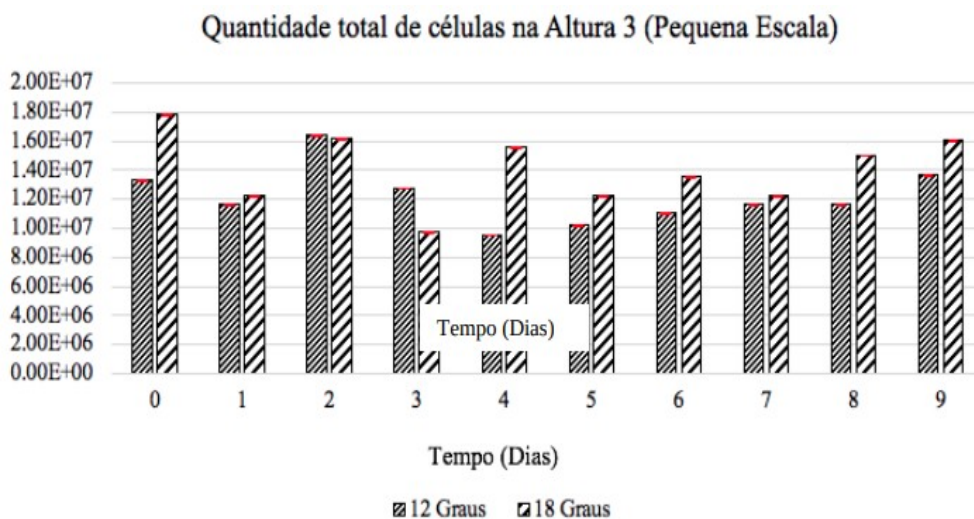


Figura 10: Quantidade total de células na altura 2 em 12°C e 18°C, Fonte: Autor, 2023.

Tabela 3: Porcentagem de viabilidade celular na altura 3

Altura 3		
%Viabilidade		
Tempo	12 Graus	18 Graus
0	77%	81%
1	59%	52%
2	66%	68%
3	68%	62%
4	63%	83%
5		75%
6	55%	69%
7	57%	68%
8	64%	65%
9	62%	66%

Análises físico químicas

O °Brix inicial para 12°C e 18°C foi de 16.4 e 16.2 respectivamente, em 12°C o °Brix se estabilizou em 14.1 a partir do tempo 6, finalizando em 14.0 no tempo 9. Em 18°C o °Brix se estabilizou em 14.0 do tempo 6 para o 7, finalizando em 14.0 no tempo 9, não houve diferença estatística nos tempos e nas duas temperaturas, Tabela 4.



Tabela 4: °Brix durante a fermentação

Tempo (Dias)	°Brix					
	12 Graus			18 Graus		
0	16.4	±	0.115 ^a	16.2	±	0.058 ^a
1	16.0	±	0.058 ^a	16.0	±	0.058 ^a
2	15.4	±	0.058 ^a	15.2	±	0.058 ^a
3	15.3	±	0.058 ^a	14.8	±	0.346 ^a
4	15.1	±	0.058 ^a	14.6	±	0.346 ^a
5	15.0	±	0.058 ^a	14.2	±	0.058 ^a
6	14.0	±	0.058 ^a	14.1	±	0.058 ^a
7	14.0	±	0.058 ^a	14.0	±	0.058 ^a
8	14.1	±	0.058 ^a	14.0	±	0.058 ^a
9	14.0	±	0.058 ^a	14.0	±	0.058 ^a

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$.

O pH para 12°C iniciou em 5.63, e finalizou em 3.89 no tempo 9, já em 18°C teve início em 5.67 finalizou também em 3.89 no tempo 9, nas duas temperaturas o pH não apresentou diferença estatística, Tabela 5.

Tabela 5: pH durante a fermentação

Tempo (Dias)	pH					
	12 Graus			18 Graus		
0	5.63	±	0.015 ^a	5.67	±	0.006 ^a
1	4.41	±	0.012 ^a	4.32	±	0.006 ^a
2	4.25	±	0.012 ^a	4.19	±	0.010 ^a
3	4.21	±	0.006 ^a	4.11	±	0.006 ^a
4	4.15	±	0.006 ^a	4.05	±	0.010 ^a
5	4.12	±	0.006 ^a	4.03	±	0.012 ^a
6	4.04	±	0.006 ^a	4.00	±	0.006 ^a
7	3.97	±	0.006 ^a	3.90	±	0.006 ^a
8	3.98	±	0.006 ^a	3.92	±	0.006 ^a
9	3.89	±	0.010 ^a	3.89	±	0.012 ^a

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$.



O teor alcoólico ficou abaixo do esperado (Tabela 6), tanto em 12°C, como em 18°C, finalizando no tempo 9 com 1,24% para 12°C e 1,23% para 18°C. De acordo com legislação brasileira a cerveja produzida com teor alcoólico acima de 0,5% e igual ou inferior a 2,0%, é classificada como cerveja de teor alcoólico reduzido ou cerveja com baixo teor alcoólico, seguindo a legislação brasileira a cerveja produzida foi uma ale com teor alcoólico reduzido (3) Também não houve diferença estatística entre as duas temperaturas.

Tabela 6: Teor alcoólico durante a fermentação

Tempo (Dias)	Teor alcoólico					
	12 Graus			18 Graus		
0	0.00%	±	0.000 ^a	0.00%	±	0.000 ^a
1	0.19%	±	0.001 ^a	0.09%	±	0.000 ^a
2	0.57%	±	0.001 ^a	0.60%	±	0.000 ^a
3	0.62%	±	0.001 ^a	0.80%	±	0.002 ^a
4	0.70%	±	0.001 ^a	0.91%	±	0.002 ^a
5	0.75%	±	0.001 ^a	1.12%	±	0.001 ^a
6	1.30%	±	0.001 ^a	1.22%	±	0.000 ^a
7	1.31%	±	0.001 ^a	1.23%	±	0.000 ^a
8	1.24%	±	0.001 ^a	1.21%	±	0.000 ^a
9	1.24%	±	0.001 ^a	1.23%	±	0.000 ^a

± Média seguida do desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas no teste de comparação múltipla de Tukey a $P \leq 0,05$.

5. Considerações finais

Os resultados mostraram que a fermentação da cerveja ale ocorreu nas nas três alturas analisadas, a levedura atuou em todo o reator, e nas duas temperaturas utilizadas, a fermentação não ocorreu somente no topo, ao contrario do que está na literatura, já que a *Saccharomyces Cerevisiae* e chamada de uma levedura de fermentação alta. A viabilidade celular e quantidade total de leveduras ficaram semelhantes nas três alturas (topo, meio e próximo ao fundo do reator), e nas duas temperaturas. As análises físico-químicas de °Brix, pH, e teor alcoólico, tiveram resultados próximos tanto em 12°C como em 18°C. O teor alcoólico das duas cervejas ale produzidas ficaram classificadas



como cervejas de baixo teor alcoólico de acordo com a legislação brasileira. A conclusão é que a levedura de fermentação alta atuou por todo o reator durante os dez dias analisados, e a fermentação ocorreu nas três alturas analisadas, conclui-se que a afirmação que uma levedura de fermentação alta atue somente no topo ou na superfície do mosto não está correta.

6. **Declaração de direitos**

O(s)/A(s) autor(s)/autora(s) declara(m) ser detentores dos direitos autorais da presente obra, que o artigo não foi publicado anteriormente e que não está sendo considerado por outra(o) Revista/Journal. Declara(m) que as imagens e textos publicados são de responsabilidade do(s) autor(s), e não possuem direitos autorais reservados a terceiros. Textos e/ou imagens de terceiros são devidamente citados ou devidamente autorizados com concessão de direitos para publicação quando necessário. Declara(m) respeitar os direitos de terceiros e de Instituições públicas e privadas. Declara(m) não cometer plágio ou auto plágio e não ter considerado/gerado conteúdos falsos e que a obra é original e de responsabilidade dos autores.

7. **Referências**

1. BOND, U., NEAL, C., DONNELLY, D., JAMES, T. C.; Aneuploidy and copy number breakpoints in the genome of lager yeasts mapped by microarray hybridisation. *Current Genetics*, 45(6), 360–370 (2004).
2. BOULTON, C; QUAIN, D; *Brewing Yeast Fermentation*, 1st Ed., Blackwell Science, Londres, Inglaterra, 2001.
3. BRASIL, 2019, INSTRUÇÃO NORMATIVA No 64, DE 10 DEZEMBRO DE 2019
4. CANONICO, L.; GALI, E.; CIANI, E.; et al; Exploitation of three non-conventional yeast species in the brewing process. *Microorganisms*, 7, 11. 2019.
5. CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A.; Elementos Biotecnológicos Fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte -As leveduras, *Revista Analytica*, Outubro/Novembro 2006, nº 25, 2006.



6. CECCATO-ANTONINI, S. R.; Microbiologia da fermentação alcoólica: A importância do monitoramento microbiológico em destilarias, Coleção UAB-UFSCAR: Tecnologias das fermentações, EduFscar, São Carlos, 2012.
7. GIBSON, B.; GEETERMAN, J.-M. A.; HITTINGER, C. T.; et al.; New yeasts —new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. FEMS Yeast Research, 17(4). 2017.
8. GIBSON, B. R.; LAURENCE, S. J.; LECLAIRE, J. P. R.; Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling, FEMS Microbiology Reviews, 31(5), 535–569, 2007.
9. KARABIN, M.; JELÍNEK, L.; KOTRBA, P.; CEJNAR, R.; DOSTÁLEK, P.; Enhancing the performance of brewing yeasts. Biotechnology Advances, 36(3), 691–70, 2017.
10. LASANTA, C., DURÁN-GUERRERO, E., DÍAZ, A. B., CASTRO, R. Influence of fermentation temperature and yeast type on the chemical and sensory profile of handcrafted beers. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020.
11. LEI, H.; XU, H.; FENG, L.; YU, Z.; et al.; Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations, Journal of Bioscience and Bioengineering, 122(5), 583–588, 2016.
12. LI, H., LIU, F.; The chemistry of sour taste and the strategy to reduce the sour taste of beer. Food Chemistry, 185, 200–204. 2015.
13. MORADO, R.; Larousse da Cerveja, A História e as Curiosidades de uma das Bebidas mais Populares do Mundo, 1º Ed, Editora Alaúde, São Paulo, 2017.
14. OJO, F. T., Microbiological Quality Control of Beer in Brewing Industry, disponível em: <https://research.arena.webs.com/Term%20paper%20on%20quality%20control%20of%20beer.pdf>



15. SCHNEIDERBANGER, J.; GRAMMER, M.; JACOB, F.; HULTZLER, M.; Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(2), 173–181, 2018.
16. SPITAELS, F., WIEME, A. D., JANSSENS, M., et al; The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer. *PLoS ONE*, 9(4), e95384. 2014.
17. VIANA, A. C.; PIMENTEL, T. C.; VALE, R. B.; et al.; American Pale Ale craft beer: Influences of brewer's yeast strains of the chemical composition and antioxidante capacity, *LWT Food Science and Tecnology*, 152 (2021) 112317, 2021.
18. WHITE, C.; ZAINASHEFF, J.; *Yeast: the practical guide to beer fermentation*. Boulder Brewers Publications, 2010.
19. WILLAERT, R.; Sugar consumption kinetics by brewer's yeast during the primary beer fermentation, *Cerevisia*, v.26, p.43-49, 2001.
20. WANG, W.; LIU, H.; YU, Y.; et al.; Rapid Yeast Cell Viability Analysis by Using a Portable Microscope Based on the Fiber Optic Array and Simple Image Processing, *Sensors*, 20(7), 2092, 2020.
21. AOAC INTERNATIONAL. *Official methods of analysis of AOAC International*. 18th. ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2005.