UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GIOVANI BRANDÃO MAFRA DE CARVALHO

Obtenção de Cerveja usando Banana como Adjunto e Aromatizante

LORENA
2009

GIOVANI BRANDÃO MAFRA DE CARVALHO

Obtenção de Cerveja usando Banana como Adjunto e Aromatizante

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Industrial

Área de Concentração: Conversão de Biomassa

Orientador: Dr. João Batista de Almeida e Silva

LORENA
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo – EEL/USP

Carvalho, Giovani Brandão Mafra de

Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante / Giovani Brandão Mafra de Carvalho; orientador João Batista de Almeida e Silva. -- Lorena: 2009.
163 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Cervejas 2. Fabricação de Cerveja 3. Adjunto de banana 4. Cinética de fermentação 5. Planejamento de experimentos. I. Título.

663.4 - CDU

Aos meus avôs Pedro e Milton, a minha avó Ermelinda e meu sogro Benê. Pelo exemplo deixado por estas pessoas que já não estão entre nós.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Triúno todo-poderoso e todo-inclusivo dispensado em mim para que eu viva em Sua economia.

Ao Professor Dr. João Batista de Almeida e Silva pela brilhante orientação, a amizade, a confiança, e os ensinamentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe, pelas valiosas sugestões e ensinamentos fundamentais para a realização deste trabalho, pelo seu grande potencial como pesquisadora. Muito obrigado.

Ao Professor Catedrático Dr. José António Teixeira pela valiosa supervisão e por me receber tão prontamente em seus laboratórios no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho – Portugal durante meu Doutorado Sandwich.

Ao grande amigo e brilhante co-supervisor no Departamento de Engenharia Biológica – DEB, o pesquisador Dr. Daniel Pereira da Silva por me apresentar os “Mini-Bioreactores Cilindrocónicos Cervejeiros” da Uminho – Portugal.

Aos Pesquisadores Dr. Júlio César dos Santos, Dr. António Vicente (UMinho) e Dr. Giuliano Dragone, que com seus valiosos ensinamentos e conselhos, estimularam em mim o amor à pesquisa.

Aos Professores e Pesquisadores do DEBIQ – EEL – USP e do DEB – UMinho - Portugal, pelos ensinamentos e amizade, em especial, aos Professores Dr. Arnaldo Márcio, Dr. George, Dr. Silvio Silvério, Dra. Inês, Dr. Ismael, Dra. Eleonora, Dr. Walter, Dra. Adriane e Dra. Rosário pela amizade, o carinho, os ensinamentos e as sugestões.

Aos amigos da Microcervejaria – DEBIQ – USP Cleber Mateus (O cervejeiro), Cláudio Donato, Cláudio Xirú, Mário, Ernesto, Larissa, Lulucita, Beatriz, Paulo Pablito, Paula Bucharles, Camila Bento, Fernandinho, Gislaine, Rafael Emo, Danilo Gaúcho e aos amigos dos demais laboratórios do DEBIQ e DEQ – USP - Rita, Solange, André e Adriano (os irmãos Piranguinho), Valdeir, Flávio (Nardone), Bruno Very Crazy, Ricardo, Cláudia, Adriana, Thaís, Aline, Boltrus, Fernando Pernambuco, Vinícius, Serginho, Victor Mion, Tiago Carvalho (Tigas), Michel Brienzo, “Amaurí Junior”, Diana, Martica, Denise Ruzene, Fernando (Budáia), Dani Cortez, Dani Borba, Priscila, Juan, João Paulo, Lívia, Dra. Heizir, e a todos os colegas pela amizade, pelo carinho e ajuda desinteressada nos momentos precisos.

Ao Departamento de Biotecnologia – DEBIQ – EEL da Universidade de São Paulo - USP, pela oportunidade da realização do Doutorado.

Ao Departamento de Engenharia Biológica – DEB – IBB da Universidade do Minho – UMinho – Portugal, pela oportunidade de realização do Doutorado Sandwich.

Aos funcionários da EEL - USP, Lílian, Walkiria, Isnaldi, Ismael, André, José Carlos, Jussara, Nicamor, Paulinho, Lucinha, Djalma, Sandrinha Borges, Cida Jacob e André Prado, que colaboraram com a realização deste trabalho.

À minha amada esposa Priscila e a meu amado filho Pietro pelo carinho, respeito, incentivo, paciência e amor incondicional durante a realização deste trabalho. Muito obrigado.

Aos meus pais Ângela e João, minha avó Terezinha, minha Sogra Líria, meu primo Chiquinho e a todos os tios e familiares que, mesmo de longe, participaram me apoiando e incentivando em todos os momentos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelas bolsas de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado concedidas ao longo dos anos de pesquisa.

A todas aquelas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

CARVALHO, G. B. M. **Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante.** 2009. 163f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009.

Nos últimos anos, duas tendências tem se destacado no universo cervejeiro: a obtenção de cervejas a partir de mostos concentrados e a elaboração de cervejas utilizando adjuntos especiais, os quais podem aromatizar ou não as mesmas. Visando um aumento da produtividade juntamente com uma menor necessidade de investimentos na capacidade produtiva, algumas cervejarias vêm optando pelo aumento do extrato inicial de fermentação para valores superiores aos tradicionais (10-15 °P). A elaboração de cervejas utilizando adjuntos especiais vem se tornando uma solução de barateamento na obtenção de cerveja devido à substituição de parte do malte, acrescentando ainda, atributos sensoriais característicos nos produtos obtidos. A banana constitui-se em matéria-prima bastante favorável à fermentação alcoólica por ser rica em carboidratos, minerais e apresentar baixa acidez. O principal objetivo desta pesquisa foi utilizar a banana como um adjunto do malte e como um aromatizante natural e sutil das cervejas obtidas. A quantificação dos carboidratos presentes na banana prata em diferentes graus de maturação revelou que a condição “muito-madura”, apresentou o mais alto teor de carboidratos totais solúveis (15,65 %) e o mais baixo teor de amido (0,48 %). Após a etapa quantificação dos carboidratos fez-se um estudo da extração aquosa a quente dos sólidos solúveis da banana com a metodologia de superfície de resposta a partir de um planejamento fatorial 2^2 onde se obteve um modelo matemático empírico quadrático ($Y = 5.58 + 1.25 X_1 - 0.26 X_2 - 0.37 X_2^2$). Os valores que otimizaram esta extração (Y) foram 38,5 g de purê de banana (X_1) e tempo de extração de 39,7 minutos. Utilizando um planejamento fatorial 2^2 fez-se um estudo da fermentação do mosto com adjunto de banana, na planta piloto da microcervejaria da EEL – USP em diferentes concentrações e temperaturas. Observou-se que a 12 °P e a 15 °C obteve-se uma Qp de 0,58 g/L.h em 72 h de fermentação e apenas 6,07 % do açúcar metabolizado pela levedura cervejeira foi desviado para a geração de produtos secundários, garantindo um Yp/s real de 0,48 g/g. Dentro destas condições de estudo investigou-se o comportamento cinético da levedura cervejeira *Saccharomyces cerevisiae* 308 de baixa fermentação (tipo *lager*) nestes mostos com banana, de densidade tradicional. Pôde-se observar que o máximo valor de μ_x (0,114 h⁻¹) foi alcançado com a fermentação a 12 °P e 15 °C. O valores máximos de μ_s e μ_p (1,128 e 0,585 g/g.h, respectivamente) foram conseguidos com a fermentação a 15 °P e 15 °C. Em seguida, fez-se um estudo com o propósito de aumentar a produtividade volumétrica de etanol em mostos com banana de alta densidade. Para isto, realizou-se fermentações com a adição de diferentes nutrientes, em mini-bioreatores cilíndricos de 0,9 L da Uminho – Portugal. Verificou-se que apenas a adição de MgSO₄ foi significativa estatisticamente para o aumento da Qp. Observou-se também que o melhor valor de Qp (0,68 g.L/h) foi alcançado em 64 h de fermentação após suplementação com 420 mg/L de MgSO₄. Em seguida, fez-se a caracterização físico-química da cerveja obtida com a reprodução do experimento otimizado em mini-bioreator cilíndrico de 0,9 L da Uminho - Portugal no fermentador de 180 L da EEL – USP, verificando-se que a cerveja com banana de 4,8 % v/v apresentou uma elevada concentração de potássio (600,68 mg/L) e de acetato de isoamila (1,20 mg/L). Das cervejas otimizadas elaboradas na planta piloto da USP, fez-se uma avaliação sensorial comparando-as com cervejas do mercado brasileiro. Observou-se que em relação aos testes de preferência, as cervejas com banana foram estatisticamente preferidas em relação às amostras do mercado. Já os testes de aceitação demonstraram que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) quanto ao grau de aceitação entre os produtos correspondentes às amostras experimentais otimizadas e as amostras do mercado. Ou seja, as amostras de cerveja com banana foram tão aceitas pelo consumidor quanto às amostras de cerveja do mercado. Por fim foi realizado um estudo econômico preliminar, dentro de uma estimativa de produção de 875 L/mês de cerveja com banana em microcervejaria. Verificou-se que o custo inicial do processo foi 204,76 % superior a de uma cerveja comercial. Todavia, o custo direto variável de produção desta cerveja foi de R\$ 0,94/L contra R\$ 1,10/L de uma cerveja puro malte produzida nas mesmas condições de processo.

PALAVRAS-CHAVE: Cervejas. Fabricação de Cerveja. Adjunto de Banana. Cinética de Fermentação. Planejamento de Experimentos.

ABSTRACT

CARVALHO, G. B. M. **Beer obtaining using banana as an adjunct and a flavouring agent.** 2009. 163p. Thesis (Doctoral in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009.

In the past years, two tendencies have been revealed in the universe of brewing: beer production using concentrated wort and its elaboration using special adjunct, which might supply or not a special flavour to the beer. Aiming to increase the process productivity along with decreasing the necessity of further production investments, some breweries have adapted to increase the initial fermentation extract concentration to values superior to the traditional ones (10-15 °P). The elaboration of beer using special adjunct is considered a solution to turn cheap beer production by not only by substituting part of the malt but also in adding characteristic sensorial attributes in the obtained products. Banana is constituted of raw materials suitable for alcoholic fermentation for being rich in carbohydrates and minerals and present low acidity. The principal objective of this research is to utilize the banana as an adjunct for malt and also as a natural and a tenuous flavouring agent for the obtained beer. The quantification of the carbohydrates present in the banana *prata* in different maturation grade, has revealed that the condition of “very mature” represented the highest content in total soluble carbohydrates (15.65%) and the lowest content in starch (0.48%). After the quantification stage of the carbohydrates, a study was done on the hot aqueous extraction of the soluble solids found in the banana using the response-surface method obtained by a complete 2^2 factorial design. The obtained mathematical empirical quadratic model was ($Y = 5.58 + 1.25 X_1 - 0.26 X_2 - 0.37 X_2^2$). The values of the optimized extraction (Y) was 38.5 g of banana pulp (X_1) and an extraction time of 39.7 minutes. It was done a study on the fermentation wort with banana adjunct using a factorial design 2^2 , in the micro-brewery pilot plant located in the EEL - USP, at different concentrations and process temperatures. It was observed that at 12 °P and at 15 °C, it was obtained a Qp of 0.58 g/L.h in 72 h of fermentation and only 6.07 % of the sugar metabolized by the alcoholic-yeast was deviated for the production of secondary products, which guaranteed a real Yp/s of 0.48 g/g. Using these conditions in study, it was investigated the kinetic behavior of the alcoholic-yeast *Saccharomyces cerevisiae* 308 of low fermentation (*lager* type) in these wort using banana, of conventional gravity. It can be observed that the maximum value of μ_x (0.114 h^{-1}) was achieved with fermentation at 12 °P and 15°C. The maximum values of μ_s and μ_p (1.128 e 0.585 g/g.h , respectively) was obtained at fermentation of 15 °P and 15 °C. It was also done studies with the objective of increasing the volumetric productivity of ethanol in worts with banana at high gravity. For this reason, it was done several fermentations with the addition of different nutrients, in mini-bioreactors cylindrical-conical de 0.9 L from UMinho-Portugal. It was verified that the addition of MgSO_4 was statistically significant for the increase in Qp. It was also verified that the best value of Qp (0.68 g.L/h) was achieved in 64 h of fermentation after being supplemented with 420 mg/L of MgSO_4 . It was also done a physical-chemical characterization of the beer obtained from the reproduction of the optimized experiment obtained using the cylindrical-conical bioreactor de 0.9 L from UMinho-Portugal in the bioreactor of 180 L of working volume located in the EEL - USP, verifying that the beer with banana (4.8 % v/v) have presented a high concentrations of potassium (600.68 mg/L) and isomile acetate (1.20 mg/L). It was done a sensorial evaluation of the elaborated beer in the pilot-plant in the USP, comparing it with the other beers found in the Brazilian market. It was observed that in relation to the preference test, beers with banana were statistically preferred in relation to the other samples. Acceptance tests demonstrated that there has been no significant difference ($p \geq 0.05$) in relation to the grade of acceptance between the products corresponding to the samples taken from the optimized experiments and the samples taken from the market. In other words, the samples with banana were acceptable by the consumer as much as the samples taken from common beers found in the market. Finally, it was done a preliminary economical evaluation of the process, considering as production capacity the value of 875 L/month of beer with banana. It was calculated the initial cost of the process was of 204.76% superior than the commercial draft beer. On the other hand, the direct cost of production of this draft beer was of R\$ 0.94/L against R\$ 1.10/L of draft beer made from pure malt using the same process conditions.

KEYWORDS: Beers. Beer Production. Banana Adjunct. Fermentation Kinetics. Experimental Design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Curva de respiração da banana Cavendish à temperatura de 25 °C, na qual pode-se observar três fases:pré-climatérico, climatérico e a senescência (BLEINROTH, 1985).	34
Figura 2.2. Esquema simplificado do processo cervejeiro (modificado de LINKO <i>et al.</i> , 1998).....	42
Figura 2.3. Metabolismo da levedura e produção de moléculas aromaticamente ativas (CRUZ, 2007)....	45
Figura 2.4. Metabolismo da levedura e produção de moléculas aromaticamente ativas (CRUZ, 2007)....	47
Figura 2.5. Biossíntese de ésteres, esteróis e lipídeos (CRUZ, 2007).	48
Figura 2.6. Formação de diacetil a partir de carboidratos por leveduras (modificado de Lewis; Young, 1995 por DRAGONE, 2007).....	49
Figura 4.2. Mosturação do malte moído com suco de banana.	61
Figura 4.3. Reação do iodo: (A) ausência de amido, (B) presença de amido.....	62
Figura 4.4. Torta da casca do malte com material insolúvel da banana.	63
Figura 4.5. Equipamentos da brassagem: Da esquerda para direita tem-se a tina de mosturação, a tina de filtração e a tina de fervura.	63
Figura 4.6. Fermentador / Maturador de 180 L.....	65
Figura 4.7. Sistema com seis fermentadores cilíndricos descontínuos da Uminho - Portugal.	66
Figura 4.8. Ficha utilizada nos testes de preferência com escala hedônica estruturada de 9 pontos.	76
Figura 4.8. Ficha utilizada nos testes de aceitação do tipo comparação pareada.	77
Figura 5.1. Superfície de resposta descrita pelo modelo proposto que representa a HWE.	84
Figura 5.2. Superfície de resposta descrita pelo modelo proposto que representa a (Qp).	90
Figura 5.3. Superfície de resposta descrita pelo modelo proposto que representa o (Yp/s).....	95
Figura 5.4. Comparação entre concentrações de células em suspensão (cel/mL) para diferentes condições de fermentação (A) Ensaio do planejamento fatorial 2 ² (Ensaio: 1 □; 2 ○; 3 ■; 4 ●) (B) Pontos centrais (Ensaio: 5 □; 6 ○; 7 ■; 8 ●).	97
Figura 5.5. Comparação entre concentrações de células em suspensão (g/L) para diferentes condições de fermentação (A) Ensaio do planejamento fatorial 2 ² (Ensaio: 1 □; 2 ○; 3 ■; 4 ●) (B) Pontos centrais (Ensaio: 5 □; 6 ○; 7 ■; 8 ●).	98
Figura 5.6. Comparação do consumo de extrato aparente (g/L) para diferentes condições de fermentação (A) Ensaio do planejamento fatorial 2 ² (Ensaio: 1 □; 2 ○; 3 ■; 4 ●) (B) Pontos centrais (Ensaio: 5 □; 6 ○; 7 ■; 8 ●).	100

Figura 5.7. Comparação do consumo de etanol (g/L) para diferentes condições de fermentação (A) Ensaio do planejamento fatorial 2^2 (Ensaio: 1 □; 2 ○; 3 ■; 4 ●) (B) Pontos centrais (Ensaio: 5 □; 6 ○; 7 ■; 8 ●).	101
Figura 5.8. Otimização da Produtividade Volumétrica em Etanol em função da Adição do Nutriente $MgSO_4$ (■) nas fermentações em mini-bioreatores cilíndricos.	106
Figura 5.9. Consumo de Extrato Aparente (●) e Produção de Etanol (■), pela Levedura <i>S. cerevisiae</i> 308 tipo <i>lager</i> , durante a fermentação do mosto com banana a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.....	108
Figura 5.10. Produtividade Volumétrica (□) e Rendimento em Etanol (■), pela Levedura <i>S. cerevisiae</i> 308 tipo <i>lager</i> , durante a fermentação do mosto com banana a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.....	110
Figura 5.11. Produção de Glicerol (▼), pela Levedura <i>S. cerevisiae</i> 308 tipo <i>lager</i> , durante a fermentação do mosto com banana a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.	111
Figura 5.12. Rendimento em Glicerol (▼), pela Levedura <i>S. cerevisiae</i> 308 tipo <i>lager</i> , durante a fermentação do mosto com banana a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.	112
Figura 5.13. Células Totais em Suspensão (■), da levedura <i>S. cerevisiae</i> 308 tipo <i>lager</i> , e Densidade do mosto com banana (◇) durante a fermentação a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.	113
Figura 5.14. Velocidades Específicas de Crescimento de Células em Suspensão (▲ μ_x), Consumo de Extrato Aparente (○ μ_s) e Produção de Etanol (□ μ_p), na fermentação do mosto com banana a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.....	115
Figura 5.15. Cerveja com banana do tipo <i>lager</i> com teor alcoólico de 4,8 % v/v.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Componentes do lúpulo em flor, seco.....	26
Tabela 2.2. Composição da água dos principais centros cervejeiros (ppm).	28
Tabela 2.3. Especificações correntes para compra de um malte (de cevada de duas fileiras) para cerveja <i>lager</i>	30
Tabela 2.5. Tipos de cachos, do subtipo Cavendish, segundo o estado de desenvolvimento dos frutos na colheita.	33
Tabela 2.6. Os doze compostos voláteis mais significativos encontrados na banana.	36
Tabela 2.7. Classificação dos Microrganismos Contaminantes do Processo Cervejeiro.	40
Tabela 4.1. Valores de granulometria do malte: na indústria (TSCHOPE, 2001) e nos experimentos (DRAGONE, 2002).	60
Tabela 4.2. Temperatura e pH de atuação das enzimas do malte (TSCHOPE, 2001).....	61
Tabela 4.3. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2^2 com quatro ensaios de ponto central e mais quatro ensaios em estrela rotacional.	74
Tabela 4.4. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2^2 com quatro ensaios de ponto central.	74
Tabela 4.5. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2^2 com dois ensaios de ponto central...75	75
Tabela 4.6. Nível de probabilidade e notação utilizada para cada nível de significância nos planejamentos efetuados.	75
Tabela 5.1. Variação nos teores de umidade e de carboidratos solúveis e insolúveis na Banana Prata durante a maturação.....	78
Tabela 5.2. Quantidade de sais minerais contidos na Banana Prata.	80
Tabela 5.3. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2^2 com quatro ensaios de ponto central e mais quatro ensaios em estrela rotacional.	81
Tabela 5.4. Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (HWE) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com quatro ensaios de ponto central e mais quatro ensaios em estrela rotacional.....	82
Tabela 5.5. Análise de variância da regressão do modelo que representa a (HWE).	82
Tabela 5.6. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^2 com mais quatro ensaios de ponto central e quatro ensaios em estrela rotacional para o modelo que representa a (HWE).....	83
Tabela 5.7. Teste de Validade do Modelo Matemático Empírico.....	86

Tabela 5.8. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2^2 com quatro ensaios de ponto central.	88
Tabela 5.9. Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (Qp) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com quatro ensaios de ponto central.	88
Tabela 5.10. Análise de variância com erro total para (Qp) no final de cada ensaio.	89
Tabela 5.11. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^2 com mais quatro ensaios de ponto central para o modelo que representa a (Qp).	89
Tabela 5.12. Análise da curvatura para o modelo que descreve a (Qp) no final de cada ensaio.	91
Tabela 5.13. Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (Yp/s) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com quatro ensaios de ponto central.	92
Tabela 5.14. Análise de variância com erro total para (Yp/s) no final de cada ensaio.	93
Tabela 5.15. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^2 com mais quatro ensaios de ponto central para o modelo que representa o (Yp/s).	94
Tabela 5.16. Análise da curvatura para o modelo que descreve o (Yp/s) no final de cada ensaio.	95
Tabela 5.18. Velocidades específicas máximas de crescimento celular para cada ensaio do planejamento fatorial 2^2 e para os quatro ensaios de ponto central.	99
Tabela 5.19. Velocidades específicas máximas de consumo de extrato aparente para cada ensaio do planejamento fatorial 2^2 e para os quatro ensaios de ponto central.	100
Tabela 5.20. Velocidades específicas máximas de produção de etanol para cada ensaio do planejamento fatorial 2^2 e para os quatro ensaios de ponto central.	102
Tabela 5.21. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2^2 com dois ensaios de ponto central.	103
Tabela 5.22. Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (Qp) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com dois ensaios de ponto central.	103
Tabela 5.23. Estimativa do efeito significativo, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (Qp) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com dois ensaios de ponto central.	104
Tabela 5.24. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^2 com dois ensaios de ponto central.	105
Tabela 5.25. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^2 com dois ensaios de ponto central.	105
Tabela 5.26. Principais variantes e constituintes da cerveja com banana no ensaio otimizado (reproduzido na planta piloto) nos diferentes tempos da fermentação e maturação.	116

Tabela 5.27. Caracterização da Cerveja com Banana após diluição e comparação com cervejas do mercado.	117
Tabela 5.28. Resumo da ANOVA dos resultados do teste de aceitação para as amostras de cerveja do mercado e o Teste 1.	120
Tabela 5.29. Resumo da ANOVA dos resultados do teste de aceitação para as amostras de cerveja do mercado e o Teste 2.	120
Tabela 5.30. Orçamento dos equipamentos utilizados na produção de cerveja com banana.	122
Tabela 5.31. Custo direto variável relacionado à produção de cerveja com banana a partir de mosto de 17,5 °P.....	124
Tabela 5.32. Custo direto fixo: salários, encargos financeiros e depreciação.....	125

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Revisão Bibliográfica	22
2.1. Evolução do Processo Cervejeiro	22
2.2. As Matérias-Primas da Cerveja	24
2.2.1. Lúpulo.....	25
2.2.2. Água.....	27
2.2.3. Malte.....	28
2.2.4. Adjuntos.....	30
2.2.4.1. A Banana: Uma Alternativa Como Adjunto e Aromatizante Natural de Cervejas	32
2.2.5. Leveduras.....	36
2.2.5.1. Microrganismos Contaminantes	38
2.3. O Processo Cervejeiro Tradicional	41
2.3.1. Características Bioquímicas da Fermentação Cervejeira	43
2.3.1.1. Metabolismo dos Açúcares	43
2.3.1.2. A Via Glicolítica da Fermentação Alcoólica.....	44
2.3.1.3. Metabolismo dos Aminoácidos.....	44
2.3.1.4. Produção de Moléculas Aromaticamente Ativas	45
2.3.2. Fatores que Influenciam a Fermentação de Mostos	50
2.3.2.1. Preparação do mosto.....	50
2.3.2.2. Temperatura	51
2.3.2.3. Suplementação Nutricional	52
2.4. Análise Sensorial	53
2.4.1. Testes Sensoriais Afetivos	54
2.5. Viabilidade Econômica.....	54
3. Objetivo Geral.....	56
3.1. Objetivos Específicos	56
4. Materiais e Métodos	57
4.1. Matérias-Primas para a Preparação do Mosto com Banana	57
4.1.1. Água.....	57
4.1.2. Malte de cevada.....	57
4.1.3. Lúpulos.....	57
4.1.4. Adjunto de Banana	57
4.2. Microrganismo	58
4.3. Inóculo.....	59
4.4. Preparo do Mosto com Banana	59
4.4.1. Moagem do Malte	60
4.4.2. Elaboração do Suco de Banana	60
4.4.3. Mosturação.....	61
4.4.4. Filtração.....	62
4.4.5. Fervura	63
4.5. Condições de Fermentação.....	64
4.5.1. Fermentações na EEL – USP	64
4.5.2. Fermentações na UMinho – Portugal	65
4.6. Acompanhamento Analítico dos Experimentos	66
4.6.1. Concentração Celular	67
4.6.2. Concentração de Açúcares e Glicerol	67
4.6.3. Concentração de etanol	68
4.6.4. Concentração de oxigênio dissolvido	68
4.6.5. Determinação do pH	68
4.6.6. Determinação da Densidade do Mosto.....	68
4.6.7. Determinação do Teor de Voláteis no Ensaio Otimizado para o Mosto de Alta Densidade	69
4.6.8. Determinação do Teor de Carboidratos Solúveis e Insolúveis na Banana Prata	69
4.6.9. Determinação de Metais da Cerveja no Ensaio Otimizado e na Polpa da Banana	70

4.6.10. Determinação Preliminar da Extração dos Sólidos Solúveis na Banana.....	70
4.7. Metodologia de Análise dos Resultados	71
4.8. Metodologia Estatística	73
4.9. Metodologia de Análise Sensorial.....	76
4.10. Metodologia do Estudo Preliminar da Viabilidade Econômica do Processo	77
5. Resultados e Discussão	78
5.1. Ensaios Preliminares com a Banana (<i>Musa spp</i>)	78
5.1.1. Quantificação dos Grupos de Carboidratos da Banana	78
5.1.2. Estudo da Extração Aquosa a Quente dos Sólidos Solúveis da Banana (HWE).....	80
5.1.2.1. Análise Estatística e Modelagem Matemática para a Extração dos Sólidos Solúveis na Banana Muito Madura	80
5.1.2.2. Determinação da Condição Ótima para a Extração dos Sólidos Solúveis na Banana (HWE)	85
5.1.2.3. Teste do Modelo Matemático Empírico.....	86
5.2. Estudo da Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp) e Rendimento Real em Etanol (Yp/s), no Final de Cada Ensaio na Planta Piloto.....	87
5.2.1. Análise Tecnológica e Modelagem Matemática Estatística para a Resposta Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp), no Final de Cada Ensaio na Planta Piloto	87
5.2.2. Análise Tecnológica e Modelagem Matemática Estatística para a Resposta Rendimento Real em Etanol (Yp/s), no Final de Cada Ensaio na Planta Piloto	92
5.3. Estudo Cinético de Fermentação em Escala Piloto do Mosto Cervejeiro com Adjunto de Banana	96
5.3.1. Comparação da Concentração de Células em Suspensão entre os Diferentes Ensaio do Planejamento e seus Pontos Centrais	97
5.3.2. Comparação do Consumo de Extrato Aparente entre os Diferentes Ensaio do Planejamento e seus Pontos Centrais.....	99
5.3.3. Comparação da Produção de Etanol entre os Diferentes Ensaio do Planejamento e seus Pontos Centrais.....	101
5.4. Análise Estatística para a resposta Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp) em Mosto de Alta Densidade (17,5 °P) Fermentado após Suplementação Nutricional.....	102
5.4.1. Otimização da Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp) no Mosto Fermentado após Suplementação Nutricional.....	106
5.5.1.1. Análise da Produção de Etanol e do Consumo de Açúcares no Ponto Ótimo	107
5.5. Reprodução do Ponto Otimizado das Fermentações nos Mini-bioreatores de 0,9 L para Bioreator de 180 L na Planta Piloto	115
5.6. Análise Sensorial das Cervejas Otimizadas Produzidas na Planta Piloto.....	118
5.7. Análise Preliminar da Viabilidade Econômica do Processo	121
5.7.1. Base do Estudo Preliminar	121
5.7.2. Custo de Investimento Inicial.....	121
5.7.3. Custo de Produção da Cerveja com Banana	122
6. Conclusões	126
Referências	129

1. Introdução

A produção de cerveja no Brasil em 2008 colocou o país entre os quatro maiores produtores mundiais, sendo superado apenas pela China (35,0), Estados Unidos (23,6) e Alemanha (10,7) bilhões de litros por ano. Em 2004 a AmBev, empresa criada pela fusão entre a Brahma e a Antarctica, anunciou a fusão com a cervejaria belga InterBrew, resultando na InBev (belgo-brasileira), atuando em 32 países tendo como principais marcas Brahma, Stela Artois e Becks. Esta fusão permitiu uma produção anual de 19,2 bilhões de litros de cerveja, deixando a InBev a frente da americana Anheuser-Busch (15,2), da sul-africana SAB Miller (13,5), da holandesa Heineken (10,7) e da dinamarquesa Carlsberg (7,8) bilhões de litros. Recentemente, em novembro de 2008, a cervejaria InBev concluiu a compra da americana Anheuser-Busch, fabricante da Budweiser, em uma operação que totalizou US\$ 52 bilhões criando o maior grupo de cerveja do mundo.

A evolução do consumo de cervejas no Brasil apresentou um significativo aumento nas duas últimas décadas, passando de 5,45 bilhões de litros consumidos em 1990 para 10,34 bilhões de litros consumidos no ano 2007.

Nas últimas décadas, com o aumento do consumo de cerveja no Brasil e no resto do mundo, tem se observado uma significativa evolução dos conhecimentos científicos neste universo, tais como, o profundo entendimento da fisiologia celular, as técnicas de imobilização da levedura cervejeira, a fermentação e maturação em sistemas contínuos e a criação de novas estirpes com a chegada da genética molecular. Tudo isto vem beneficiando o avanço e controle do processo cervejeiro. No Brasil, duas tendências têm se destacado: a obtenção de cervejas a partir de mostos concentrados (*High Gravity Brewing*) e a elaboração de cervejas utilizando adjuntos especiais, os quais podem aromatizar ou não as mesmas. A cerveja com banana acompanha estas duas tendências.

Assim, aliado a necessidade de maiores produtividades com menores custos de investimentos, algumas cervejarias vêm optando pelo aumento do extrato inicial de fermentação, processo que é conhecido como de alta concentração. Nesse processo, a partir da fermentação de um mosto com uma elevada concentração de açúcares, produz-se uma cerveja que posteriormente é diluída com água. Algumas vantagens e desvantagens vem sendo discutidas. As principais vantagens deste processo de

mostos com altas densidades são: uma crescente capacidade de produção de cerveja através de um uso mais eficiente das instalações existentes da planta, redução de custos de energia, custos de mão de obra, limpeza e custos de efluentes, incremento da estabilidade física e das propriedades organolépticas, além de uma maior produção de álcool por unidade de extrato fermentável.

A elaboração de cervejas utilizando adjuntos especiais vem se tornando uma solução de barateamento na obtenção de cerveja devido à substituição de parte do malte, acrescentando ainda, atributos sensoriais característicos nos produtos obtidos. Além disso, atualmente existem no mundo inúmeros tipos de cerveja que se distinguem pelos diferentes ingredientes, métodos de elaboração e características organolépticas, ou seja, que impressionam os sentidos do olfato e do paladar. Deste modo nota-se a necessidade de obtenção de cervejas com novos e variados aromas que atinjam a preferência de diferentes grupos de pessoas. Pesquisas encomendadas por um grande grupo cervejeiro do Brasil para uma enquête de pesquisa de opinião e mercado mostrou que a cerveja aromatizada fabricada por eles teve grande aceitação por parte do consumidor brasileiro. A pesquisa mostrou 84% de aprovação dos jovens entrevistados, sendo que pelo menos 70 % demonstraram-se interessados em comprar o novo produto.

Seguindo com esta tendência, um dos novos adjuntos que pode ser utilizado para a obtenção de cerveja e também como aromatizante suave é a banana. No Brasil, por exemplo, a banana é uma fruta abundante, produzida em toda extensão do país. Esta fruta contém além do amido e açúcares simples como glicose, frutose e sacarose, ésteres tais como o 3-metilbutil acetato (acetato de isoamila), e em menor extensão o butanoato e o 3-metil butanoato em proporções variadas nas diferentes etapas de maturação desta fruta. Estes três ésteres são os mais importantes no flavour da banana quando madura.

O desenvolvimento de experimentos visando à otimização do processo fermentativo cervejeiro através de altas concentrações do extrato inicial e da utilização de novos adjuntos, passa a ser hoje um dos principais caminhos da indústria cervejeira na redução de custos operacionais e conseqüentemente no ganho de competitividade junto ao mercado externo e interno. Os projetos relacionados com o estudo de adjuntos não convencionais e do processo fermentativo para a produção de cerveja a partir de mostos com teores de açúcares mais elevados que os tradicionais têm a finalidade de responder às dificuldades encontradas pelas indústrias nacionais no que se refere ao aumento de produtividade aliada à

manutenção da qualidade e diversificação da cerveja produzida.

Neste sentido, além de contribuir para o desenvolvimento de um processo cervejeiro que seja mais viável economicamente, o presente trabalho de doutorado deu continuidade a linha de pesquisa que o Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL) da Universidade de São Paulo (USP) iniciou em 1997, tendo apoios da FAPESP, CAPES e CNPq, visando o estudo de inovações tecnológicas na produção de cervejas. Este trabalho representa o conjunto de experimentos que foram realizados em escala piloto, nas instalações da microcervejaria da USP de Lorena-SP e em escala de laboratório realizados no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho em Portugal, durante um período de realização do doutorado sanduíche.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Evolução do Processo Cervejeiro

A fabricação de cerveja é uma arte antiga, levada a efeito por povos estabelecidos há aproximadamente 4000 – 5000 a.C. (TORNIC, 1986). A primeira cerveja de que se tem notícia foi fabricada pelos sumérios, um povo que vivia na Mesopotâmia, Oriente Médio. Além dessa civilização, também foram exímios cervejeiros os assírios e babilônios. Os sumérios fabricavam uma massa consistente com grãos moídos que, após o cozimento, era consumida como pão. Esta massa, submetida à ação do tempo, umedecia e fermentava, tornando-se uma espécie de “pão líquido”, ou seja, um tipo de bebida alcoólica. Esta bebida guarda uma semelhança, ainda que distante, com a atual cerveja (TSCHOP, 2001).

No Egito, a cerveja era uma bebida nacional de grande consumo, ocupando um lugar importante nos ritos religiosos, sendo distribuída ao povo. Documentos históricos comprovam que os egípcios já fabricavam alguns tipos de cerveja como a “Cerveja dos Notáveis” e a “Cerveja de Tebas” (TSCHOP, 2001). Por intermédio desta civilização que a cerveja ficou conhecida por outros povos orientais, chegando ao conhecimento da Europa e então ao resto do mundo (SINDICERV, 2000).

Dentre os povos bárbaros que ocuparam a Europa durante o Império Romano, os de origem germânica destacaram-se na arte de fabricar cerveja. Na idade Média, século XIII, os cervejeiros germânicos foram os primeiros a empregar lúpulo na cerveja, conferindo-lhe as características básicas da cerveja atual. No Brasil a cerveja foi trazida pela família real portuguesa, em 1808, durante sua permanência no século XIX, em território brasileiro (VENTURINE FILHO; CEREDA, 2001).

De acordo com Cruz (2007), a elaboração de cerveja, feita durante muitos séculos de um modo empírico, alterou-se decisivamente do século XIX, quando métodos e conceitos científicos foram adotados pelos fabricantes da época. Graças a eles, foi possível começar a obter cerveja com maior duração, mais reprodutível e de qualidade mais consistente. Como resultado destes avanços, as unidades produtoras foram-se tornando cada vez maiores, originando o aparecimento da verdadeira indústria cervejeira. Os grandes avanços verificados se devem aos estudos de L. Pasteur, E. Buchner, E.

Hansen, A. Harden e W. J. Young, estes dois últimos já no início do século XX, que permitiu esclarecer muitos dos problemas que dificultavam o progresso da indústria. Até essa época, a cerveja resultava, quase que exclusivamente, da fermentação realizada à temperatura ambiente, por leveduras de alta fermentação (cerveja *ale*). Na Baviera, porém, produzia-se, desde o século XVI, uma cerveja cuja fermentação era realizada por leveduras que fermentavam bem a baixas temperaturas (8 a 10°C) e que era mantida em caves até a fermentação principal terminar (cerveja *lager*). O resfriamento necessário era obtido com blocos de gelo, fáceis de obter nas montanhas, no inverno, mas de difícil conservação no verão. No século XIX este tipo de processo vulgarizou-se, pois a cerveja *lager* obtida conservava-se melhor que a cerveja *ale*.

Nas últimas décadas, a maltagem e a indústria de fabricação de cerveja colocou em prática uma gama de novas invenções técnicas, bioquímicas, microbiológicas e genéticas (LINKO, 1998). Além do mais, há um grande interesse das indústrias cervejeiras em acompanhar as novas inclinações do processo como a utilização de adjuntos não convencionas e a fermentação de mostos de alta densidade, como também ganhar o mercado com diversificações, criando cervejas aromatizadas (CARVALHO *et al.*, 2009). Segundo Almeida e Silva (2008), tradicionalmente as cervejas usam como adjunto de malte de cevada outros cereais, como o milho, arroz e o trigo. Algumas pesquisas inovando no uso de novos adjuntos como batata e mandioca foram realizadas. As cervejarias brasileiras já tem introduzido novidades produzindo algumas bebidas com aroma de limão, morango, cereja, abacaxi, kiwi, maçã, chocolate e até mesmo rosa. Porém, estes produtos são adicionados apenas para conferir aroma bebida.

Diferentes cervejas com aroma sintético de banana já existem em diversos países, como, por exemplo, a Cerveja Tesco Banana da Inglaterra. Aqui no Brasil uma cerveja que também utiliza aroma sintético de banana é servida em um ponto gastronômico na zona sul do Rio de Janeiro. Podem ainda ser encontradas outras bebidas fermentadas com banana que não se enquadrariam em nossa legislação como cerveja, mas que acabam recebendo o nome de “cerveja de banana” em seus países de origem (CARVALHO *et al.*, 2009).

Na África, é possível encontrar uma bebida fermentada com banana que é bastante tradicional em Kivu, no Zaire do Leste, sobretudo Ruanda e mesmo Uganda. Para elaboração deste produto, a maturação da banana é feita enterrando-a no chão fornecendo, deste modo, resultados muito irregulares.

Normalmente leva cerca de oito dias e os frutos maduros fermentam mais rapidamente que os de maturação avançada. Em seguida é preparado o mosto com a polpa dos frutos em cochos de madeira. Os operários com as mãos munidas de ervas secas, amassam as bananas descascadas para a extração do suco. A celulose e os traços de amido não hidrolisados depositam no fundo do cocho. Uma quantidade de água é adicionada em função do grau alcoólico que se deseja obter, servindo também para lavar os tufos de ervas utilizadas. O suco assim obtido é colocado através de um funil em um pote de barro “igitariro” com o pé de cuba elaborado com um pouco de sorgo torrado contendo as leveduras selvagens além de outros microrganismos. Este pote é enterrado e a fermentação realizada por dois dias, em uma temperatura em torno de 27 a 28°C. O produto filtrado é depositado em local fresco para completar o processo. Assim, a bebida depois de maturada por mais dois dias está pronta para o consumo (MORETTI *et al.*, 1985). Na Universidade Eduardo Mondlane, em Moçambique, é elaborada uma bebida similar utilizando-se malte de cevada entre os ingredientes. Enquanto que na Tailândia é possível encontrar uma cerveja baseada em fermentado de arroz denomina de “Oo”, na qual às vezes se utiliza a banana como aromatizante (CARVALHO *et al.*, 2009).

De acordo com Almeida e Silva (2008), a cerveja com banana pode ser uma alternativa na utilização no processo cervejeiro nos próximos anos. Isto proporcionará a indústria cervejeira a obtenção de um novo produto e aos agricultores desta matéria-prima, benefícios que poderão colaborar para tornar seu produto mais competitivo. Isto pode agregar valores também a outros produtos que também são sub-comercializados, como é o caso do arroz preto quebrado, dos grãos de pupunha, mel com grau de pureza inferior a 85% e do pinhão.

2.2. As Matérias-Primas da Cerveja

A cerveja é uma solução aquosa complexa, contendo CO₂, etanol, diversos sais inorgânicos e cerca de 800 compostos orgânicos, preparada a partir de malte, água potável, lúpulo, leveduras e, podendo ainda, serem utilizadas outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas como adjunto do malte (CARVALHO; BENTO; ALMEIDA e SILVA, 2007).

2.2.1. Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta trepadeira têxtil típica de regiões frias dos EUA, Alemanha, República Tcheca, Polônia, Austrália, Nova Zelândia, Japão, China, Chile, Argentina e outros, mais precisamente entre os paralelos de latitude 35 e 55⁰ (TSCHOP, 2001). Pertence a família *Cannabinaceae*, mas, apesar do parentesco com a *Cannabis*, não contém substâncias alucinógenas. O lúpulo é uma planta dióica, isto é, apresenta flores masculinas e femininas em indivíduos diferentes, não havendo, portanto, planta hermafrodita (VENTURINE FILHO; CEREDA, 2001). Seu cultivo requer muitos cuidados, pois, sendo rica em umidade (cerca de 80 %), é suscetível ao ataque de parasitas, entre os quais muitos insetos como traças e piolhos, e outros como fungos e protozoários (TSCHOP, 2001). Além disso, só têm interesse cervejeiro as plantas femininas não fecundadas. Por serem perenes, essas plantas são propagadas vegetativamente (SEIDL, 2003).

As flores femininas ou frutos delas decorrentes são ricas em glândulas amarelas contendo lupulina (resinas, óleos essenciais, etc.), responsável pelo aroma e amargor característicos de lúpulo das cervejas. O lúpulo além de aroma e amargor apresenta ação anticéptica, pois os ácidos isoalfa são bacteriostáticos; contribui também para a estabilidade do sabor e da espuma da cerveja (VENTURINE FILHO; CEREDA, 2001). O lúpulo contém centenas de componentes, sendo os mais importantes mostrados na Tabela 2.1 (CRUZ, 2007).

Considerando que os lipídeos, as proteínas e a celulose do lúpulo são insolúveis, bem como os açúcares e os aminoácidos que se encontram em pequena proporção embora solúveis; considerando-se ainda, a pequena dosagem de lúpulos (cerca de 150 a 450 g/hL), tais substâncias não contribuem praticamente em nada, para o processo cervejeiro. De importância, portanto, são os óleos essenciais, as resinas amargas, os polifenóis e as substâncias minerais (TSCHOP, 2001).

As partes mais importantes da lupulina são as resinas e óleos essenciais. Os óleos essenciais do lúpulo concedem ao mosto e a cerveja o aroma típico do lúpulo. Apesar de ser volátil (96 – 98 % se perdem por volatilização durante a fervura do mosto) a pequena fração restante, mesmo em concentração muito baixa, sofrerá uma providencial oxidação e dará o caráter aromático do lúpulo a cerveja. Os óleos essenciais do lúpulo se dividem em duas classes: os sesquiterpenos, de influencia

positiva no aroma da cerveja (humuleno, β -cariofileno, farneseno, pós-humulono-1 e pós-humuleno-2) e os monoterpenos, de influência negativa para o aroma (mirceno, linalol e pirenos α e β) (TSCHOP, 2001).

Tabela 2.1. Componentes do lúpulo em flor, seco.

Composto	Quantidade (g/100 g)
Ácidos α	2 – 17
Ácidos β	2 – 10
Óleos essenciais	0,5 – 3
Polifenóis e taninos	3 – 6
Monossacarídeos	2
Aminoácidos	0,1
Proteínas	15
Lipídeos e ácidos graxos	1- 5
Pectinas	2
Cinzas	10
Celulose-lenhinas	40 – 50
Água	8 – 12

CRUZ, 2007

As resinas são constituídas principalmente de ácidos α e β . Os primeiros também chamados de humulonas são a fonte principal de amargor na cerveja; enquanto que os segundos denominados lupulonas, são menos importantes. Durante a fervura do lúpulo no mosto, as moléculas de ácidos α são isomerizadas para a forma de ácidos iso- α . Esses compostos, também conhecidos como iso-humulonas, são muito amargos e muito mais solúveis do que os ácidos α (BENITEZ *et al.*, 1997). Devido à instabilidade dos componentes da planta de lúpulo, facilmente oxidáveis, a sua qualidade vai diminuindo se não houver demasiado cuidado na recolha, tratamento subsequente e armazenagem. Para evitar estes contratempos acabaram surgindo naturalmente, formas de emprego bastante estáveis e algumas passíveis de armazenamento à temperatura ambiente. As mais populares são os extratos que podem ser obtidos por extração pelo CO₂ supercrítico e pelo etanol, e as peletes que são obtidas por prévio enriquecimento das inflorescências em lupulina mediante eliminação de pedúnculos e algumas brácteas, moagem em moinhos refrigerados e peletização (CRUZ, 2007).

2.2.2. Água

A água é um dos principais fatores a ser levado em consideração na fabricação de cervejas, pois é o meio indispensável a todas as reações químicas e bioquímicas formadoras da cerveja. É a principal matéria prima em termos de quantidade, visto que 92 a 95% do peso da cerveja é constituído de água (ALMEIDA e SILVA, 2005).

A água usada na indústria cervejeira, de captações municipais ou próprias é aquela adequada a alimentação humana, sendo sua composição química adaptada, nas fábricas, às diversas exigências da brassagem (com pH na faixa onde as enzimas do malte atuam para a transformação do amido em açúcares fermentáveis; promover a extração das moléculas amargas e aromáticas do lúpulo, bem como uma boa coagulação do material mucilaginoso conhecido como *trub*, durante a fervura), filtrações, fermentação (permitir uma fermentação asséptica) e acondicionamento (desenvolver cor e *flavour* característicos do tipo de cerveja a ser fabricada). Dessa forma, a água usada na cervejaria deve ser insípida e inodora para não interferir nas propriedades organolépticas da cerveja acabada (CRUZ, 2007). Os grandes centros cervejeiros da Europa desenvolveram-se onde a água disponível era apropriada para a produção de tipos específicos de cerveja. A Tabela 2.2 mostra a composição mineral da água dos principais centros cervejeiros do mundo (HOUGH, 1985).

Atualmente, a tecnologia de tratamento de águas evoluiu de tal forma que, teoricamente, é possível adequar a composição de qualquer água às características desejadas devido a técnicas como a desionização e osmose reversa. É dito teoricamente, porque o custo de alterar a composição salina da água normalmente é muito alto, motivo pelo qual as cervejarias ainda hoje consideram a qualidade da água disponível como fator determinante da localização de suas fábricas. No Brasil, a maioria das regiões dispõe de águas suaves e adequadas à produção das cervejas *lager*, denominação genérica do tipo de cerveja clara e suave que é produzida no País (CARVALHO *et al.*, 2009).

Tabela 2.2. Composição da água dos principais centros cervejeiros (ppm).

Local / Sais	Na ⁺	Mg ⁺²	Ca ⁺²	Cl ⁻	(SO ₄) ²⁻	(HCO ₃) ⁻
Burton-on-Trent	54	24	352	16	820	320
Pilsen	32	8	7	5	6	37
Munique	10	19	80	1	6	333
Londres	24	4	90	18	58	123
Dublin	12	4	119	19	54	319
Dortmund	69	23	260	106	283	549

HOUGH, 1985

2.2.3. Malte

O malte utilizado em cervejaria é obtido usualmente a partir de cevadas de variedades selecionadas especificamente para esta finalidade. A cevada é uma gramínea do gênero *Hordeum*, parente próxima do trigo, e sua cultura é efetuada em climas temperados. No Brasil é produzida em algumas partes do Rio Grande do Sul durante o inverno, e na América do Sul a Argentina é a grande produtora (CARVALHO *et al.*, 2009).

Na cevada os grãos na espiga podem estar alinhados em duas ou seis fileiras. Essa diferença não é apenas morfológica. A cevada de seis fileiras, quando comparada com a de duas, apresenta menor teor de amido, maior riqueza protéica ou especificamente, enzimática. Seus grãos são menos uniformes e possuem mais cascas. Assim sendo, a cevada de seis fileiras deve apresentar alguma dificuldade na produção do malte e na moagem dos grãos na cervejaria, menor rendimento na mosturação, mas, por outro lado, facilita a filtração do mosto e aceita maior proporção de adjunto na formulação da cerveja. Os Estados Unidos usam preferencialmente o malte de cevada de seis fileiras, tanto em cervejaria como nas destilarias de uísque, por exemplo, enquanto que a de duas filas é utilizada na produção de cerveja européia. No Brasil, a cevada cervejeira produzida nos estados do sul apresenta duas filas (VENTURINE FILHO; CEREDA, 2001).

Segundo Cruz (2007), quando o grão de cevada é submetido a um processo de germinação controlada para desenvolver enzimas e modificar o amido, tornando-o mais macio e solúvel, ele é chamado de malte. A Tabela 2.3 demonstra as especificações para a compra de um malte para cerveja *lager*. Utiliza-se neste processo, estritamente, as forças da natureza, que prove as sementes da

capacidade de germinar para desenvolver uma nova planta. Tudo o que o homem faz neste processo é controlar as condições de temperatura, umidade e aeração do grão, num processo chamado de maltagem. O processo de maltagem é constituído por três etapas: maceração, germinação e secagem.

a) Maceração: A maceração prepara o grão para a etapa fundamental de germinação. O grão, inicialmente com valores de umidade na ordem de 12 – 14 %, é posto em contato com água, durante cerca de dois dias em grandes tanques de fundo cônico, aumentando seu teor até cerca de 42 %. Durante a maceração, ar é introduzido e oxigênio é consumido, enquanto que gás carbônico é formado.

b) Germinação: A germinação é um processo biológico que torna as paredes celulares do grão bem quebradiças e facilita a extração do amido. Na sua estrutura existem duas grandes zonas: o embrião e a endosperma. O embrião, fonte da vida, vai ser sede de ordens hormonais que desencadeiam as reações que levam à degradação enzimática parcial do amido armazenado no endosperma, originando açúcares. Estes vão ser a fonte indispensável de energia para o crescimento da pequena raiz (radícula) e do pequeno caule (caulículo) em formação. Durante a germinação são sintetizadas as enzimas hidrolíticas, necessárias à hidrólise parcial dos componentes da cevada (amido, proteínas, paredes celulares), que dão origem aos nutrientes requeridos pela levedura. É também na germinação que as proteínas de reserva do grão são hidrolisadas e utilizadas para sintetizar proteínas para o desenvolvimento do embrião. Os aminoácidos do mosto vão ser também formados parcialmente nesta fase embora a maior quantidade venha se originar na mosturação.

Em relação às enzimas, sabe-se que o grão de cevada possui apenas β -amilase, enzima sacarificante que ataca dextrinas e amido solúvel nas extremidades das cadeias não redutoras, hidrolisa as penúltimas ligações α -1,4 e origina principalmente o dissacarídeo maltose. Na germinação forma-se α -amilase, enzima com capacidade de liquefazer o amido por ataque das ligações α -1,4 glicosídicas, ao acaso. Mas, forma-se ainda outra enzima, também importante para a mosturação, a dextrinase-limite que é capaz de hidrolisar as ligações α -1,6 glicosídicas, ajudando na degradação do amido. A mobilização das proteínas de reserva do endosperma é feita na germinação graças à atividade de proteinases e peptidases. As proteinases são sintetizadas na camada de aleurona (que envolve o endosperma) e excretadas para o endosperma, onde estão as proteínas de reserva. A β -glucanase atua também nesta fase, degradando as β -glucanas da cevada, que vão conferir viscosidade ao mosto futuro.

c) Secagem: Quando o tamanho do caulículo atinge um comprimento que se situa em cerca de 75 % do grão, a germinação e a desagregação são paradas por secagem controlada, conseguida por uma corrente de ar quente. Segue-se uma fase de aquecimento, até, pelo menos 80 °C (em estufa), que vai dar a coloração do malte e o seu gosto peculiar, apropriado a cada tipo de cerveja. A atividade enzimática cessa totalmente embora continue presente quando a umidade do grão baixa para menos de 5 % (CRUZ, 2007).

Tabela 2.3. Especificações correntes para compra de um malte (de cevada de duas fileiras) para cerveja *lager*.

Parâmetro	Especificações
Umidade (%)	4,5 – 5
Extrato, fina moagem (% m.s.)	≥ 80
Tempo de sacarificação (min)	≤ 15
Nitrogênio solúvel (N x 6,25 %)	3,8 – 4,5
pH do mosto convencional	5,8
Poder diastático (unid. W K)	≥ 230
Coloração (unid. EBC)	2,8 – 4
Desagregação (% calcoflúor)	85 – 92
Homogeneidade (% calcoflúor)	> 70
β-glucanas no mosto (mg/L)	100 – 200
Viscosidade do Mosto (mPa, 20 °C)	≤ 1,6
Resíduos < 2,2 mm (%)	≤ 0,5

CRUZ, 2007

2.2.4. Adjuntos

Os adjuntos na produção de cerveja podem ser definidos como qualquer fonte de carboidrato diferente do malte de cevada que contribui com açúcares para o mosto (STEWART, 1994), inclusive o amido e os açúcares fermentáveis da banana (CARVALHO *et al.*, 2008 a e b). O uso de adjuntos para suplementar o mosto constitui uma prática de redução de custos empregada em várias cervejarias e microcervejarias (YOUNIS; STEWART, 1999). A adição de adjuntos com altas concentrações de açúcares fermentáveis tem sido um método alternativo para aumentar a concentração de sólidos solúveis nos mostos. Tais adjuntos podem ser "homólogos" ou seja, derivados da mesma fonte que a fonte base ou "heterólogos" que são derivados de uma ou mais fontes diferentes (THOMAS *et al.*, 1996).

De acordo com a sua composição química, os adjuntos podem ser classificados em amiláceos e açucarados. Tradicionalmente, o milho na forma de *grits* e arroz como quirera têm sido os mais utilizados pelas cervejarias em todo mundo, incluindo as do Brasil. Dentre os adjuntos açucarados sobressaem os xaropes de cereais, sendo o de milho o principal deles, o açúcar comum e o invertido (xarope de glicose e frutose) provenientes da cana-de-açúcar ou beterraba sacarina (VENTURINE FILHO; CEREDA, 2001).

Quanto menor o nível de lúpulo e quanto maior o nível de adjuntos utilizado no processo com altas densidades de mosto, mais adequado é o produto formado sem que haja mudanças significativas de sabor. As cervejas produzidas com 100% de malte podem causar cargas excessivas nas tinas de mosturação e filtração. Um aumento na altura da camada filtrante, ou um aumento da viscosidade do mosto pode aumentar os tempos das corridas, até um ponto onde os benefícios do processo em relação à produtividade e a qualidade são perdidos (MURRAY *et al.*, 1991).

O nível de substituição do malte pelo adjunto pode chegar até 50% e cada cervejaria define a proporção malte / adjunto para cada tipo de cerveja que produz. O abuso na quantidade de adjunto pode resultar em mostos nutricionalmente pobres para a fermentação alcoólica e de elevada viscosidade, tornando a sua filtração lenta. Além disso, os mostos obtidos somente com o malte, usualmente apresentam excesso de componentes nitrogenados, mas à medida que se aumenta a percentagem de adjunto, ocorrem problemas relacionados com falta de nitrogênio no meio (Kirsop, 1982 citado por CASEY *et al.*, 1984).

Utilizam-se os adjuntos especialmente por questões econômicas, pois, apresentam menor custo na produção de extrato. Além disso, melhoram a qualidade sensorial e físico-química da cerveja acabada. Podem ser considerados como diluidores de todos os componentes do mosto cervejeiro, exceto os açúcares. De fato, reduzem o teor de nitrogênio solúvel, ou melhor, proteína solúvel do mosto, diminuindo a ocorrência de infecção láctea na cerveja, melhorando a sua estabilidade coloidal e, conseqüentemente, aumentando a vida de prateleira do produto. As cervejas que utilizam adjunto em sua composição são mais refrescantes e leves, apresentam normalmente maior brilho, cor mais clara e saciam menos. Há perspectivas de que fatores econômicos levem a um aumento na utilização de adjuntos pelas cervejarias em todo o mundo (VENTURINE FILHO; CEREDA, 2001).

2.2.4.1. A Banana: Uma Alternativa Como Adjunto e Aromatizante Natural de Cervejas

A banana (*Musa spp.*), da família das Musáceas, é originária do Continente Asiático e, atualmente, vem sendo explorada na maioria dos países tropicais. No Brasil, seu cultivo se verifica em todos os Estados, desde a faixa litorânea até os planaltos do interior (DANTAS *et al.*, 1997). Um dos maiores produtores mundiais, o Brasil tem suas exportações restringidas por fatores como alto consumo interno e desqualificação das frutas para o mercado internacional (FAVARO, 2003). O Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, divulgado pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) ao fim de 2007, indicou que a produção brasileira de banana em 2007, totalizou 6,9 milhões de toneladas, sendo 2,3 % menor que a safra anterior. A área colhida foi de 507,4 mil hectares, sendo 0,7% maior que a de 2006, enquanto a produtividade média passou de 14.061 kg/ha para 13.647 kg /ha. O baixo desempenho dos bananais, em termos de produtividade, foi reflexo do momento desfavorável que a atividade vem enfrentando nos últimos anos, pois apesar do aumento da área plantada, a produção foi menor em 2007. A Tabela 2.4 faz um comparativo das safras de 2006 e 2007 no Brasil e nos dez principais estados produtores (Epagri; Cepa, 2007 citados por CARVALHO *et al.*, 2009).

Tabela 2.4. Banana – Comparativo das safras de 2006 e 2007 nos dez principais estados produtores do Brasil.

Anos Estados	2006			2007		
	Área (ha)	Produção (t)	Rendimento (kg/ha)	Área (ha)	Produção (t)	Rendimento (kg/ha)
Bahia	83.496	1.191.907	14.912	84.548	1.258.036	14.880
São Paulo	53.346	1.175.768	22.040	50.280	1.084.841	21.576
Santa Catarina	31.140	596.636	19.452	30.971	618.895	20.296
Pará	43.180	551.786	12.818	44.223	567.811	12.878
Minas	44.806	554.039	14.730	38.561	541.399	14.775
Ceará	43.441	408.026	9.552	43.930	387.962	9.041
Paraíba	17.197	374.638	21.785	17.757	250.371	14.689
Pernambuco	41.105	388.830	10.228	39.822	368.955	10.065
Amazonas	23.759	262.154	11.612	24.614	265.499	11.282
Rio G. do Norte	6.591	202.994	30.798	6.981	190.892	27.896

Epagri; Cepa, 2007 citados por CARVALHO *et al.*, 2009.

Nos estados de Minas Gerais e São Paulo a comercialização da variedade Prata é geralmente responsável pelo maior volume de vendas, com percentual em torno de 57 %, seguida da nanica com 37 %, da maçã com 4 % e outras com 2 % (CARVALHO *et al.*, 2009).

Apesar do grande número de variedades existentes no Brasil, são poucas as que apresentam potencial agrônomo para exploração comercial: alta produtividade, tolerância a pragas e doenças, resistência ao frio e à seca (CERQUEIRA DE JESUS *et al.*, 2004).

No ponto de colheita, países exportadores de banana, localizados na América Tropical, adotam um sistema que leva em conta o número de dias do lançamento da inflorescência até o desenvolvimento fisiológico dos frutos. Este sistema correlaciona o grau de maturação com a idade do cacho. A fruta deve chegar ao grau (diâmetro) dentro de certo limite de tempo, evitando-se perdas por maturação e colheita prematura dos cachos. Este sistema é adequado para países onde existe uma boa uniformidade climática durante todo ano. Desta forma, em bananais dos trópicos colhem-se os cachos entre 80 e 95 dias após o lançamento da inflorescência, segundo o destino da produção. Visando à determinação do ponto da colheita, muitos índices e critérios de colheita são estudados e/ou usados. Por exemplo, a Tabela 2.5, mostra uma correlação entre o tipo de calibração, angulosidade do fruto e rendimento de polpa (LICHTENBERG, 1999).

Tabela 2.5. Tipos de cachos, do subtipo Cavendish, segundo o estado de desenvolvimento dos frutos na colheita.

Tipo de cacho	Estádio de desenvolvimento do Fruto	Diâmetro do Fruto (mm)	Aspectos das Quinas	Superfície das Faces do Fruto	Rendimento de Polpa
0	Magro	30	salientes	estreita e plana	50%
I	$\frac{3}{4}$ magro	32	salientes	estreita e plana	50-60%
II	$\frac{3}{4}$ natural	34	marcadas	larga e pouco arredondada	60-70%
III	$\frac{3}{4}$ gordo	36	discretas	larga e arredondada	70%
IV	Gordo	38	ausentes	larga e redonda	70%

LICHTENBERG, 1999

Segundo Viviane; Leal (2007), o manuseio inadequado na pós-colheita tem sido responsável pela desvalorização da banana no mercado interno e pela perda de oportunidade de exportação. Por esta razão, a pesquisa direcionada para a aplicação do suco de banana como adjunto em processos

cervejeiros tem interesse científico e é de grande potencial para os países tropicais produtores de banana (CARVALHO *et al.*, 2008a).

Na pós-colheita, na etapa da maturação, observa-se que a banana caracteriza-se fisiologicamente por apresentar uma respiração muito ativa, considerada do tipo climatérico. Mantida à temperatura ambiente amadurece rapidamente, causando a decomposição dos tecidos e dos componentes da célula, quando então já se encontra na fase de senescência conforme a Figura 2.1 (BLEINROTH, 1985).

Figura 2.1. Curva de respiração da banana Cavendish à temperatura de 25 °C, na qual pode-se observar três fases:pré-climatérico, climatérico e a senescência (BLEINROTH, 1985).

A banana é um componente constante na dieta do brasileiro, inclusive os de baixa renda, devido às suas características sensoriais e ao seu alto valor nutritivo. Apenas um fruto de banana pode suprir cerca de 25% da ingestão diária recomendada de ácido ascórbico, além de fornecer quantidades significativas de vitaminas A e B, potássio e outros minerais, como o sódio (DANTAS; SOARES FILHO, 1995). As principais vitaminas encontradas em cada 100 gramas de purê de banana prata são: Vitamina A ou Retinol (81 IU); Vitamina B1 ou Tiamina (0,04 mg); Vitamina B2 ou Riboflavina (0,1 mg); Vitamina B3 ou Niacina (0,54 mg); Vitamina B5 ou Ácido pantotênico (0,26 mg); Vitamina B6 ou Piridoxina (0,57 µg); Vitamina B9 ou Ácido fólico (19,1 IU); Vitamina C ou Ácido ascórbico (9,1 mg) e Vitamina E ou Tocoferol (0,27 mg_ATE). Em relação aos minerais, os principais compostos são: Cálcio (6 mg); Ferro (0,31 mg);

Magnésio (29 mg); Fósforo (20 mg); Potássio (396 mg); Sódio (1 mg); Zinco (0,16 mg); Cobre (0,1 mg); Manganês (0,15 mg) e Selênio (1,1 mcg). O teor de proteínas se encontra em torno de 1,03 g sendo que os aminoácidos construtores identificados são a Alanina, Arginina, Aspartato, Cistina, Glutamato, Glicina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lísina, Metionina, Fenilalanina, Prolina, Serina, Treonina, Triptofano, Tirosina e Valina (VIVIANI, 2006).

As transformações da banana ocorrem durante todo o processo de maturação, afetando constituintes como ácidos, amido, açúcares, umidade, entre outros. Na fruta madura, o pH varia de 4,4 a 4,6, a acidez de 0,22 a 0,57% de ácido málico, o teor de amido de 0,9 até 7%, enquanto os sólidos solúveis totais podem atingir teores até de 28% (CERQUEIRA DE JESUS *et al.*, 2004).

Diversos autores têm estudado o desempenho de frutas tais como laranja (CANCALON; PARISH, 1995; CORAZZA *et al.*, 2001), uva (POLYCHRONIADOU *et al.*, 2003), maçã (BARBOSA *et al.*, 2007; le QUÉRE *et al.*, 2006; POLYCHRONIADOU *et al.*, 2003), banana (ARRUDA *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2008a), entre outras, na fermentação alcoólica. A banana, uma fruta de baixo custo, se constitui em matéria prima bastante favorável para a obtenção de bebidas por fermentação alcoólica por ser rica em carboidratos, minerais e apresentar baixa acidez (CARVALHO *et al.*, 2008a).

Inúmeros são os componentes voláteis encontrados na banana, tendo sido identificados mais de 350 compostos presentes no aroma da banana (BERGER, 1991). Dentre os numerosos compostos encontrados na literatura, doze deles apresentam maior significância na composição do aroma da banana sendo eles dois alcoóis, nove ésteres e um fenol (Tabela 2.6). O acetato de isoamila (3-metilbutil acetato) é o principal constituinte do aroma caracterizando o marcante flavor da banana madura (BOUDHRIQUA *et al.*, 2003). Este éster e em menor extensão o butanoato e o 3-metil butanoato são responsáveis por mais de 50% do flavour da banana madura (BERGER, 1991). O acetato de isoamila possui as seguintes características: Ponto de ebulição = 142,0 °C, Ponto de fusão = - 78,5 °C, Solubilidade em água (25 °C) = cerca de 2 %, Ponto azeotrópico com água: 93,6 °C (63,7 % em peso) (Morita; Assumpção, 2003 citados por CARVALHO *et al.*, 2009).

Tabela 2.6. Os doze compostos voláteis mais significativos encontrados na banana.

Compostos voláteis	Tempo de retenção (min)	Fração dos componentes na banana madura (%)
Álcool isoamílico	4,7±0,3	3,37±0,004
Acetato de butila	5,5±0,1	0,68±0,01
Acetato de isoamila	7,3±0,1	5,32±0,02
NI1*	9,3±0,1	0,08±0,0003
NI2*	22,2±0,2	0,1±0,0001
NI3*	26,5±0,1	0,31±0,001
Elemicina	31±0,2	0,050±0,0004
Isopropanol (2-propanol)	0,9±0,2	-
Acetato de etila	1,5±0,1	-
Butirato de butila	11,7±0,1	-
Isobutirato de isoamila	12,1±0,1	-
Butirato de isoamila	13,9±0,1	-
Butirato de 2 metil isoamila	15,7±0,1	-
Valerato de isoamila	15,9±0,1	-
Caproato de isoamila	21,3±0,1	-

*Compostos voláteis não identificados.

BOUDHRIQUA *et al.*, 2003

2.2.5. Leveduras

As leveduras, como os bolores, são fungos, mas deles se diferenciam por se apresentarem, usual e predominantemente, sob forma unicelular. Sua reprodução vegetativa se faz, geralmente, por gemulação ou brotamento. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente que os bolores. Também são mais eficientes, numa base ponderal, na realização de alterações químicas por causa de sua maior relação área/volume. As leveduras também se diferem das algas, pois não efetuam a fotossíntese, e igualmente não são protozoários porque possuem uma parede celular rígida. São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude de suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas. As leveduras não são uma entidade taxionômica natural, embora exibam uniformidade morfológica. Na verdade, devido à escassez de critérios morfológicos, as espécies de leveduras são diferenciadas menos de acordo com elementos da morfologia e mais de conformidade com características fisiológicas. Algumas não formam esporos e são consideradas como “Fungos Imperfeitos”. Outras produzem esporos sexuais e, assim, apresentam clara relação com os ascomicetos ou com os basidiomicetos (PELCSAR, 1980).

O desempenho das leveduras cervejeiras na fermentação, sendo descrita como a habilidade das leveduras em “metabolizar eficientemente os constituintes do mosto em etanol e em outros produtos da fermentação, produzindo uma cerveja com qualidade e estabilidade satisfatórias” (RUSSELL; STEWART, 1995), é influenciada e controlada por vários fatores:

- Características Genéticas: a escolha da cepa de levedura empregada.
- Fisiologia Celular: a tolerância ao estresse pelas células de levedura, a viabilidade e a vitalidade das células e a concentração celular do inóculo.
- Disponibilidade Nutricional: a concentração e a natureza do nitrogênio assimilável, a variedade e a concentração de açúcares no mosto e a disponibilidade de íons metálicos.
- Condições Físicas: temperatura, pH, oxigênio dissolvido e a densidade do mosto.

Nos últimos anos, taxonomistas de leveduras têm designado que todas as cepas empregadas na produção de cerveja como pertencentes à espécie *S. cerevisiae* (STEWART, 2000). Isto porque embora a literatura científica progressivamente se refira às leveduras como *S. cerevisiae* tipo *ale* e *S. cerevisiae* tipo *lager*, existem algumas diferenças bioquímicas entre esses dois tipos de cepas de leveduras, que justificam manter uma diferenciação entre elas. As cepas de *S. uvarum* (carlsbergensis) tipo *lager* possuem os genes MEL que produzem a enzima extracelular α -galactosidase (melibiase), permitindo a utilização do dissacarídeo melibiose (glicose-galactose). Porém, as cepas de *S. cerevisiae* tipo *ale* carecem desses genes MEL, o que impossibilita a utilização da melibiose. Além disso, às cepas *ale* podem crescer à 37°C, enquanto que as cepas *lager* não apresentam crescimento a temperaturas superiores a 34°C (STEWART; RUSSELL, 1998). Tradicionalmente, as leveduras cervejeiras *ale* foram descritas como de alta fermentação ou de topo, ou seja, que se elevavam à superfície do líquido no final da fermentação formando uma película flutuante e espessa de biomassa que poderia ser retirada desta superfície. Já as leveduras *lager* foram descritas como de baixa fermentação ou de fundo floculando na base do fermentador no final da fermentação formando uma fase sedimentada de biomassa apta a ser retirada no fundo da base do fermentador. Com o emprego de altos fermentadores cilíndricos, de aproximadamente 20 m, as leveduras de baixa fermentação podem ser utilizadas atualmente na

produção de cervejas *ale* e as diferenças de processamento entre as leveduras *ale* (de superfície) e as leveduras *lager* (floculantes) tem se tornado cada vez menos discriminativas e usuais (WALKER, 2000).

De acordo com Priest; Campbell (1996), as principais propriedades das leveduras cervejeiras para que sejam consideradas boas produtoras de cervejeira são:

- Uma velocidade rápida de fermentação sem crescimento celular excessivo.
- Uma utilização eficiente dos açúcares presentes no mosto com uma boa conversão em etanol.
- A habilidade de tolerar o estresse imposto pelas altas concentrações de álcool e pressões osmóticas de componentes do mosto.
- Uma produção reprodutível de certos níveis de compostos do *flavour*.
- Uma floculação ideal para o processo ampliado.
- Boas características de manuseio (retenção da viabilidade durante armazenamento e estabilidade genética).

2.2.5.1. Microrganismos Contaminantes

Além da busca por leveduras com as mais competentes características para elaboração de cerveja, deve-se estar totalmente atento com a assepsia no processo. Os microrganismos estão em toda parte, mas os microrganismos presentes em cada local são diferentes em função das condições para a sua sobrevivência e multiplicação. Nas cervejarias, como em qualquer planta de alimentos, apenas alguns microrganismos são encontrados com maior frequência e o objetivo dos cervejeiros é monitorar a presença dessas espécies e eliminar as condições necessárias para sua multiplicação (MATTOS, 2004).

Além dos microrganismos que são freqüentes neste ambiente, a banana que chega à cervejaria também pode conter bactérias, leveduras e fungos filamentosos (CARVALHO *et al.*, 2009). Alguns fungos, cujos esporos já são presentes nos frutos ainda na planta, não se desenvolvem permanecendo em estado latente devido à falta de condições de ambiente ou maturação. Outros fungos, que são capazes de comprometer a qualidade dos frutos, também podem chegar ao ambiente para onde a banana é transportada. Dentre eles destacam-se: *Pyricularia grisea* (Cooke.), *Cercospora hayi*

(Calpouzos), *Deightoniella torulosa* (Syd.) e *Fusarium sp.* Entre os principais fungos que se desenvolvem nas frutas durante o transporte, maturação e comercialização, consideram-se: *Thielaviopsis* (*Ceratocystis*) *paradoxa*, *Colletotrichum musae*, *Botryodiplodia theobromae* e *Verticillium* (*Stachylidium*) *theobromae*. Além destes a banana pode também conduzir bactérias e leveduras (BLEINROTH, 1985).

Na Cervejaria, dois meios de crescimento distintos são encontrados: o mosto e a cerveja. O mosto é rico em nutrientes, tem pH 5,3 – 5,5 e contém oxigênio, constituindo um meio de crescimento adequado para muitos microrganismos; os componentes do lúpulo possuem ação bactericida, limitando o número de espécies encontradas no mosto. A cerveja, por outro lado, é pobre em nutrientes (que foram consumidos pela levedura), possui pH 3,8 – 4,2, contém lúpulo, um conteúdo de álcool entre 3 - 5 %, baixo nível de oxigênio, sendo mantida geralmente em baixas temperaturas; todos esses fatores fazem da cerveja um meio extremamente inóspito para a maioria dos microrganismos. Os microrganismos contaminantes e sua classificação estão listados na Tabela 2.7 (MATTOS, 2004).

Leveduras diferentes daquela encontrada na cepa usada na elaboração de determinada cerveja é considerada como leveduras selvagens. O gênero *Saccharomyces* é o mais importante. Cerca de 80% das leveduras selvagens pertence a este gênero. Assim *S. diastaticus* ataca a cerveja envasada, mas não pasteurizada (chope), produzindo turbidez, super atenuação e sabor desagradável. Uma fermentação contaminada com *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* resulta em cerveja com sabor fenólico. Cepas deficientes respiratórias de *S. cerevisiae* podem se desenvolver ao lado da cultura industrial e produzir, na cerveja, *flavours* anormais, dentre eles o diacetil (VENTURINE FILHO; CEREDA, 2001).

Entre as bactérias Gram-positivas, as bactérias lácticas são aquelas comumente encontradas na cerveja por sua tolerância à acidez e por serem anaeróbias. O desenvolvimento de *Lactobacillus* está sempre associado à queda no pH da cerveja (produção de ácido láctico) e à formação de turbidez; a presença das células é facilmente visível ao microscópio e, eventualmente, diacetil também é produzido. A presença de *Pediococcus* é facilmente identificada de duas maneiras: ao microscópio, visualizando-se os cocos organizados em “tétradas” (quatro células juntas) e por detecção do *flavour* referente ao diacetil (MATTOS, 2004).

Tabela 2.7. Classificação dos Microrganismos Contaminantes do Processo Cervejeiro.

Tipo de Microrganismo	Gêneros e Espécies	Classe Geral
Bactérias Gram-negativas	<i>Enterobabacter agglomerans</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Hafnia protea</i>	Enterobactérias
	<i>Acetobacter sp.</i> <i>Gluconobacter sp.</i> <i>Zymomonas sp.</i> <i>Pectinatus sp.</i> <i>Megasphaera sp.</i>	Bactérias acéticas
Bactérias Gram-positivas	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Pediococcus sp.</i>	Bactérias lácticas
	<i>Leuconostoc sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>	
Leveduras Selvagens	<i>Saccharomyces sp.</i>	Não-Saccharomyces
	<i>Pichia sp.</i> <i>Hansenula sp.</i> <i>Debaromyces sp.</i> <i>Kluyveromyces sp.</i> <i>Schizosaccharomyces sp.</i>	

MATTOS, 2004

Entre as bactérias Gram-negativas, merecem maior descrição: bactérias acéticas, *Zymomonas*, *Pectinatus* e *Megasphaera*. As bactérias acéticas (*Gluconobacter* e *Acetobacter*) são bastonetes que toleram a acidez da cerveja e utilizam o etanol como substrato para a produção de ácido acético (*flavour* de vinagre), porém necessitam do oxigênio, sendo comuns em barris de chope dispensados com ar

comprimido ou em cervejas produzidas com pouco controle de oxigênio dissolvido. As *Zymomonas* são bastonetes típicos de cervejarias que praticam a adição de carga de sacarose ou glicose, já que este microrganismo não metaboliza a maltose, caracterizando-se pela produção de acetaldeído e, ocasionalmente, H₂S. *Pectinatus* se apresentam em bastonetes curvos cujas células jovens são móveis, anaeróbio obrigatório e caracteriza-se pela produção de ácido acético (*flavour* de vinagre), ácido propiônico (*flavour* de parmesão) e H₂S (*flavour* de ovo podre, repolho). *Megasphaera* são cocos também anaeróbios obrigatórios que produzem ácido butírico (*flavour* de vômito) (MATTOS, 2004).

2.3. O Processo Cervejeiro Tradicional

O processo tradicional de produção de cervejas tipo *lager*, predominante em todo o mundo nos dias atuais, pode ser resumido em poucas etapas, conforme descrito por Virkajärvi (2001). Na primeira delas, denominada mosturação, o malte é moído e misturado com água. As enzimas presentes no próprio malte são então ativadas de acordo com um perfil de temperatura controlado, o qual permite hidrolisar o amido em mono, di, trissacarídeos e dextrinas, e as proteínas em peptídeos e aminoácidos. Essa fase do processo necessita de um tempo de aproximadamente 2 h para ser completada. Após esse tempo, a fração insolúvel do malte (bagaço de malte) é removida por filtração, obtendo-se uma solução denominada mosto.

A próxima etapa consiste na adição de lúpulo e cozimento do mosto durante 1 a 2 h para assegurar a assepsia necessária do meio, promover a precipitação de compostos (complexos formados com proteínas e polifenóis), solubilizar e isomerizar componentes do lúpulo, remover compostos responsáveis por sabores desagradáveis no produto final, inativar as enzimas presentes e permitir a obtenção da concentração desejada de extrato. Ao final do cozimento, o precipitado formado é removido e o mosto é resfriado até a temperatura de fermentação, aerado e inoculado na linha de transferência para o fermentador. A etapa inicial de fermentação do mosto, denominada fermentação primária ou principal, é a fase de maior atividade metabólica da levedura, durante a qual quase todo o extrato fermentescível é convertido em álcool e gás carbônico. Durante este período ocorrem também algumas reações que resultam na formação de subprodutos (ésteres, álcoois superiores e outros) que exercem

um importante efeito no sabor da cerveja. Em função das baixas temperaturas utilizadas (6 a 15°C) durante essa fase, a fermentação primária pode durar até 10 dias. A etapa seguinte corresponde ao período de maturação da cerveja, onde a temperatura é reduzida normalmente a 0°C sendo mantida durante 2 a 4 semanas. Caso haja presença de extrato fermentescível residual na cerveja, este continua a ser fermentado nessas condições, porém de forma mais lenta, sendo esse processo denominado fermentação secundária. Na Figura 2, pode-se observar um esquema simplificado do processo cervejeiro (LINKO *et al.*, 1998).

Figura 2.2. Esquema simplificado do processo cervejeiro (modificado de LINKO *et al.*, 1998).

Os principais objetivos da maturação são a redução da concentração dos compostos de sabor indesejável na cerveja, a saturação do produto final com CO₂ e a remoção dos componentes responsáveis pela turbidez (CARVALHO; BENTO; ALMEIDA e SILVA, 2007). De acordo com esses autores, após o processo fermentativo (fermentação/maturação) a cerveja ainda não está pronta para o consumo e requer vários tratamentos antes de ser engarrafada. Logo, em uma última etapa, a cerveja maturada poderá passar por até seis tratamentos: a) carbonatação; b) modificação de sabor; c) padronização da cor; d) estabilização contra turvação; e) clarificação; f) estabilização biológica.

2.3.1. Características Bioquímicas da Fermentação Cervejeira

As estirpes de Leveduras cervejeiras são anaeróbios facultativos que podem metabolizar a glicose (e outros açúcares) em condições tanto de anaerobiose como de aerobiose. Durante o crescimento aeróbio tanto a fermentação como a respiração podem contribuir para o catabolismo da glicose. Em condições anaeróbias apenas a fermentação é possível. Energeticamente, sendo-lhes mais favorável respirar do que fermentar, as leveduras fermentam o menos possível, favorecendo a respiração (Efeito Pasteur). Contudo, nas estirpes cervejeiras, o efeito Pasteur está normalmente ausente. As estirpes de leveduras cervejeiras, dada a elevada concentração inicial de açúcares do mosto, que leva à repressão catabólica do metabolismo oxidativo na *Saccharomyces cerevisiae* (fenômeno conhecido como efeito Crabtree), são Crabtree+ (CRUZ, 2007).

2.3.1.1. Metabolismo dos Açúcares

Os açúcares atravessam a membrana da célula da levedura pela ação de sistemas de transporte específicos, dada a sua baixa permeabilidade. A glicose e a frutose são admitidas por difusão facilitada, cessando o transporte quando as concentrações são iguais dentro e fora da célula. A maltose e a maltotriose são admitidas por um mecanismo de transporte ativo e as suas concentrações na célula podem fazer com que haja concentrações mais elevadas do que fora dela. A admissão da sacarose é

controlada pela invertase, enzima extracelular excretada pela levedura. Esta enzima hidrolisa a sacarose, em glicose e frutose que são, então, conduzidas para dentro da célula pelos mecanismos já descritos. A maltose, uma vez no interior da célula, é hidrolisada por uma α -D-glicosidase. Quanto a maltotriose, é transportada semelhante a maltose e, provavelmente, pela sua própria permease, mas a uma velocidade inferior (ANDERSON *et al.*, 2000; BRIGGS *et al.*, 1981; HOUGH, 1985).

A utilização da maltose, e da maltotriose, é inibida pela adição de glicose (Masschelein *et al.*, 1963, citado por ANDERSON *et al.*, 2000). A utilização da maltotriose é igualmente inativada pela glicose, mas não é pela maltose. A maltose e a maltotriose são metabolizadas conjuntamente embora a maltose o seja mais rapidamente. Uma vez no interior da célula, os açúcares são metabolizados pela via glicolítica, originando etanol e CO₂ (CRUZ, 2007).

2.3.1.2. A Via Glicolítica da Fermentação Alcoólica

Segundo Cruz (2007), já é suficientemente estudada e conhecida a via de EMP. Esta via traduz a estratégia da célula de obter a energia de que necessita para formar piruvato e, partir deste, originar etanol, via aldeído acético. Aliás, o piruvato está também na origem do carbono necessário à continuação do metabolismo celular.

2.3.1.3. Metabolismo dos Aminoácidos

Os aminoácidos do mosto cervejeiro entram na célula também de uma maneira ordenada. De acordo com Cruz (2007), é clássica a organização dos aminoácidos por Jones; Pierce (1964).

- Grupo I (arginina, lisina, serina, treonina, glutamina, asparagina, ácido glutâmico, ácido aspártico);
- Grupo II (valina, metionina, isoleucina, leucina, histidina);
- Grupo III (glicina, alanina, tirosina, fenilalanina, amônio, triptofano);
- Grupo IV (prolina).

É mais rápida a absorção dos aminoácidos do Grupo I e quase nula a utilização da prolina.

Dufor (1989) demonstrou ser extremamente importante o teor de lipídeos na velocidade de absorção dos aminoácidos: num mosto com 195 mg/L de lipídeos totais, a valina é totalmente utilizada ao fim de 60 horas, contudo, o mesmo mosto com apenas 5,5 mg/L, necessita de mais de 180 horas.

Os aminoácidos não são, habitualmente, incorporados diretamente na célula da levedura, sofrendo reações de transaminações. A assimilação da prolina é severamente reprimida uma vez que a prolina-permease é reprimida pela presença de aminoácidos e amônio no meio e porque o catabolismo da prolina requer a participação do citocromo e de oxigênio molecular como co-fatores da prolina-oxidase, fatores ausentes nas condições anaeróbias do fim da fermentação. A levedura possui, ainda, um sistema de transporte rápido de peptídeos (a melhor assimilação dá-se até aos tripeptídeos) que é, contudo, menos significativo que o dos aminoácidos (CRUZ, 2007).

2.3.1.4. Produção de Moléculas Aromaticamente Ativas

O *flavour* da cerveja tem origem na interação de uma grande multiplicidade de subprodutos do metabolismo da levedura (Figura 2.3).

Figura 2.3. Metabolismo da levedura e produção de moléculas aromaticamente ativas (CRUZ, 2007).

Estão normalmente presentes na cerveja numerosos compostos com enxofre, cerca de 50 álcoois superiores e 100 ésteres, mais de 100 ácidos e compostos carbonilados, etc. Apenas uns 12 compostos excedem o seu limiar de detecção sensorial, mas, por fenômenos de sinergia, o potencial do flavour é bem superior à soma dos compostos individuais. A organização sistemática de análises sensoriais pela fábrica cervejeira assume, portanto, uma grande relevância para a manutenção do perfil aromático de uma cerveja, idealmente acompanhada por análises cromatográficas (CRUZ, 2007).

Os álcoois superiores são parcialmente sintetizados pelas vias catabólica (Erlich) e anabólica e constituem a maior fração volátil presente na cerveja. A sua via de formação pode ser seguida na Figura 2.4. São fatores positivos na sua formação, a temperatura de fermentação (extremamente relevante), a agitação do meio, os lipídeos, O₂ dissolvido, a presença de zinco, aminoácidos, etc. pelo contrário, a aplicação de uma pressão durante a fermentação reduz a sua formação (CRUZ, 2007). A escolha da via depende de cada álcool e da quantidade de aminoácidos disponíveis, decrescendo a importância da via anabólica à medida que o número de átomos de carbono aumenta e crescendo para o fim da fermentação uma vez que os aminoácidos já foram utilizados. A formação de álcoois é influenciada pela estirpe de levedura, as condições de fermentação e a composição do mosto em aminoácidos (MAC DONALD *et al.*, 1984).

Os ésteres são os compostos que mais condicionam o *flavour* da cerveja. Os mais importantes são o acetato de etila (aroma como de solvente), acetato de isoamila (aroma de banana, frutado), caproato de etila e caprilato de etila (maçã azeda) e 2-fenil-etil-acetato (floral, rosas, mel) (VERSTREPEN *et al.*, 2003). Formam-se principalmente na fase de crescimento, mas 40% vêm a forma-se apenas na fase estacionária. A sua presença, em quantidades apropriadas, é muito apreciada no *Bouquet* da cerveja. Resultam da reação entre um álcool e uma acil-coenzima A (graxa):

O seu aparecimento está ligado ao metabolismo dos ácidos graxos (Figura 2.5) (CRUZ, 2007).

A relação entre a síntese de ésteres e o crescimento é muito complexa. Muitos dos fatores que favorecem a formação de álcoois superiores também ajudam ao seu aparecimento (temperatura, por

exemplo), mas o contrario se passa com a agitação do meio (CRUZ, 2007). A fermentação de mosto cervejeiro de alta densidade, não alterando os parâmetros adequados, leva à formação de elevados níveis de ésteres enquanto que a fermentação em tanques cilíndricos de grande profundidade leva ao aparecimento de baixos níveis (ANDERSON *et al.*, 2000).

Figura 2.4. Metabolismo da levedura e produção de moléculas aromaticamente ativas (CRUZ, 2007).

Os compostos de enxofre surgem por três vias: matérias-primas, metabolismo da levedura, contaminação microbiana. Uma boa higiene elimina esta última causa e boas práticas de fermentação garantem os níveis de Dimetilssulfureto (DMS). SO_2 e H_2S são normalmente, reduzidos a valores que não causam problemas e surgem como consequência do metabolismo da levedura, como subprodutos da síntese de cisteína e metionina, a partir de sulfatos e sulfitos. A formação de SO_2 e H_2S depende da estirpe de levedura utilizada. Quando presente em elevada concentração, o SO_2 pode comunicar gosto desagradável á cerveja, mas, a sua presença, por ser um antioxidante, é benéfica. Forma compostos não

aromáticos com aldeídos e cetonas. A elevada concentração de lipídeos provoca o aparecimento de grandes concentrações de SO_2 (ANDERSON *et al.*, 2000).

Figura 2.5. Biossíntese de ésteres, esteróis e lipídeos (CRUZ, 2007).

Têm sido destacados muitos aldeídos na cerveja, mas, com exceção do acetaldeído, normalmente entre 2 a 20 mg/L, os restantes vem do mosto ou de fenômenos de envelhecimento da cerveja. Cada estirpe de levedura produz uma quantidade típica deste aldeído. Caso a sua concentração seja percebida ao gosto, pode ser eliminado com SO_2 (CRUZ, 2007).

Na fermentação formam-se cetonas com 2 grupos carbonila adjacentes (VDK, dicetonas vicinais) que são aromaticamente ativas. Na ausência de valina no mosto cervejeiro, a levedura vai sintetizá-lo, produzindo a partir do piruvato, α -acetolactato, que é reduzido a valina, conforme demonstrado na Figura 2.6. O excesso de α -acetolactato é excretado pela célula e, no mosto, de acordo com o pH do meio, temperatura, presença de oxigênio, etc. esse composto será reduzido a 2,3-butanodiona (ou diacetil). Na fase de maturação, a levedura reincorpora esse diacetil, metabolizando-o até acetoina, que não altera o flavour da cerveja (Lewis; Young, 1995 citado por DRAGONE, 2007). Entretanto, em presença de grandes quantidades de diacetil, devido a produção do mesmo por bactérias contaminantes como

Lactobacillus sp e *Pediococcus sp*, a levedura não consegue metabolizar todo o diacetil e este permanecerá no mosto, afetando a qualidade do produto final, promovendo um *flavour* de manteiga rançosa (CARVALHO; ROSSI; ALMEIDA E SILVA, 2007). De acordo com Venturini Filho; Cereda (2001), o defeito do *flavour* (*off-flavour*) ou *flavour* desagradável promovido pelo diacetil é percebido em concentração igual ou superior a 0,10 mg/L. Segundo Munroe (2006), tanto o diacetil como a 2,3-pentanodiona são importantes para o controle da maturação, porém, o diacetil tem um maior impacto no *flavour* da cerveja. Uma série de reações similares a formação do diacetil ocorre para a formação da 2,3-pentanodiona, cujo precursor é o α -acetohidroxibutirato, produzido pela levedura quando se processa a síntese do aminoácido isoleucina.

Figura 2.6. Formação de diacetil a partir de carboidratos por leveduras (modificado de Lewis; Young, 1995 por DRAGONE, 2007).

2.3.2. Fatores que Influenciam a Fermentação de Mostos

Como já dito anteriormente, vários fatores influenciam a fermentação de mostos para a produção de cervejas. Entre estes fatores podem ser destacados: *a preparação do mosto, a temperatura de fermentação e a suplementação nutricional* (DRAGONE, 2002; RUSSELL; STEWART, 1995).

2.3.2.1 Preparação do mosto

Diversos pesquisadores têm elaborado cervejas com mostos concentrados (ALMEIDA *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2009; DRAGONE; SILVA; ALMEIDA e SILVA, 2004; DRAGONE *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2008). Segundo Russell; Stewart (1995), a elaboração de cerveja com mostos de altas densidades (ou processo high-gravity) apresenta as seguintes vantagens: (1) crescente capacidade de produção de cerveja através de um uso mais eficiente das instalações existentes da planta, (2) redução de custos de energia, custos de mão de obra, limpeza e custos de efluentes, (3) aumento da estabilidade física e das propriedades organolépticas, (4) maior produção de álcool por unidade de extrato fermentável, (5) os mostos podem conter maiores proporções de adjuntos, (6) a cerveja possui um paladar mais suave. Estes autores já discutiram algumas desvantagens deste processo, como: (1) a diminuição da eficiência de extração dos açúcares do malte durante a mosturação e uma redução da utilização de lúpulo devido à alta concentração da massa (aumento da relação de carboidratos para água), (2) diminuição da estabilidade da espuma, (3) os mostos com altas concentrações iniciais de açúcares podem influenciar no desempenho da levedura com efeitos sobre as características de fermentação e floculação (por exemplo: diminuição da tolerância da levedura devido à pressão osmótica, ao etanol e a lavagem com ácido e uma redução do número de reutilizações da levedura).

D'Amore *et al.* (1991) concluíram que à medida que a concentração inicial do mosto é aumentada, efeitos de estresse tais como alta pressão osmótica e níveis de etanol elevados tornam-se mais significativos, resultando em viabilidade reduzidas da levedura e fermentações mais lentas.

As leveduras cervejeiras são geralmente caracterizadas por possuírem uma tolerância baixa à altas concentrações de etanol. O crescimento celular é inibido em concentrações acima de 10% (v/v),

enquanto que a capacidade fermentativa é inibida em concentrações acima de 20% (v/v) de etanol (Ranganathan *et al.*, 1958 citados por ODUMERO *et al.*, 1992).

Almeida *et al.* (2000a) observaram que o aumento na concentração inicial do mosto exerceu um aumento na produtividade do processo quando realizado à 25 °C com a levedura *S. cerevisiae* tipo *lager*. Porém, experimentos realizados com a concentração de 20 °P tiveram um menor grau de fermentação (atenuação do mosto) do que os experimentos realizados com 15 °P. Segundo esses autores, este comportamento deve ser considerado quando se analisa a viabilidade econômica da utilização de mostos mais concentrados.

2.3.2.2 Temperatura

D'Amore *et al.* (1991), utilizando mostos de 25 °P em escala industrial (1600 L), observaram um aumento na velocidade e na extensão da fermentação quando aumentaram a temperatura de fermentação de 14 para 21 °C. Comportamento semelhante foi observado por Dragone *et al.* (2003) ao observarem a fermentação de mosto de alta densidade em escala piloto nas temperaturas de 10 e 15 °C.

De acordo com Casey *et al.* (1984), a influência da temperatura nas fermentações de mostos com alta concentração inicial de substrato está relacionada com a tolerância ao etanol. Mostos de alta concentração (27 °P) obtidos com a adição de xarope de milho, suplementados com nutrientes e fermentados a 14, 20, 25 e 30 °C mostraram que a velocidade da fermentação acompanhou o aumento da temperatura. Por outro lado, a medida da viabilidade celular após o quinto dia, apresentou resultados extremamente baixos em mostos fermentados em altas temperaturas, apesar dos níveis de etanol terem sido similares ao final das fermentações. Segundo esses autores a baixa viabilidade celular observada em fermentações realizadas em altas temperaturas prejudicaria a reutilização da levedura nas cervejarias.

A explicação para o aumento do efeito inibitório do etanol em altas temperaturas tem sido atribuída ao aumento no acúmulo de etanol intracelular em temperaturas elevadas (Navarro; Fink, 1982, citados por CASEY *et al.*, 1984). Suihko; Vilpola; Linko (1993) recomendam para mostos com altíssimas concentrações, uma temperatura de até 14 °C, para ativar o metabolismo da levedura em fermentações

de cervejas *lager*.

2.3.2.3. Suplementação Nutricional

Casey *et al.* (1984) constataram que a deficiência nutricional é outro fator limitante da produção de elevados níveis de etanol. Com uma suplementação apropriada, linhagens de leveduras cervejeiras podem produzir até 16,2% (v/v) de etanol em fermentações descontínuas a 14 °C, utilizando mostos com 31 °P. De acordo com estes autores, para que a levedura cervejeira produza estes níveis de etanol em tempos menores de fermentação, o mosto deve conter dois tipos de suprimentos nutricionais: extrato de levedura como fonte de nitrogênio, e uma mistura de ergosterol e ácido graxo insaturado (através da fração de ácido oléico do *Tween* 80).

Stewart *et al.* (1988) relataram que a composição do meio exerce uma grande influência sobre a capacidade da levedura em fermentar substratos concentrados. A suplementação do meio, com extrato de levedura, peptona e sais de magnésio ou potássio apresentou um efeito positivo sobre a fermentação global.

Fermentando um meio de 35 °P com a levedura *S. cerevisiae* (tipo *lager*) a 20 °C, Thomas; Hynes; Engledew (1994) verificaram que a adição de nutrientes tais como triptona, extrato de levedura e uma mistura de bases purinas e pirimidinas, aumentou a demanda de glicose e a produção de etanol mas não permitiu manter altos níveis da viabilidade celular. Bafrncová *et al.* (1999) observaram um aumento de 17 % na concentração final de etanol quando utilizaram fontes nitrogenadas (extrato de levedura e uréia) nas fermentações alcoólicas com concentrações iniciais de glicose de 300 g/L, pela levedura *S. cerevisiae* Pz 90.

Casey *et al.* (1983) relataram que a concentração de nutrientes limitantes do crescimento em mostos com altas concentrações deve ser aumentada na proporção da concentração específica do mosto utilizado. Dragone *et al.* (2003) observaram que aumentando a concentração do mosto (de 15 para 20 °P), a temperatura de fermentação (de 10 para 15 °C) e a suplementação nutricional (da condição *sem nutrientes* para a condição *com nutrientes* tais como 0,8 % de extrato de levedura, 24 mg/L de ergosterol

e 0,24 % v/v de *Tween* 80), a produtividade volumétrica em etanol aumentou 0,36 unidades de Qp (g/L.h).

Investigações realizadas para otimizar o desempenho das linhagens de leveduras cervejeiras mostraram que a adição de certos íons metálicos pode neutralizar efeitos prejudiciais exercidos na fabricação de cerveja pelo processo de altas densidades de mosto (DRAGONE, 2002). Rees; Stewart (1997) avaliaram os efeitos dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} no desempenho de leveduras *ale* e *lager* em mostos com 20 °P e observaram que um aumento na velocidade de fermentação e no rendimento da produção de etanol foi obtido com a elevação do nível de Mg^{2+} no mosto (adição de 500 ppm), enquanto um aumento no nível de Ca^{2+} (adição de 800 ppm) resultou em uma diminuição no nível de etanol. O efeito do Mg^{2+} é estreitamente relatado por sua habilidade de reduzir a permeabilidade da membrana plasmática de células submetidas ao stress por etanol (HU; BAI; AN, 2003).

2.4. Análise Sensorial

A análise sensorial é um método interdisciplinar utilizado para medir, analisar e interpretar reações causadas pelas características dos alimentos e bebidas ao entrarem em contato com os órgãos dos sentidos: visão, audição, olfato, gustação e tato (CARDELLO, 1999). A experiência de sensações olfativas, gustativas e táteis percebidas durante a degustação, segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (1993), pode ser reunida em um único termo de propriedade sensorial, o sabor, enquanto que o aroma pode ser definido como a propriedade sensorial perceptível pelo órgão olfativo via retronasal durante a degustação.

Embora os instrumentos analíticos sejam efetivos em detectar características físico-químicas importantes para a indústria de bebidas, eles não são capazes de medir a percepção humana. Desta forma, a análise sensorial mostra-se como uma ferramenta imprescindível para o estudo de bebidas, uma vez que esta é a única forma de medir a intensidade de um aroma ou sabor, avaliar a aceitação ou ainda fornecer respostas para quantificar características sensoriais do produto (CARDELLO, 1999).

São muitas as aplicações da análise sensorial na indústria de alimentos e nas instituições de pesquisa, como por exemplo, no controle das etapas de desenvolvimento de um novo produto, na avaliação do efeito das alterações nas matérias-primas ou do processamento tecnológico sobre o produto

final, na seleção de uma nova fonte de suprimento e até mesmo no controle da qualidade do produto, dentre outros. Com isto, é possível afirmar que a avaliação e caracterização sensorial fornecem suporte técnico para a pesquisa, industrialização, *marketing* e controle da qualidade em novos e/ou já conhecidos produtos (DUTCOSKY, 1996; HARDWICK, 1994). Diversos estudos têm sido realizados na avaliação sensorial de bebidas alcoólicas (BOLINI *et al.*, 2004; BOLINI *et al.*, 2003; BOLINI; FARIA, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2008; SILVA, 2005).

A qualidade do produto cervejeiro é, em um sentido amplo, a soma de todas as características que possibilitam atender às necessidades do mercado, isto é, atrair e satisfazer os consumidores do produto (SILVA, 2005). Segundo BENARD (1985), é por intermédio das características sensoriais, identificáveis por análise sensorial, que em parte se estabelece à relação entre o produto e o consumidor, ou seja, as qualidades ou os defeitos memorizados pelo consumidor que determinam sua atitude em relação a este ou aquele produto.

2.4.1. Testes Sensoriais Afetivos

Os testes de aceitação e preferência, também denominados de testes afetivos, têm por objetivo avaliar respostas de indivíduos em relação à aceitação e preferência de um determinado produto ou de uma característica específica deste produto (SILVA, 2005). De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (1993), a aceitabilidade é o grau de aceitação de um produto favoravelmente recebido por um determinado indivíduo ou população, em termos de propriedades sensoriais. Segundo Meilgaard; Civille; Caar (1988), a utilização de testes afetivos é crescente nas empresas, uma vez que o sucesso comercial de seu produto está diretamente relacionado com o atendimento às expectativas do seu consumidor habitual ou potencial.

2.5. Viabilidade Econômica

Na indústria de processos a estimativa dos custos e a evolução econômica de um processo é considerada uma temática especializada.

A análise de custos geralmente pretende responder às seguintes perguntas: quanto custa produzir um produto, que inversão se requer e quanto se recupera do mesmo.

A análise de custos tenta identificar e quantificar a inter-relação entre vários parâmetros de desenhos ou operações do processo e os custos de inversão. Dentro desta análise de custo a estimativa destes está relacionada com o custo do produto e a inversão de capital (KALK e LANGLYKKE, 1985).

Apesar da diferença entre os processos químicos e biológicos, o custo e o procedimento da evolução econômica assim como a metodologia básica desenvolvida para a indústria química é aplicável na biotecnologia (ATKINSON, 1991).

Existem alguns elementos de custo total de um produto e valores típicos para a estimativa (KALK; LANGLYKKE, 1985), como por exemplo:

1.- Matérias primas (30 a 80% dos custos de produção).

2.- Administração

- De operação (3 a 5 % do salário dos operadores diretos e da operação)
- De manutenção (100% do salário do pessoal de manutenção ou 2 a 5% do capital fixo de inversão).
- De laboratório (20 a 40% do salário do pessoal de laboratório).

3.- Salário e supervisão (10 a 40% do custo de produção)

4.- Facilidades auxiliares (5 a 20% do custo de produção).

Custos fixos.

1.- Depreciação e juros (8 a 12 % do capital fixo de inversão para a depreciação e 10 a 15% do capital fixo de inversão para os interesses).

2.- Impostos (1 a 4% do capital fixo de inversão).

3.- Seguro (1 a 3% do capital fixo de inversão).

4.- Outros gastos de planta (10 a 70% dos salários de supervisão).

5.- Administração

6.- Marketing

7.- Pesquisa e Desenvolvimento

3. Objetivo Geral

Contribuir para o desenvolvimento da área de conversão de biomassa, especificamente na tecnologia de utilização de novos adjuntos para o malte de cevada na obtenção de cervejas não convencionais.

3.1. Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar a banana a ser utilizada como adjunto do malte em diferentes graus de maturação,
- ✓ Determinar as condições de extração dos sólidos solúveis da banana para a elaboração de um suco fermentável,
- ✓ Avaliar a produtividade volumétrica (Q_p) e o fator real de conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$ real) de mostos com banana com densidades convencionais (12 – 15 °P) em planta piloto,
- ✓ Efetuar um estudo cinético da fermentação destes mostos com banana com densidades convencionais em planta piloto,
- ✓ Realizar um estudo da produtividade volumétrica em etanol (Q_p) em mosto de alta densidade (17,5 °P) fermentado após suplementação nutricional em mini-bioreatores cilíndricos de 0,9 L,
- ✓ Reproduzir o ponto otimizado das fermentações nos mini-bioreatores de 0,9 L em bioreator de 180 L na planta piloto e caracterizar a cerveja obtida,
- ✓ Avaliar sensorialmente os pontos otimizados em mosto convencional e de alta densidade com testes de consumidor,
- ✓ Fazer um estudo preliminar da viabilidade econômica do processo.

4. Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados na Microcervejaria do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena – EEL, Universidade de São Paulo – USP e no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho - UMinho - Portugal.

4.1. Matérias-Primas para a Preparação do Mosto com Banana

4.1.1. Água

A água utilizada nos experimentos para a obtenção do mosto com banana foi obtida do poço artesiano localizado no Campus I da USP - Lorena.

4.1.2. Malte de cevada

O malte de cevada utilizado foi o malte claro do tipo Pilsen, doado pela Malteria do Vale S/A, e fornecido em sacos de 50 kg.

4.1.3. Lúpulos

Na elaboração do mosto com banana foram utilizados dois tipos de lúpulos da marca Hopsteiner, doação da Wallerstein Industrial e Comercial Ltda:

- (1) Lúpulo aromático (*Pellets* tipo 90, com aproximadamente 7% de ácido alfa, origem E.U. A).
- (2) Lúpulo de amargor (Extrato CO₂, 30% de ácidos alfa).

4.1.4. Adjunto de Banana

Foram utilizadas como adjunto bananas do tipo *prata* (prata mineira ou prata amarela) doadas pela EMATER da cidade de Cristina-MG, no grau de maturação “Muito Madura” de acordo com as seguintes

condições: Estádio de desenvolvimento do fruto = $\frac{3}{4}$ gordo, diâmetro do fruto = 36 mm, superfície das faces do fruto = largas e arredondadas e grau de maturação determinados por escala visual e teste físico de refratometria em *Refratômetro Digital de Brix PAL-1*, Atago, Tóquio (AYUB *et al.*, 1996), combinado a testes químicos de pH e de acidez titulável sendo os resultados da titolometria expressos em g de ácido málico $\times 100^{-1}$ g de polpa de acordo com a metodologia descrita por Carvalho *et al.* (1990). As bananas selecionadas foram lavadas com água tratada para a retirada de impurezas. Em seguida foram sanificadas por 30 minutos, com água a 100 ppm de cloro livre, e enxaguadas com água corrente potável para a remoção do excesso de cloro, que poderia interferir na etapa de fermentação. Em seguida as bananas foram descascadas e trituradas (Figura 4.1) em aparelho *Walita Liqüefaz* para a adição das mesmas na etapa de mosturação de acordo com o item 4.4.3.

Figura 4.1. Bananas trituradas para a adição na etapa de mosturação.

4.2. Microrganismo

O inóculo foi preparado a partir de células da levedura cervejeira *Saccharomyces cerevisiae* 308 de baixa fermentação (tipo *lager*), obtida do Centro de Tecnologia de Produtos Alimentares SENAI/Vassouras-RJ procedente da coleção de cepas da Academia DOEMENS - Alemanha.

A cultura estoque foi mantida repicada em tubos de ensaio contendo agar malte inclinado e

conservada sob refrigeração a 4 °C.

4.3. Inóculo

A partir da cultura estoque, foram repicados 4 tubos de ensaio contendo agar malte inclinado e mantidos em estufa à 30 °C por 24 h. Após esse tempo, os repiques foram transferidos por lavagem superficial do agar inclinado e em condições assépticas, para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, com 200 mL de mosto de 12 °P. O frasco foi incubado a 30 °C, em agitador rotatório (Innova 4000 - New Brunswick Scientific) a 200 rpm por 18 h. Posteriormente, o inóculo obtido foi avolumado para 2 L pela adição em condições assépticas, de 1,8 L do meio de fermentação em um frasco Erlenmeyer de 4 L, sendo mantido em banho refrigerado a mesma temperatura empregada no processo fermentativo (10, 12,5 ou 15 °C), com aeração de 0,1 vvm por 30 h .

Após esse tempo, o inoculo foi avolumado para 15 L pela adição de 13 L do mosto (puro malte) de 12 °P, em um propagador de aço inoxidável de 40 L. As células foram mantidas sob aeração de 0,01 vvm, à mesma temperatura empregada no processo fermentativo (10, 12,5 ou 15 °C), pelo tempo necessário para atingir uma concentração celular entre $1-2 \times 10^7$ cel/mL no início da fermentação (aproximadamente 54-60 h).

4.4. Preparo do Mosto com Banana

A elaboração dos mostos com concentrações de 12, 12,5, 15 ou 17,5 °P foi realizada pelo preparo de um mosto base, ou seja, puro malte, com uma concentração aproximada de 11 °P no final da etapa de fervura. Na etapa de mosturação malte moído foi misturado com suco de banana (previamente preparado por cozimento e hidrolise da banana pela enzima pectinase comercial doada pela empresa Novozymes-Paraná), para atingir a concentração desejada (12, 12,5, 15 ou 17,5 °P) no início da fermentação. Para a preparação do mosto com banana, foram realizadas as seguintes etapas:

4.4.1. Moagem do Malte

Foram moídos 21 kg de malte em moinho de dois rolos, em duas etapas. Na primeira etapa, o malte foi moído com um distanciamento entre rolos de 0,6 mm. Na segunda etapa, o moinho foi regulado para um distanciamento entre rolos de 0,1 mm.

A granulometria do malte moído foi controlada num classificador vibratório horizontal (Granutest) visando obter valores próximos dos industriais e dos experimentais, mostrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Valores de granulometria do malte: na indústria (TSCHOPE, 2001) e nos experimentos (DRAGONE, 2002).

Componentes da moagem	Indústria		Experimentos	
	Malha (mm)	% Massa Total	Malha (mm)	% Massa Total
Cascas	1,270	18 a 30	1,119	51,60
Sêmola grossa	1,010	8 a 11	1,000	7,49
Sêmola fina I	0,647	35	0,589	15,72
Sêmola fina II	0,253	17 a 21	0,250	7,63
Farinha	0,152	3 a 10	0,177	2,88
Pó de farinha	Fundo	11 a 15	Fundo	14,23

4.4.2. Elaboração do Suco de Banana

A elaboração do suco de banana foi iniciada pela adição do purê de banana na tina de mosturação, em presença da água primária (105 L). A quantidade de água utilizada levou em consideração também, o teor de umidade da banana prata (~ 65,12 %).

O perfil típico de carboidratos da banana prata, utilizada na condição de maturação muito madura, para a preparação do suco foi de: açúcares redutores em glicose e frutose (12,45% p/p), açúcares não redutores em sacarose (3,20% p/p) e amido (0,48% p/p). O purê de banana em presença de água passou por tratamento enzimático (temperatura de 43,2°C, tempo de 1,33 h, agitação de 32 rpm, pH 5 e 0,084 % v/p de solução enzimática pectinolítica Pectinex Ultra SP-L sobre o purê de banana) e tratamento térmico (temperatura de 84°C durante 0,67 h) sendo o pH final do suco ajustado para o valor de pH ótimo no início da mosturação com malte (pH 5,5 – 5,6), utilizando bicarbonato de amônio ou ácido láctico de grau alimentício.

4.4.3. Mosturação

O malte moído foi misturado com o suco de banana (no volume da água primária) a 35 °C (Figura 4.2). A operação foi conduzida em tanque com capacidade para 125 L provido de agitador (32 rpm), aquecimento elétrico, controlador e indicador de temperatura digital (fixado no painel de controle), além de isolamento térmico.

A temperatura variou de 35 a 76 °C. O pH inicial foi ajustado em 5,4 pela adição de ácido láctico ou bicarbonato de amônio, e tamponado com CaCl_2 na proporção de 1,26 g/kg do malte. Os valores de temperatura e pH correspondentes às atuações enzimáticas estão mostradas na Tabela 4.2. O perfil do temperatura e tempo de ativação de cada enzima foi de 35, 45, 52, 62, 72, 78 °C, por 20, 10, 10, 20, 20, 10 minutos, respectivamente.

Tabela 4.2. Temperatura e pH de atuação das enzimas do malte (TSCHOPE, 2001).

Enzimas	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Atuação
Hemicelulases	40 a 45	4,5 a 4,7	Hemicelulose
Exopeptidases	40 a 50	5,2 a 8,2	Proteínas
Endopeptidases	50 a 60	5,0	Proteínas
Dextrinase	55 a 60	5,1	Amido
Beta-amilase	60 a 65	5,4 a 5,6	Amido
Alfa-amilases	70 a 75	5,6 a 5,8	Amido

Figura 4.2. Mosturação do malte moído com suco de banana.

No final da mosturação em 72 °C foi realizado o teste com solução de iodo 0,2 N a fim de verificar a sacarificação do amido do malte e do mínimo percentual de amido da banana. Após a confirmação da completa hidrólise desta macromolécula, pela ausência da coloração roxo-azulada, característica da reação com a solução de iodo (em temperatura ambiente), a solução foi aquecida até 76 °C com o objetivo de inativar as enzimas presentes. A Figura 4.3 mostra a diferença de coloração da reação do iodo na presença ou ausência do amido na mostura.

Figura 4.3. Reação do iodo: (A) ausência de amido, (B) presença de amido.

4.4.4. Filtração

A filtração da mostura para a obtenção do mosto com banana foi realizada num recipiente (Tina de Filtração) com capacidade de 120 L contendo agitador, disco filtrante PAKSCREENS (fundo com ranhuras), bomba centrífuga e isolamento térmico. A casca do malte (Figura 4.4) serviu como camada filtrante. Após a filtração, a camada filtrante foi lavada com 48,83 L de água (denominada água secundária) a 75 °C.

Figura 4.4. Torta da casca do malte com material insolúvel da banana.

4.4.5. Fervura

Após o procedimento de filtração o mosto com banana foi transferido para o recipiente de fervura, um tanque encamisado de capacidade igual a 250 L provido de aquecimento elétrico e isolamento térmico. O mosto foi fervido por 1 hora. O tanque de fervura e os demais tanques da brassagem estão dispostos na Figura 4.5.

Figura 4.5. Equipamentos da brassagem: Da esquerda para direita tem-se a tina de mosturação, a tina de filtração e a tina de fervura.

No começo da fervura foi acrescentado o lúpulo em *pellets* na concentração de 0,82 g/L. O mosto será mantido em fervura por 60 min, permitindo uma evaporação máxima de até 20% do volume inicial. No final da fervura foram adicionados o lúpulo em extrato, na concentração de 0,10 g/L em relação ao volume inicial de fervura, e ácido láctico 96%, para ajustar em 5,0 o pH inicial da fermentação.

O mosto foi então recirculado por 60 min, entrando tangencialmente no recipiente de fervura para permitir a precipitação de proteínas e polifenóis. Durante esse tempo, o mosto foi resfriado até 40 - 45 °C, transferindo água em temperatura ambiente para a camisa da caldeira de fervura.

Após a recirculação, o mosto foi mantido em repouso por 60 min, sendo resfriado até 30 °C. No final do repouso, foi retirado o sedimento (comumente denominado de *trub* pela indústria). Nesta etapa, foi separado em recipientes de 500 mL, 4 L e 20 L, a quantidade suficiente de mosto (200 mL, 1,8 L e 18 L, respectivamente) para posterior preparo do inóculo. Esses mostos foram diluídos com água destilada para se obter concentração de 12 °P. Os mostos foram autoclavados a 112 °C por 15 min e estocados sob refrigeração a 4 °C, para posterior utilização. Posteriormente, o mosto em repouso foi transferido ao fermentador, sendo resfriado em trocador de calor de placas, até a temperatura de fermentação (10; 12,5 ou 15 °C). Na linha do mosto frio, à saída do trocador de calor, foi injetado ar estéril visando obter uma concentração de oxigênio dissolvido no tanque de fermentação de 8 ppm.

4.5. Condições de Fermentação

4.5.1. Fermentações na EEL – USP

A inoculação do mosto foi realizada transferindo-se os 15 L de inóculo do propagador para o fermentador, previamente a transferência do mosto elaborado de acordo com o item 4.4.

De acordo com as condições experimentais foram transferidos 105 L do mosto da caldeira de fervura, de forma a se obter 120 L no começo da fermentação.

A fermentação foi conduzida em fermentador de 180 L provido de controlador e indicador digital de temperatura, manômetro analógico para indicação da pressão interna e registro, para tomada de amostras no fundo do tanque (Figura 4.6).

Figura 4.6. Fermentador / Maturador de 180 L.

O tempo final de cada fermentação foi determinado quando se alcançou uma concentração aparente de açúcares totais (°P) aproximadamente igual a 1 °P acima da concentração de açúcares não fermentescíveis do ensaio do ponto final.

4.5.2. Fermentações na UMinho – Portugal

A inoculação do mosto foi realizada transferindo-se os 405 mL de inóculo de recipiente com aeração para um sistema de seis fermentadores descontínuos acoplados, conhecidos como mini-bioreatores cilíndricos (Figura 4.7), previamente a transferência do mosto elaborado de acordo com o item 4.4 para estes fermentadores.

De acordo com as condições experimentais foram transferidos 3155 mL do mosto do recipiente com aeração, de forma a se obter 3560 mL no começo da fermentação, 540 mL em cada fermentador.

A fermentação foi conduzida em fermentadores de 900 mL, com volume útil de 540 mL provido de um banho termostático com controle e indicação digital de temperatura, e um sistema específico para tomada de amostras no fundo do fermentador (Figura 4.7).

Figura 4.7. Sistema com seis fermentadores cilíndricos descontínuos da Uminho - Portugal.

De maneira similar ao item 4.5.1, o tempo final de cada fermentação foi determinado quando se alcançou uma concentração aparente de açúcares totais ($^{\circ}\text{P}$) aproximadamente igual a 1 $^{\circ}\text{P}$ acima da concentração de açúcares não fermentescíveis do ensaio do ponto final.

4.6. Acompanhamento Analítico dos Experimentos

Durante todo o processo de fermentação foram retiradas amostras periódicas (em tempos de 6 em 6 horas nas primeiras 48h e nas demais horas de fermentação de 12 em 12 h) de 30 mL de mosto em balões volumétricos de 200 mL no fermentador da EEL - USP. As amostras foram desgaseificadas pela

agitação vigorosa dos balões durante 1 min. Para a determinação da concentração das células em suspensão foram utilizados 10 mL de amostra desgaseificada medidas com pipeta graduada segundo o item 4.6.1. O sobrenadante obtido após a centrifugação a 4000xg por 20 min (item 4.6.1) foi utilizado para quantificar o extrato aparente (ou concentração aparente de açúcares totais), etanol, pH e densidade do mosto. Para a determinação das concentrações de glicerol, glicose, frutose, maltose e maltotriose foram utilizadas 10 mL de amostra desgaseificada, de acordo com o item 4.6.2. Técnicas analíticas similares foram aplicadas nos experimentos realizados na Uminho – Portugal, exceto o volume de amostras retiradas que foi de 5 mL periodicamente em tempos de 8 em 8h.

4.6.1. Concentração Celular

A concentração de células em suspensão foi determinada de duas maneiras:

(1) Por peso seco das leveduras (expresso em g/L), onde as amostras (10 mL) foram centrifugadas a 4000xg por 20 min, recuperando-se a massa de células, que foi lavada e centrifugada a 4000xg por 10 min com água destilada, para posterior secagem em estufa à 105 °C até peso constante.

(2) Por contagem em câmara de Neubauer (1/400 mm² x 1/10 mm) e expressa em cel/mL. A determinação da viabilidade celular (células viáveis e não viáveis) foi realizada pelo Método Internacional de coloração com azul de metileno segundo ASBC (1996).

4.6.2. Concentração de Açúcares e Glicerol

A determinação da concentração aparente de açúcares totais (ou extrato aparente) durante a fermentação foi realizada em equipamento analisador de cerveja (*Beer Analyser 2*, ANTON-PAAR®, Áustria) e o resultado expresso em °Plato.

Foram determinadas as concentrações do glicerol no ponto otimizado e dos açúcares glicose, frutose, maltose, e maltotriose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em equipamento WATERS, nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura da coluna, 45°C; detector de índice de refração; eluente H₂SO₄ 0,01N desgaseificado; fluxo de 0,6 mL/min e volume de amostra injetada, 20 µL. Antes da determinação por HPLC, as amostras foram centrifugadas a

4000xg por 20 min, e os sobrenadantes foram devidamente diluídos com água deionizada e passados por filtros 0,45 µm (Millipore) e Sep-Pak C₁₈ Cartridge (Waters Associates). As concentrações de glicose, frutose e maltose foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão. A concentração de maltotriose foi calculada a partir da curva de calibração da maltose de acordo com ASBC (1996).

4.6.3. Concentração de etanol

A concentração de etanol na amostra foi determinada em equipamento analisador de cerveja (*Beer Analyser 2*, ANTON-PAAR®, Áustria) e o resultado expresso em % v/v.

4.6.4. Concentração de oxigênio dissolvido

A concentração de oxigênio dissolvido no início da fermentação foi determinada utilizando um medidor portátil, marca INSTRUTHERM, modelo MO-890, com sensor de oxigênio tipo polarográfico e sensor de temperatura.

4.6.5. Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria, em um aparelho marca BENCHTOP (Istek, Inc) modelo Eco Met P25, com correção de temperatura.

4.6.6. Determinação da Densidade do Mosto

A densidade do mosto foi determinada em equipamento analisador de cerveja (*Beer Analyser 2*, ANTON-PAAR®, Áustria) e o resultado expresso em g/mL.

4.6.7. Determinação do Teor de Voláteis no Ensaio Otimizado para o Mosto de Alta Densidade

A concentração dos voláteis acetaldeído, acetato de etila, hexanoato de etila, n-propanol, isobutanol, alcoóis amílicos, alcoóis superiores totais, DMS (Dimetilssulfureto), diacetil e dicetonas vicinais totais (VDK totais) foram determinadas na condição experimental high-gravity otimizada em escala piloto, fazendo-se a coleta das amostras em alguns pontos da fermentação primária e maturação, por Cromatografia em Fase Gasosa no Grupo FEMSA (antiga cervejaria Kaiser) de Jacareí – SP.

4.6.8. Determinação do Teor de Carboidratos Solúveis e Insolúveis na Banana Prata

Para quantificação de amido, carboidrato insolúvel na banana, utilizou-se a técnica de quantificação de amido em materiais amiláceos do Instituto Adolf Luts, 1985 com algumas modificações: Pesou-se 5g de polpa de banana em uma cápsula de porcelana. Tratou-se, sucessivamente, com 3 porções de 20 mL de éter etílico. A amostra foi agitada e decantada. Transferiu-se o material desengordurado para um balão volumétrico de 250 mL, com o auxílio de 100 mL de etanol a 70%. Adicionou-se 0,5 g de carbonato de cálcio e agitou-se o sistema. A mistura foi aquecida em banho termostatado com água a 83-87 °C, por 1 hora, usando um pequeno funil no gargalo do frasco para condensar os vapores. Deixou-se o sistema esfriando e em repouso por 15 horas. Completou-se o volume do balão com etanol a 95%. O sistema foi agitado e em seguida deixado sedimentar. Separou-se o material sólido (1) do líquido (2) (este foi usado para a determinação dos carboidratos solúveis na polpa da banana, evaporando-se o álcool e dissolvendo o resíduo com água). O material sólido (resíduo) foi lavado com 50 mL de etanol a 70%. Transferiu-se o resíduo juntamente com o papel de filtro para um frasco Erlenmeyer de 300 mL com o auxílio de 150 mL de água. Adicionou-se 4 gotas de solução de hidróxido de sódio a 10%. Aqueceu-se em autoclave a uma atmosfera por uma hora. Deixou-se o sistema esfriar e adicionou-se 5 mL de ácido clorídrico (a solução ficou fortemente ácida para a efetiva hidrólise do amido). Aqueceu-se em autoclave por mais 30 minutos. Neutralizou-se a solução com hidróxido de sódio a 10%. Transferiu-se para um balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com água. Nesta solução determinou-se os açúcares redutores em glicose pelo método de Somogy; Nelson, 1945

citado por DEMIATE *et al.*, 2002. Os açúcares redutores em glicose provenientes da hidrólise do amido representaram o teor de amido na amostra.

A solução líquida (2) foi evaporada e o resíduo sólido foi resuspenso em parte com água num frasco Erlenmeyer de 300 mL. Adicionou-se solução de acetato neutro de chumbo saturada, até não haver mais precipitação (cerca de 3,8 mL). Completou-se o volume com água e filtrou-se a solução em filtro seco. O filtrado foi recebido em um balão volumétrico de 500 mL, seco e o mesmo foi avolumado. Transferiu-se o líquido para um Becker de 1000 ml e adicionou-se sulfato de sódio, seco, até precipitar o excesso de chumbo. A solução foi filtrada e o filtrado foi recebido em um frasco seco. Em uma parte desta solução foram determinados os açúcares redutores solúveis na polpa da banana pelo método de Somogy; Nelson, 1945 citado por DEMIATE *et al.*, 2002. Em outra parte desta solução foram determinados os açúcares totais segundo Molina, 1995 que propõem a hidrólise dos açúcares não redutores em redutores. Os açúcares não redutores foram determinados pela diferença entre os açúcares totais e os redutores.

4.6.9. Determinação de Metais da Cerveja no Ensaio Otimizado e na Polpa da Banana

Todas as determinações analíticas dos elementos metálicos de interesse foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica, marca PERKINELMER e modelo Aanalyst 800, que possui um sistema integrado incorporando os orgânicos componentes para operação chama e forno de grafite em um único instrumento, permitindo a troca automática da técnica de atomização escolhida. A metodologia consistiu, primeiramente, na digestão das amostras em meio ácido (HCl / HNO₃) e peróxido para decomposição dos açúcares e compostos orgânicos e, posteriormente, realizou-se a determinação analítica com atomização por chama.

4.6.10. Determinação Preliminar da Extração dos Sólidos Solúveis na Banana

Realizou-se a extração aquosa a quente (84°C) dos sólidos solúveis da banana de acordo com um planejamento fatorial completo 2² (Tabela 10). A concentração aparente dos açúcares totais foi analisada em equipamento analisador de cerveja (*Beer Analyser 2*, ANTON-PAAR®, Áustria) e o resultado

expresso em $^{\circ}\text{Plato}$. Levou-se em consideração nos ensaios preliminares, a umidade da banana prata muito madura (~65,12%), na correção do volume dos frascos Erlenmeyer em 105 mL com água.

4.7. Metodologia de Análise dos Resultados

Os fatores abaixo apresentados foram calculados de acordo com Borzani (1986) e Moser (1988):

1) Velocidade específica de crescimento de células em suspensão (h^{-1}):

$$\mu_x = \frac{1}{X_s} \frac{dX_s}{dt}$$

2) Velocidade específica de consumo de açúcares (g/gh):

$$\mu_s = \frac{1}{X_s} \frac{dS_t}{dt}$$

3) Velocidade específica de consumo de glicose (g/gh):

$$\mu_G = \frac{1}{X_s} \frac{dG}{dt}$$

4) Velocidade específica de consumo de frutose (g/gh):

$$\mu_F = \frac{1}{X_s} \frac{dF}{dt}$$

5) Velocidade específica de consumo de maltose (g/gh):

$$\mu_M = \frac{1}{X_s} \frac{dM}{dt}$$

6) Velocidade específica de consumo de maltotriose (g/gh):

$$\mu_{Mt} = \frac{1}{X_s} \frac{dMt}{dt}$$

7) Velocidade específica de produção de etanol (g/gh):

$$\mu^P = \frac{1}{X_s} \frac{dP}{dt}$$

8) Tempo de geração (h):

$$t_g = \frac{0,693}{\mu_M}$$

9) Rendimento em etanol (g/g):

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S_t} = \frac{(P - P_i)}{(S_t - S_i)}$$

10) Produtividade Volumétrica em etanol (g/L.h):

$$Q_{PS} = \frac{\Delta P}{\Delta t} \frac{(P - P_i)}{(t - t_i)}$$

Onde:

X_s : Concentração de células em suspensão (g/L)

S_h e S_i : Concentração aparente inicial e no tempo t de extrato (g/L)

P_i e P : Concentração inicial e no tempo t de etanol (g/L)

t_i e t : Tempo inicial e tempo t de fermentação (h)

dX_s : Concentração de células em suspensão gerada (g/L), no instante t

dS_i : Concentração aparente de açúcares totais consumidos (g/L), no instante t

dG , dF , dM , dMt : Concentração de glicose, frutose, maltose e maltotriose (g/L), consumidos no instante t

dP : Concentração de etanol produzido (g/L), no instante t

μ_m : Velocidade específica máxima de crescimento de células em suspensão (h^{-1})

As velocidades específicas foram calculadas utilizando as equações do método geométrico de cálculo de derivadas proposto por Le Duy; Zajic (1973).

4.8. Metodologia Estatística

Os experimentos foram conduzidos utilizando 3 planejamentos fatoriais, ambos 2^2 de acordo com metodologia proposta por Barros Neto *et al.* (1995) e Box *et al.* (1978). Os esquemas das matrizes dos planejamentos e os níveis utilizados estão mostrados nas Tabelas 4.3, 4.4, 4.5, respectivamente.

Os valores das variáveis dos planejamentos fatoriais foram codificados de acordo com a equação:

$$Z = \frac{N - \mu}{\frac{(N_2 - N_1)}{2}}$$

Onde:

Z é o valor codificado da variável;

N é valor real da variável;

μ é a média dos valores reais das variáveis;

N_1 é o valor real mínimo e N_2 o valor real máximo da variável.

Tabela 4.3. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2^2 com quatro ensaios de ponto central e mais quatro ensaios em estrela rotacional.

Ensaio	Níveis reais		Níveis codificados	
	Massa úmida (g)	Tempo (Min)	Massa úmida	Tempo
1	17	30	-1	-1
2	35	30	+1	-1
3	17	60	-1	+1
4	35	60	+1	+1
5	26	45	0	0
6	26	45	0	0
7	26	45	0	0
8	26	45	0	0
9	13,3	45	-1,41421	0
10	38,7	45	+1,41421	0
11	26	23,78	0	-1,41421
12	26	66,21	0	+1,41421

Tabela 4.4. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2^2 com quatro ensaios de ponto central.

Ensaio	Níveis reais		Níveis codificados	
	Concentração (°P)	Temperatura (°C)	Concentração	Temperatura
1	12	10	-1	-1
2	15	10	+1	-1
3	12	15	-1	+1
4	15	15	+1	+1
5	13,5	12,5	0	0
6	13,5	12,5	0	0
7	13,5	12,5	0	0
8	13,5	12,5	0	0

As análises estatísticas dos resultados obtidos nos planejamentos experimentais foram realizadas utilizando-se os programas STATIGRAPHICS versão 4.1 e STATÍSTICA versão 5.0.

A significância dos fatores experimentais foi avaliada pelo teste *t* do *Student* onde, se o valor de *t* calculado (*t_{calc}*) for superior ao de *t* tabelado (*t_{1-α, λ}*), para um nível de significância *α* e *λ* graus de liberdade, então o termo em causa contribui significativamente para a resposta. Os níveis de significância e probabilidade, assim como a notação utilizada para denotar cada nível, encontram-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.5. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2² com dois ensaios de ponto central.

Ensaio	Níveis reais		Níveis codificados	
	SI**	SO*	SI**	SO*
1	360	(0,8; 24; 0,24)	+1	+1
2	360	(0,4; 12; 0,12)	+1	-1
3	60	(0,8; 24; 0,24)	-1	+1
4	60	(0,4; 12; 0,12)	-1	-1
5	210	(0,6; 18; 0,18)	0	0
6	210	(0,6; 18; 0,18)	0	0

SI**: Suplementação Inorgânica (mg/L de MgSO₄);

SO*: Suplementação Orgânica (% p/v de extrato de levedura, mg/L de Ergosterol e % v/v Tween 80).

Tabela 4.6. Nível de probabilidade e notação utilizada para cada nível de significância nos planejamentos efetuados.

Nível de Significância	P	Notação
90%	p<0,10	*
95%	p<0,05	**
99%	p<0,01	***

Os modelos foram determinados através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (BOX *et al.*, 1978) aplicado aos resultados experimentais obtidos no planejamento fatorial completo. Estes modelos estão representados na equação:

$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n b_{ij} X_i X_j$$

Onde:

Y_i, representa a variável de resposta,

b₀, *b_i*, *b_{ii}* e *b_{ij}* representam os coeficientes de regressão,

X_i, e *X_j* representam as variáveis estudadas.

As superfícies de resposta foram plotadas utilizando-se o programa STATISTICA versão 5.0.

4.9. Metodologia de Análise Sensorial

A análise sensorial das cervejas produzidas em escala piloto, nos experimentos otimizados, foram realizadas por *Teste de Preferência* do tipo Comparação Pareada e *Teste de Aceitação* com escala hedônica estruturada de nove pontos, segundo Meilgaard; Civille; Caar, 1999. Os resultados foram processados estatisticamente de acordo com Carneiro; Minim, 2006. Os testes foram realizados com o público universitário, na faixa etária de 18 a 30 anos, nas cabines de análise sensorial da Microcervejaria da USP de Lorena, comparando as cervejas experimentais otimizadas, com uma cerveja do mercado de características globais próximas. No teste de aceitação as amostras foram apresentadas aos julgadores de forma monádica e seqüencial. Já no teste de preferência as amostras foram apresentadas aos julgadores aos pares. Todas as amostras foram balanceadas. No convite ao teste sensorial, foi pedido como pré requisito aos provadores, serem maiores de 18 anos e gostarem de cerveja. O modelo das fichas utilizadas nos teste de aceitação e de preferência se encontram nas Figuras 4.8 e 4.9 respectivamente.

Nome:	Idade:
Avalie a amostra codificada de cerveja e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou da amostra.	
☐ – gostei muitíssimo (adorei) ☐ – gostei muito ☐ – gostei moderadamente ☐ – gostei ligeiramente ☐ – nem gostei / nem desgostei ☐ – desgostei ligeiramente ☐ – desgostei moderadamente ☐ – desgostei muito ☐ – desgostei muitíssimo (detestei)	
Amostra: _____	
Comentários:	

Figura 4.8. Ficha utilizada nos testes de preferência com escala hedônica estruturada de 9 pontos.

Nome:	Idade:
Por favor, prove da esquerda para a direita as duas amostras codificadas de cerveja e faça um círculo na amostra de sua preferência.	
<div style="text-align: center;"><div style="display: inline-block; width: 150px; border-bottom: 1px solid black; margin-right: 20px;"></div><div style="display: inline-block; width: 150px; border-bottom: 1px solid black;"></div></div>	
Comentários:	

Figura 4.8. Ficha utilizada nos testes de aceitação do tipo comparação pareada.

4.10. Metodologia do Estudo Preliminar da Viabilidade Econômica do Processo

Na condição experimental otimizada para a produção de cerveja a partir de mosto com banana a 17,5 °P, foram estimados com base nos estudos de Candido, 2008 e Solenzal *et al.*, 2005, os parâmetros econômicos principais para um estudo preliminar de produção desta cerveja em Microcervejaria. Para isto verificou-se: o Custo de Investimento Inicial a partir do orçamento dos equipamentos (R\$) e o Custo de Produção (R\$ / L / Mês) verificando-se os Custos Diretos Variáveis; os Custos Diretos Fixos e os Custos Indiretos.

5. Resultados e Discussão

5.1. Ensaio Preliminares com a Banana (*Musa spp*)

5.1.1. Quantificação dos Grupos de Carboidratos da Banana

Na primeira etapa do presente trabalho foram realizados ensaios com a Banana Prata da cidade de Cristina-MG em três diferentes estágios de maturação a fim de se quantificar os carboidratos solúveis e insolúveis no purê da polpa. Estes estágios de maturação e as variáveis analisadas podem ser observados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Variação nos teores de umidade e de carboidratos solúveis e insolúveis na Banana Prata durante a maturação.

Grau de Maturação	Umidade (%)	*Amido (%)	*Açúcares (%)		
			Redutores	Não Redutores	Totais
Amarelo-Verde	62,1	6,46	7,39	2,20	9,59
Madura	63,0	4,28	8,36	4,52	12,88
Muito Madura	65,1	0,48	12,45	3,20	15,65

*Resultados expressos em gramas de carboidrato por 100g de polpa de banana [g/100g (peso/peso)].

As transformações da banana ocorrem durante todo processo de maturação, afetando constituintes como ácidos, amido, açúcares, ácido ascórbico e umidade, entre outros (CERQUEIRA DE JESUS *et al.*, 2004).

Observa-se na Tabela 5.1, que o teor de amido na Banana Prata decresceu acentuadamente da maturação Amarelo-Verde (6,46%) a Muito Madura (0,48%). Fernandes *et al.* (1979) citados por Bleinroth (1985), verificaram um decréscimo similar do teor de amido (7,80 - 0,63%) em seus estudos com Banana Prata. Segundo Zhang *et al.* (2005), as enzimas amilase participam da hidrólise do amido e este pode chegar a valores inferiores a 1% na última etapa de maturação.

Os grânulos de amido são formados por dois polímeros de glicose, designados por amilose e amilopectina, que se associam por meio de ligações (pontes) de hidrogênio. Esses polissacarídeos formam complexos com outras substâncias presentes no vegetal (VITOLLO, 2001; ZHANG *et al.*, 2005). A amilose e a amilopectina podem aparecer em diferentes proporções, dependendo da origem do amido

(von POSER, 1999). Segundo Vitolo (2001), amilose é uma macromolécula linear constituída por pelo menos 500 unidades de glicose, podendo apresentar redobramentos e/ou torções que lhe conferem uma estrutura tridimensional (estabilizada por pontes de hidrogênio intramoleculares). As unidades de glicose são unidas umas as outras por meio de ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Já a amilopectina, por sua vez, é uma macromolécula com alto grau de ramificação, estando as unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4, surgindo a cada 20 / 30 unidades de glicose um ponto de ramificação, cuja ligação glicosídica é do tipo α -1,6.

A banana verde contém um alto teor de amido que, durante a maturação, se converte por ação enzimática em açúcares solúveis, com predominância dos redutores - glicose e frutose- e do não redutor – sacarose (ADÃO; GLÓRIA, 2005). Pela análise da Tabela 5.1, pode-se observar um aumento relativo no teor de açúcares redutores (7,39; 8,36 e 12,45 %) com a evolução do processo de amadurecimento da banana. Pode-se verificar que o aumento no teor de açúcares solúveis totais (açúcares redutores somados aos não redutores solúveis na polpa) na banana, também acompanhou a maturação em valores de 9,59; 12,88 e 15,65 %. Os valores determinados para o teor de açúcares redutores e açúcares totais no presente trabalho são concordantes aos encontrados por Matsuura *et al.*, 2002. Estes autores encontraram para os açúcares totais um valor mínimo de 15,0% e para os açúcares redutores um valor máximo de 12,4%, ao analisarem a cultivar Pacovan e os híbridos PV03-44 e PV03-76 selecionados pela *Embrapa Mandioca e Fruticultura*.

À medida que se procedeu à maturação, o teor de umidade na polpa da Banana Prata aumentou ligeiramente para os valores de 62,13; 63,00 e 65,12 %, respectivamente (Tabela 5.1). De acordo com Bleinroth (1985), uma parte do aumento da umidade na polpa é atribuída às trocas da pressão osmótica, que resulta na transferência da água para a polpa. Durante a maturação pode-se notar uma maior pressão na polpa e uma menor na casca. Esta diferenciação de pressão entre polpa e casca resulta numa migração desta última para a primeira. Isto se deve ao fato de que, sendo o amido o maior constituinte da polpa da fruta verde, não influi na pressão em toda sua extensão, porém a hidrólise do amido em açúcar solúvel durante a maturação causa um aumento da pressão osmótica, que é proporcional à formação do açúcar, logo, o conteúdo de açúcar na casca é menor do que na polpa.

Quanto aos metais, nota-se pela Tabela 5.2 que a Banana Prata apresentou uma quantidade alta de sais minerais, sendo que se destacou em maior proporção o potássio (42,33 - 43,00g K₂O / 100g de matéria úmida).

Tabela 5.2. Quantidade de sais minerais contidos na Banana Prata.

Óxido do elemento	Teor dos Metais (%) em termos de óxido na Banana Prata		
	Amarelo-Verde	Madura	Muito Madura
Cálcio (CaO)	0,120	0,0925	0,0811
Magnésio (MgO)	0,104	0,0954	0,0788
Potássio (K ₂ O)	42,952	42,613	42,327
Sódio (Na ₂ O)	0,338	0,213	0,121
Alumínio (Al ₂ O ₃)	0,382	0,217	0,100
Ferro (Fe ₂ O ₃)	1,590	1,230	0,737

Bleinroth (1985) afirma que os sais minerais presentes na banana apresentam pequena variação com a maturação da fruta, sendo sempre maior nas bananas verdes que nas maduras. Tal fato pode ser observado na Tabela 5.2 e pode ser atribuído a transferência de água da casca para a polpa durante a maturação, diluindo os sais minerais.

5.1.2. Estudo da Extração Aquosa a Quente dos Sólidos Solúveis da Banana (HWE)

5.1.2.1. Análise Estatística e Modelagem Matemática para a Extração dos Sólidos Solúveis na Banana Muito Madura

A fim de se verificar a influência dos fatores estudados na *Extração Aquosa a Quente dos Sólidos Solúveis da Banana* (HWE – Hot Water Extraction) e determinar as condições que permitam obter um suco de banana fermentável que possa ser utilizado na elaboração de cerveja, os dados foram processados estatisticamente.

Dentre os parâmetros estudados, foi dada ênfase à HWE, como resposta do processo frente à análise estatística.

Para avaliar se os fatores estudados foram significativos ou não, foi necessário realizar o cálculo do erro experimental, baseado nas repetições dos experimentos. Para um planejamento fatorial fracionário sem repetição, não é possível efetuar tais cálculos, devido à carência de graus de liberdade. Pode-se estimar esse erro considerando as interações maiores que as de segunda ordem, cujos efeitos geralmente não são significativos ou seus valores são muito próximos do erro experimental (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995; BOX *et al.*, 1978). Neste estudo, utilizou-se um planejamento fatorial completo 2^2 com 4 ensaios de repetição no ponto central (Tabela 5.3), a fim de diminuir a carência de graus de liberdade para a realização do cálculo do erro experimental, permitindo avaliar se os fatores estudados foram significativos ou não. Em sequência foram realizados mais 4 ensaios em estrela rotacional, ou seja, o planejamento foi ampliado, acrescentando um planejamento idêntico ao já existente, porém, girado de 45 graus em relação a orientação de partida. O resultado é uma distribuição octogonal. Este argumento geométrico leva à conclusão que os novos pontos estão a uma distância de $2^{0,5}$ do ponto central (em variáveis codificadas) e, portanto são localizados de acordo com as coordenadas mostradas nas quatro últimas linhas da Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2^2 com quatro ensaios de ponto central e mais quatro ensaios em estrela rotacional.

Ensaio	Variáveis independentes				Variável dependente
	Níveis reais		Níveis codificados		HWE (°P)
	Massa úmida (g)	Tempo (Min)	Massa úmida	Tempo	
1	17	30	-1	-1	4,12
2	35	30	+1	-1	6,68
3	17	60	-1	+1	4,82
4	35	60	+1	+1	6,63
5	26	45	0	0	5,54
6	26	45	0	0	5,57
7	26	45	0	0	5,07
8	26	45	0	0	5,55
9	13,3	45	-1,41421	0	3,53
10	38,7	45	+1,41421	0	7,51
11	26	23,78	0	-1,41421	5,45
12	26	66,21	0	+1,41421	3,53

A análise dos resultados obedeceu a sequência proposta por Barros Neto; Scarminio; Bruns, 1995; Box *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2006. Esta sequência estabelece o cálculo dos efeitos, estimativa do erro, interpretação dos resultados e obtenção do modelo estatístico.

As estimativas dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a HWE encontram-se na Tabela 5.4, onde se pode verificar que somente o efeito principal (ou linear) do fator tempo [Ft] não apresentou significância estatística ao nível de 95 % de confiança, enquanto que o termo quadrático deste fator [Ft]² foi significativo a 95 %.

Observa-se na mesma tabela que o efeito principal do fator massa de banana [FM] também apresentou significância estatística ($p < 0,05$). Deste modo, quando se passou do nível -1,41421 (13,3 g) para o nível +1,41421 (38,7 g) a HWE aumentou em média 2,50 %.

Tabela 5.4. Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (HWE) segundo um planejamento fatorial 2² com quatro ensaios de ponto central e mais quatro ensaios em estrela rotacional.

Fatores de interações	Estimativas	Erros-padrão	T	P
Média	5,579000	0,093722	59,52728	0,000010*
[FM]	2,499645	0,171112	14,60826	0,000696*
[Ft]	-0,516322	0,171112	-3,01746	0,056874
[Ft] ²	-0,737001	0,187444	-3,93184	0,029294*

*Significativo ao nível de 95 % de confiança.

Na Tabela 5.5, encontra-se a Análise de Variância da regressão do modelo representativo da HWE.

Tabela 5.5. Análise de variância da regressão do modelo que representa a (HWE).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de P
Modelo	13,934	3	4,64496	5,39	0,0127*
Falta de ajuste	2,5905	5	0,51810	8,8477	0,051270
Erro Puro	0,1756	3	0,05856	-	-
Resíduos	2,7661	8	0,345774	-	-
Total	16,701	11	-	-	-

R² = 0,83437 % e R² ajustado = 0,77226; Erro médio absoluto = 0,325286; Erro padrão = 0,588026; *Significativo ao nível de 5 % da probabilidade.

Ao se observar o valor de P na tabela de ANOVA para a significância do modelo (Tabela 5.5), nota-se que ele é igual a 0,01 e menor que 0,05, demonstrando a existência de uma relação estatística

entre as variáveis ao nível de 95 % de confiança. O valor de R^2 indica que o modelo matemático permite explicar 83,437 % da variabilidade nos resultados experimentais na HWE em função das mudanças nos valores de massa de banana empregada e no tempo de extração. O percentual não explicado está relacionado com o erro puro dos experimentos, ou seja, é devido a erros de metodologia da própria análise. Assim, pode-se concluir que o ótimo nível de significância ($p < 0,05$) e o elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 83,437\%$) obtidos da análise de variância indicam que o modelo matemático quadrático em estudo é adequado e ajusta os dados experimentais.

Ainda na Tabela 5.5, observa-se o valor de R^2 ajustado (77, 226 %), que é o mais apropriado para comparar modelos matemáticos com diferentes números de variáveis independentes. O erro padrão estimado mostra o desvio padrão dos resíduos em 0,588026. Este valor é geralmente usado para construir limites da predição para novas observações. Já o erro médio absoluto (MAE) igual a 0,325286 demonstra o valor médio dos resíduos. Os resíduos são gerados da soma dos valores da falta de ajuste do modelo com o erro puro. Observa-se na mesma tabela (Tabela 5.5) que a falta de ajuste do modelo não apresenta significância estatística em ($p < 0,05$).

Com base nos resultados da análise de variância e níveis de significância (p) foi feita análise de regressão múltipla para a estimativa dos coeficientes que compõem o modelo matemático quadrático representativo da HWE. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^2 com mais quatro ensaios de ponto central e quatro ensaios em estrela rotacional para o modelo que representa a (HWE).

Variáveis independentes	Parâmetros	Coeficientes	Erros-padrão	T	P
Constante	Constante	5,579000	0,093722	59,52728	0,000010*
[FM]	X_1	1,249823	0,085556	14,60826	0,000696*
[Ft]	X_2	-0,258161	0,085556	-3,01746	0,056874
$[Ft]^2$	X_2^2	-0,368500	0,093722	-3,93184	0,029294*

$R^2 = 0,83437$ e R^2 ajustado = 0,77226

Verifica-se na Tabela 5.3 que o termo referente ao fator tempo de extração foi negativo tanto na forma linear como na forma quadrática deste coeficiente. Apesar da forma linear deste termo não ser significativa a 95 % de confiança (mas apresentar valor próximo desta significância estatística), ela deve ser mantida no modelo matemático empírico por uma questão de hierarquia do modelo.

O modelo matemático resultante que descreve a HWE é definido pela seguinte equação:

$$Y_1 = 5,579 + 1,24982 X_1 - 0,258161 X_2 - 0,3685 X_2^2$$

Onde:

Y_1 é a Extração dos Sólidos Solúveis da Banana (°P),

X_1 , X_2 são os fatores codificados: massa de banana empregada e tempo de extração, respectivamente.

Este modelo prevê o favorecimento da HWE utilizando purê de banana entre os níveis de 1,1 a 1,41421 (de 35,9 à 38,5g) e o tempo de -0,70 à 0,00 (de 34,5 à 45min). Nestas condições a extração é aumentada em valores superiores a 7,307 °P, o que pode ser verificado na superfície de resposta referente a este modelo (Figura 5.1).

Figura 5.1. Superfície de resposta descrita pelo modelo proposto que representa a HWE.

5.1.2.2. Determinação da Condição Ótima para a Extração dos Sólidos Solúveis na Banana (HWE)

Uma vez determinado o modelo matemático empírico representativo da resposta de interesse, a próxima etapa do estudo foi a determinação da condição ótima da extração dos sólidos solúveis na banana (HWE).

Segundo Barros Neto; Scarminio; Bruns (1995), uma representação gráfica, embora seja sempre conveniente, não é necessária para localizar o ponto máximo da superfície de resposta. Isto pode ser feito derivando-se a equação do modelo em relação a todas as variáveis e igualando-se as derivadas a zero. A derivação do modelo para o estabelecimento do ponto onde o tempo é ótimo na HWE encontra-se abaixo:

$$Y_1 = 5,579 + 1,24982 X_1 - 0,258161 X_2 - 0,3685 X_2^2 \therefore$$

$$(\partial Y_1 / \partial X_2) = -0,258 - (2 \cdot 0,369) \cdot X_2 \therefore$$

$$0 = -0,258 - (0,738) \cdot X_2 \therefore$$

$$X_2 = (0,258 / -0,738) \therefore$$

$$X_2 = -0,350$$

A condição ótima para HWE foi determinada em função do tempo de extração. Observa-se que a extração se eleva linearmente com o aumento da massa úmida de banana (Figura 5.1). Assim, o ponto ótimo para extração é encontrado no tempo estabelecido no nível -0,350 (39,75 min) com a maior quantidade de massa em estudo (38,5 g). Valores de massa úmida superiores ao nível 1,41421 tornam-se inviáveis do ponto de vista prático para a elaboração de um suco fermentável de banana.

5.1.2.3. Teste do Modelo Matemático Empírico

A fim de obter a validação do modelo para a extração dos sólidos solúveis na banana, foram realizados dois experimentos denominados “teste do modelo”. Um na condição ótima pertencente à faixa de valores avaliada no planejamento fatorial (experimento A1). Outro em escala ampliada para a massa úmida de banana (de 17g para 17 Kg de banana), obedecendo todas as outras condições estabelecidas no ensaio 1 da Tabela 5.3 (experimento A2). Como já dito, este ensaio (A2) foi reproduzido nas mesmas condições do ensaio 1 (100rpm de agitação á 84 °C por 30 minutos), só que, em tanque com 105 L de solução ao invés do frasco de 105 mL. Levou-se em consideração em ambas as escalas, a umidade da banana (65,12%) na correção dos volumes dos recipientes com água, em 105 mL ou 105 L.

Os resultados para os experimentos A1 e A2 de validação do modelo encontram-se na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Teste de Validade do Modelo Matemático Empírico.

Variável Resposta	Condições Experimentais da Extração (HWE)							
	Tempo: 39,75 min; Volume: 105 mL; Massa: 38,70 g; Agitação: 100 rpm; Temperatura: 84 °C				Tempo: 30 min; Volume: 105 L; Massa: 17 Kg; Agitação: 100 rpm; Temperatura: 84 °C			
	Resposta Predita	-95% de confiança	+95% de confiança	*Resposta Observada	Resposta Predita	-95% de confiança	+95% de confiança	*Resposta Observada
HWE (°P)	7,392	6,909	7,875	7,695	4,219	3,763	4,674	4,220

*Média de três repetições.

Os valores experimentais obtidos (observados) quanto à extração dos sólidos solúveis totais na banana prata, encontram-se em torno dos valores previstos pelo modelo (Tabela 5.7). As variações observadas entre os valores previstos pelo modelo e os obtidos experimentalmente estão dentro do limite do erro experimental, indicando que o modelo proposto pode representar matematicamente a HWE em função da variação do tempo de extração e da massa úmida de banana, dentro de uma faixa de nível de confiança de 95 %.

Comparando-se os resultados obtidos no presente trabalho com os alcançados por Lee *et al.* (2006) quanto a HWE, verifica-se que a metodologia selecionada neste estudo corresponde ao esperado quanto ao aumento da resposta extração em função do tempo. Porém, neste estudo foi verificado que isto não acontece após o valor ótimo para o tempo de extração (39,75 min). Após este valor do tempo (no cume da superfície de resposta) a extração começa a decair mesmo com o aumento da massa de

banana. Este fato se dá provavelmente pela caramelização dos açúcares na temperatura estudada (84 °C) em função do tempo de extração.

Com estes estudos preliminares pôde-se observar que a Banana Prata muito madura apresenta carboidratos disponíveis em quantidades substanciais demonstrando seu potencial como adjunto do malte no processo cervejeiro. Esta utilização da polpa da fruta inova o processo biotecnológico clássico de produção de cerveja e possibilita a elaboração de uma cerveja com atributos sensoriais característicos.

5.2. Estudo da Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp) e Rendimento Real em Etanol (Yp/s), no Final de Cada Ensaio na Planta Piloto

5.2.1. Análise Tecnológica e Modelagem Matemática Estatística para a Resposta Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp), no Final de Cada Ensaio na Planta Piloto

Os dados experimentais das fermentações realizadas na planta piloto da Microcervejaria da EEL – USP foram processados estatisticamente a fim de se avaliar a influência dos fatores estudados na resposta *Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp)* e determinar as condições que permitiram obter uma cerveja com banana de qualidade em um menor tempo de processo.

Os experimentos foram conduzidos segundo um planejamento fatorial 2^2 de acordo com metodologia proposta por Barros Neto; Scarminio; Bruns, 1995; Box *et al.* (1978) e Rodrigues; Iemma (2005), avaliando-se os seguintes fatores: Temperatura de fermentação e Concentração do mosto. Os ensaios foram avaliados num mesmo instante ($t = 72$ h), correspondente ao tempo final de fermentação do experimento com menor número de horas, visando evitar a influência do fator tempo de fermentação nas respostas analisadas. Considerou como tempo final, o tempo de fermentação com 1 °P residual de açúcares fermentáveis. O esquema da matriz de planejamento e os níveis utilizados estão demonstrados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2^2 com quatro ensaios de ponto central.

Ensaio	Variáveis independentes				Variável dependente	
	Níveis reais		Níveis codificados		Qp (g/L.h)	Yp/s (g/g)
	Concentração (°P)	Temperatura (°C)	Concentração	Temperatura		
1	12	10	-1	-1	0,35	0,43
2	15	10	+1	-1	0,25	0,42
3	12	15	-1	+1	0,58	0,48
4	15	15	+1	+1	0,56	0,44
5	13,5	12,5	0	0	0,40	0,45
6	13,5	12,5	0	0	0,40	0,45
7	13,5	12,5	0	0	0,41	0,45
8	13,5	12,5	0	0	0,41	0,45

As estimativas dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (Qp) encontram-se na Tabela 5.9, onde se pode verificar que o efeito principal do fator concentração do mosto [FC] não apresentou significância estatística ao nível de 95 % de confiança. Além disso, a interação entre este fator e o fator temperatura ([FC].[FT]) também não foi significativa a 95 % de confiança.

Observa-se ainda na Tabela 5.9 que o efeito principal do fator temperatura [FT] foi o único termo que apresentou significância estatística ($p < 0,05$), sendo ainda este efeito positivo. Deste modo, quando se passou do nível -1 para o nível +1 a (Qp) aumentou em média 0,27 unidades de Qp (g/L.h).

Tabela 5.9. Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (Qp) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com quatro ensaios de ponto central.

Fatores de interação	Estimativas	Erros-padrão	T	P
Média	0,420000	0,007706	54,50640	0,000001*
[FC]	-0,060000	0,021794	-2,75299	0,051217
[FT]	0,270000	0,021794	12,38845	0,000244*
[FC] [FT]	0,040000	0,021794	1,83533	0,140357

*Significativo ao nível de 95 % de confiança.

Uma vez que a temperatura apresentou um efeito positivo, significa que uma maior temperatura durante o processo fermentativo favorece a produtividade volumétrica em etanol. Dragone *et al.* (2003) estudando entre outros parâmetros, a influência do aumento temperatura de fermentação na elevação da produtividade volumétrica em etanol (Qp), observaram que, mostos cervejeiros com adjunto de xarope de alta maltose quando fermentados a 10 e a 15 °C apresentaram um aumento de Qp, proporcional ao

aumento da temperatura. Briggs *et al.* (2004), investigando o efeito da temperatura na velocidade de fermentação de mostos cervejeiros de 12,5° P, observaram que aumentando a temperatura de fermentação, reduz-se o tempo de atenuação do mosto. Assim, a temperatura exerce primeiramente seu efeito na velocidade de metabolismo da levedura, exercendo efeito mínimo no grau de crescimento celular durante a fermentação.

Na Tabela 5.10, encontra-se a Análise de Variância da regressão do modelo representativo da (Qp).

Tabela 5.10. Análise de variância com erro total para (Qp) no final de cada ensaio.

Fatores de interação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de P
[FC]	0,003600	1	0,003600	7,5789	0,051217
[FT]	0,072900	1	0,72900	153,4737	0,000244*
[FC] [FT]	0,001600	1	0,001600	3,3684	0,140357
Erro Total	0,001900	4	0,000475	-	-
Total	0,080000	7	-	-	-

$R^2 = 97,625\%$ e R^2 ajustado = 0,95844; Média quadrática residual = 0,000475;

*Significativo ao nível de 5 % da probabilidade.

A análise de variância obtida para esta resposta (Tabela 5.10) mostra que o fator temperatura apresentou significância estatística em $p < 0,05$ com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,97625. Ou seja, o fator temperatura foi significativo ao nível 5 % de probabilidade.

Com base nos resultados da análise de variância e níveis de significância (p) foi feita a análise de regressão múltipla para estimativa dos coeficientes que compõe o modelo matemático representativo de (Qp). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de "student" e níveis de significância do planejamento fatorial 2^2 com mais quatro ensaios de ponto central para o modelo que representa a (Qp).

Variáveis independentes	Parâmetros	Coeficientes	Erros-padrão	T	P
Constante	Constante	0,420000	0,007706	54,50640	0,000001*
[FC]	C	-0,030000	0,010897	-2,75299	0,051217
[FT]	T	0,135000	0,010897	12,38845	0,000244*
[FC] [FT]	C.T	0,020000	0,010897	1,83533	0,140357

$R^2 = 0,97625$ e R^2 ajustado = 0,95844,

*Significativo ao nível de 95% de confiança.

Com base nos dados obtidos na Tabela 5.11, a equação do modelo linear proposta para descrever a produtividade volumétrica em etanol (Qp), na região em estudo foi:

$$Y_2 = 0,4200 - 0,0300C + 0,1350T - 0,0200C.T$$

Onde:

Y_2 é a produtividade volumétrica em etanol, (g/L.h).

C- Valor codificado da variável concentração do mosto.

T- Valor codificado da variável temperatura de fermentação.

Observando-se a superfície de resposta (Figura 5.2) pode-se verificar que o modelo estabelecido acima prevê o melhor favorecimento de (QP) em valores superiores ao nível codificado em 0,75 para o fator temperatura de fermentação. Para o fator concentração do mosto, este modelo prevê o favorecimento de (QP) realizando-se ensaios abaixo do nível -0,45. Nestas condições a (Qp) é aumentada em valores superiores á 0,535 (g/L.h).

Figura 5.2. Superfície de resposta descrita pelo modelo proposto que representa a (Qp).

Dentro dos limites experimentais deste estudo, pode-se observar que melhores valores de (Qp) foram obtidos aumentando a temperatura de fermentação e diminuindo a concentração do mosto. Dragone *et al.* (2003) relataram que os cervejeiros têm utilizado aumentos de temperatura para elevar a velocidade de fermentação, diminuindo o tempo total do processo. Arruda *et al.* (2003), fermentando suco de banana, observaram que a evolução da fermentação decorreu em um tempo de 18 dias na temperatura inferior estudada (16 °C), porém, à temperatura ambiente local (30 °C), houve um esgotamento acelerado do substrato (10 dias) prejudicando a qualidade sensorial da bebida. Na fermentação de mostos cervejeiros foi verificado que a utilização da temperatura de 15 °C durante a fermentação pode ser considerada como a temperatura limite para aumentar a produtividade volumétrica em etanol sem uma alteração no *flavour* da bebida (DRAGONE *et al.*, 2003).

Após a obtenção do modelo, o próximo passo foi checar a curvatura (Tabela 5.12) para a verificação de qual modelo ajusta melhor os dados experimentais (se linear ou quadrático).

Tabela 5.12. Análise da curvatura para o modelo que descreve a (Qp) no final de cada ensaio.

Análise dos Fatores	Coefficientes	Erros-padrão	T	P
Média das interações	0,435000	0,002887	150,6884	0,000001
Curvatura	-0,030000	0,004082	-7,3485	0,005208*

$R^2 = 0,99922$ e R^2 ajustado = 0,99818,

*Significativo ao nível de 5 % da probabilidade.

Estimando-se a curvatura para o modelo que descreve (Qp) pôde-se observar que a mesma apresentou significância estatística em $p < 0,05$. O excelente valor de R^2 alcançado (99,875 %) com a análise da curvatura indica que um modelo matemático quadrático ajustaria melhor aos dados experimentais. Para a estimativa deste modelo é necessário a realização de um passo ascendente realizando experimentos na planta piloto em face centrada ou em estrela rotacional aumentando o limite experimental, podendo-se ainda otimizar a resposta produtividade volumétrica em etanol (Qp). Porém, a questão da otimização, será discutida a partir da análise da próxima resposta (Rendimento Real em Etanol – Yp/s), a fim de se garantir a melhor conversão dos açúcares fermentáveis em etanol dentro de um tempo razoável de processo.

5.2.2. Análise Tecnológica e Modelagem Matemática Estatística para a Resposta Rendimento Real em Etanol (Yp/s), no Final de Cada Ensaio na Planta Piloto

Nesta análise foram utilizadas as respostas do (Yp/s) destacadas na Tabela 5.8, assim como a matriz do planejamento (projeto fatorial completo 2^2 com quatro ensaios de ponto central). Para o cálculo da obtenção dos valores da resposta Rendimento Real em Etanol (Yp/s real) encontrados na Tabela 5.8, foram levados em consideração apenas os açúcares fermentáveis (glicose, frutose, maltose e maltotriose) onde a maltose e a maltotriose tiveram seus valores transformados de forma estequiométrica em glicose para a padronização do cálculo e futuras comparações com o rendimento teórico máximo de Gay-Lussac. O Rendimento Aparente ou Fator de Conversão Aparente em Etanol (Yp/s aparente), que leva em consideração a conversão do extrato aparente em etanol, não foi considerado para os cálculos neste item. Na Tabela 5.13, encontram-se as estimativas dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para o (Yp/s). Pode-se verificar que tanto o efeito principal do fator concentração do mosto [FC] como o efeito principal do fator temperatura de fermentação [FT] apresentaram significância estatística ao nível de 95 % de confiança. Além disso, a interação entre este fator e o fator temperatura ([FC].[FT]) também foi significativa dentro do mesmo limite de confiança (95 %).

Tabela 5.13. Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (Yp/s) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com quatro ensaios de ponto central.

Fatores de interação	Estimativas	Erros-padrão	T	P
Média	0,447500	0,001250	358,0000	0,000000*
[FC]	-0,030000	0,003536	-8,4853	0,001058*
[FT]	0,040000	0,003536	11,3137	0,000348*
[FC] [FT]	-0,020000	0,003536	-5,6569	0,004813*

*Significativo ao nível de 95 % de confiança;

Pode-se verificar ainda na Tabela 5.13 que fator temperatura [FT] foi o único termo que apresentou seu efeito principal positivo. Deste modo, quando se passou do nível -1 para o nível +1 o (Yp/s) aumentou em média 0,04 unidades de Yp/s (g/g). Uma vez que a temperatura apresentou efeito principal positivo, significa que o emprego de uma maior temperatura durante o processo fermentativo favorece a conversão de açúcares em etanol, quando considerando o tempo de fermentação de 72 h. Aumentando a

temperatura de fermentação de 10°C para 14°C, Marc *et al.* (1983), observaram um aumento no rendimento em etanol de 0,46 para 0,485 g/g, na fermentação de mostos com 100 g/L de açúcares fermentescíveis, em fermentadores cilindro-cônicos de 1000 L, sem agitação mecânica e conduzidas com a levedura *S. uvarum* 0019.

O termo do fator concentração do mosto [FC] apresentou seu efeito principal negativo (Tabela 5.13). Quando se passou do nível -1 para o nível +1 o (Yp/s) diminuiu em média 0,03 %. O efeito negativo obtido para a concentração inicial de açúcares no mosto implica dizer que a melhor conversão de substrato em produto ocorreu quando se utilizou uma concentração de mosto de 12 °P. Resultados similares foram obtidos por Dragone (2002), ao fermentar com a levedura *S. cerevisiae* 308 *lager*, mostos cervejeiros de 12 °P acrescentados com xarope de alta maltose até as concentrações de 15 ou 20 °P. Esse pesquisador observou uma diminuição no rendimento em etanol com o aumento da concentração inicial de substrato.

Na Tabela 5.14, encontra-se a Análise de Variância da regressão do modelo representativo do (Yp/s).

Tabela 5.14. Análise de variância com erro total para (Yp/s) no final de cada ensaio.

Fatores de interação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de P
[FC]	0,000900	1	0,000900	72,0000	0,001058*
[FT]	0,001600	1	0,001600	128,0000	0,000348*
[FC] [FT]	0,000400	1	0,000400	32,0000	0,004813*
Erro Total	0,000050	4	0,000012	-	-
Total	0,002950	7	-	-	-

$R^2 = 98,305\%$ e R^2 ajustado = 0,97034; Média quadrática residual = 0,0000125;

*Significativo ao nível de 5 % da probabilidade.

Na tabela 5.14 pode-se observar a análise de variância obtida para a resposta (Yp/s). Verifica-se que todos os fatores foram significativos e com um ótimo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,98305$). O efeito principal dos fatores temperatura [FT] e concentração [FC] foram significativos a 5 % de probabilidade. A interação entre eles ([FC].[FT]) também foi significativa dentro da mesma probabilidade (5 %).

Com base nos resultados da análise de variância e níveis de significância (p) foi feita a análise de regressão múltipla para estimativa dos coeficientes que compõe o modelo matemático representativo de (Yp/s). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.15.

Tabela 5.15. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^2 com mais quatro ensaios de ponto central para o modelo que representa o (Yp/s).

Variáveis independentes	Parâmetros	Coeficientes	Erros-padrão	T	P
Constante	Constante	0,447500	0,001250	358,0000	0,000000*
[FC]	C	-0,015000	0,001768	-8,4853	0,001058*
[FT]	T	0,020000	0,001768	11,3137	0,000348*
[FC] [FT]	C.T	-0,010000	0,001768	-5,6569	0,004813*

$R^2 = 0,98305$ e R^2 ajustado = 0,97034

*Significativo ao nível de 95 % de confiança.

Com base nos dados obtidos na Tabela 5.15, a equação do modelo linear proposta para descrever o fator de rendimento em etanol (Yp/s), na região em estudo foi:

$$Y_3 = 0,4475 - 0,0150C + 0,0200T - 0,0100C.T$$

Onde:

Y_3 é o fator de rendimento em etanol, (g/g).

C- Valor codificado da variável concentração do mosto.

T- Valor codificado da variável temperatura de fermentação.

Na Figura 5.3 representativa da superfície de resposta pode-se observar que o modelo estabelecido acima prevê o melhor favorecimento de (Yp/s) para o nível codificado do fator temperatura de fermentação quando os experimentos são realizados acima de 0,8. Para o fator concentração do mosto, este modelo prevê o favorecimento realizando-se ensaios em níveis inferiores á -0,75. Nestas condições o (Yp/s) é aumentado em valores superiores á 0,486 (g/g).

Figura 5.3. Superfície de resposta descrita pelo modelo proposto que representa o (Y_p/s).

Após a obtenção do modelo, o próximo passo foi checar a curvatura (Tabela 5.16) para a verificação de qual modelo ajusta melhor os dados experimentais (se quadrático ou linear).

Tabela 5.16. Análise da curvatura para o modelo que descreve o (Y_p/s) no final de cada ensaio.

Análise dos Fatores	Coeficientes	Erros-padrão	T	P
Média das interações	0,445000	0,00	-	-
Curvatura	0,005000	0,00	-	-

$R^2 = 0,99998$ e R^2 ajustado = 0,99998.

Estimando-se a curvatura para o modelo que descreve (Y_p/s) pode-se observar que a mesma não apresenta significância estatística em $p \leq 0,05$. O ótimo valor de R^2 alcançado (99,999 %) com a análise da curvatura indica que este modelo matemático (linear) ajusta melhor aos dados experimentais.

Para a otimização do (Y_p/s), dividimos os termos da equação ($0,0200 / 0,0150 = 1,33$) estimando o máximo de temperatura a ser empregada com o mínimo de concentração (valores codificados). Substituindo os níveis -1 para concentração e 1,33 para temperatura, alcançamos (Y_p/s) = 0,49 g/g, próximo do (Y_p/s) teórico estimado por Gay-Lussac ($Y_p/s = 0,511$ g/g). Dobrando os valores dos níveis -2 para concentração e 2,66 para temperatura, alcançamos (Y_p/s) = 0,47 g/g. Ou seja, diminui o valor de

($Y_{p/s}$). Como 0,49 é o máximo estimado na equação para os níveis codificados (-1 na concentração e 1,33 na temperatura) e muito próximo do máximo de ($Y_{p/s}$) teórico, determina-se estes níveis como ótimos. Assim, o melhor rendimento real em etanol ($Y_{p/s} = 0,49$ g/g) na cerveja com banana pode ser teoricamente alcançado, elaborando-se a cerveja a 12,0 °P e 15,8 °C. Em termos práticos optou-se pelo ensaio 3 como sendo o ótimo (12,0 °P e 15 °C) por dois motivos: (1) Como já dito, na fermentação de mostos cervejeiros foi verificado que a utilização da temperatura de 15 °C durante a fermentação pode ser considerada como a temperatura limite para aumentar a produtividade volumétrica em etanol sem uma alteração significativa no *flavour* da bebida (DRAGONE *et al.*, 2003). (2) Estima-se que 5 % do açúcar metabolizado pela levedura seja desviado para gerar produtos secundários da fermentação (glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol e outros), resultando num rendimento de 95 % em etanol, conforme já observado por Pasteur em condições adequadas de fermentação (ALMEIDA LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Assim, na condição do ensaio 3 observou-se que apenas 6,07 % do açúcar metabolizado pela levedura cervejeira foi desviado para a geração de tais produtos secundários, garantindo um $Y_{p/s}$ de 0,48 g/g, que é bem próximo ao teórico (0,511) o que demonstra a não necessidade de se gerar novo projeto fatorial com os valores das variáveis concentração e temperatura.

5.3. Estudo Cinético de Fermentação em Escala Piloto do Mosto Cervejeiro com Adjunto de Banana

De acordo com Hiss (2001), o estudo cinético de um processo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entende-se como componentes, o microrganismo (ou a biomassa, X), os produtos do metabolismo (ou metabólitos, P) e os nutrientes ou substratos (S) que compõem o meio de cultura. Tais valores experimentais de concentração (X , P e S respectivamente), quando representados em função do tempo, permitem os traçados das curvas de ajuste, que são indicadas por $X = X(t)$, $P = P(t)$ e $S = S(t)$. Uma vez que estes valores representam parte de um conjunto de dados, necessários ao dimensionamento de uma instalação produtiva, fica evidente que sem o conhecimento da cinética torna-se inviável a transposição de um experimento de laboratório para escala industrial. Além deste aspecto,

cabe mencionar que a cinética possibilita também uma comparação quantitativa entre as condições de cultivo (pH, temperatura, etc.), por intermédio de variáveis como: as velocidades de transformação e fatores de conversão, obtidos também a partir das curvas de ajuste $X = X(t)$, $P = P(t)$ e $S = S(t)$.

Nesta seção foi estudado o comportamento cinético da levedura cervejeira *Saccharomyces cerevisiae* 308 tipo *lager* nas diferentes condições do planejamento fatorial 2^2 com quatro repetições no ponto central (Tabela 5.8), a partir dos valores das amostras tomadas no fermentador cilindro-cônico de 180L. Nesta etapa do estudo foi realizado uma comparação global dos resultados dos ensaios do planejamento com seus pontos centrais, dando ênfase nos valores máximos dos elementos cinéticos (μ_x , μ_s , μ_p).

5.3.1. Comparação da Concentração de Células em Suspensão entre os Diferentes Ensaio do Planejamento e seus Pontos Centrais

A representação gráfica da concentração celular (Figura 5.4) em função do tempo de fermentação mostra que na condição de menor temperatura e maior concentração inicial de açúcares (Ensaio 1 e 2) foram atingidas as menores concentrações de células em suspensão durante todo processo fermentativo.

Figura 5.4. Comparação entre concentrações de células em suspensão (cel/mL) para diferentes condições de fermentação (A) Ensaio do planejamento fatorial 2^2 (Ensaio: 1 □; 2 ○; 3 ■; 4 ●) (B) Pontos centrais (Ensaio: 5 □; 6 ○; 7 ■; 8 ●).

Na figura 5.4 verifica-se também que o aumento da temperatura de fermentação permite atingir a máxima concentração de células em suspensão em um menor tempo. Dragone (2002); Engasser *et al.* (1981) e Marc *et al.* (1983) observaram que a diminuição da temperatura de fermentação diminui a velocidade inicial de crescimento, retarda o começo da floculação celular e diminui a velocidade desta floculação.

A Figura 5.5 representa a produção de biomassa (g/L) para cada condição do planejamento fatorial 2^2 com quatro repetições no ponto central. Quando comparadas as concentrações de células em suspensão expressas em cel/mL e g/L, foi verificado que em todos os ensaios, as concentrações de biomassa (g/L) mostradas nas figuras 5.5 (A) e (B), acompanharam a diminuição da concentração das células em suspensão (cel/mL), observada nas Figuras 5.4 (A) e (B) do início ao fim de todos os ensaios, sem floculação antecipada.

Figura 5.5. Comparação entre concentrações de células em suspensão (g/L) para diferentes condições de fermentação (A) Ensaio do planejamento fatorial 2^2 (Ensaio: 1 □; 2 ○; 3 ■; 4 ●) (B) Pontos centrais (Ensaio: 5 □; 6 ○; 7 ■; 8 ●).

Na Tabela 5.18, observa-se que o valor máximo das velocidades específicas de crescimento celular ($0,114 \text{ h}^{-1}$) foi obtido nas condições de menor concentração inicial de açúcares (12 °P) e de maior temperatura (15 °C). As variações das velocidades específicas de crescimento em função do tempo de fermentação para cada um dos ensaios do planejamento 2^2 com 4 repetições no ponto central (Tabela 5.8), encontram-se detalhadas no Apêndice.

Tabela 5.18. Velocidades específicas máximas de crescimento celular para cada ensaio do planejamento fatorial 2^2 e para os quatro ensaios de ponto central.

Ensaio	Variável Concentração (°P)	Variável Temperatura (°C)	μ_x máximo (h ⁻¹)
1	12	10	0,057
2	15	10	0,031
3	12	15	0,114
4	15	15	0,06
5	13,5	12,5	0,066
6	13,5	12,5	0,063
7	13,5	12,5	0,065
8	13,5	12,5	0,066

5.3.2. Comparação do Consumo de Extrato Aparente entre os Diferentes Ensaio do Planejamento e seus Pontos Centrais

A Figura 5.6 mostra que o aumento da temperatura favoreceu o consumo do extrato aparente (concentração aparente dos açúcares totais), diminuindo o tempo de fermentação. O aumento da velocidade de consumo dos açúcares com o aumento da temperatura foi também observado por Engasser *et al.* (1981) em mostos cervejeiros e por Arruda *et al.* (2003) em suco de banana. Segundo Engasser *et al.* (1981), a influência da temperatura no consumo de açúcares pode ser representada por uma dependência do tipo Arrhenius, entre a velocidade máxima de consumo de açúcares e a temperatura. Arruda *et al.* (2003), relatam que o processo fermentativo é exotérmico, isto é, libera calor, e a atividade da levedura é regulada pela temperatura. A temperatura de fermentação é extremamente importante, pois a baixa temperatura permite obter alto rendimento em etanol, não só pela fermentação completa (esgotamento completo dos açúcares fermentáveis), mas também por minimizar a perda por evaporação.

Figura 5.6. Comparação do consumo de extrato aparente (g/L) para diferentes condições de fermentação (A) Ensaio do planejamento fatorial 2^2 (Ensaio: 1 □; 2 ○; 3 ■; 4 ●) (B) Pontos centrais (Ensaio: 5 □; 6 ○; 7 ■; 8 ●).

Na tabela 5.19, analisando os 4 ensaios do planejamento fatorial, se verificou que o aumento de temperatura aumentou a velocidade específica máxima de consumo de açúcares. Nessa tabela observa-se também que o aumento da concentração inicial de açúcares aumentou a velocidade específica máxima de consumo dos açúcares progressivamente (de 12 a 15 °P). Comportamento contrário a este foi observado por Dragone (2002), ao trabalhar com mostos de 15 a 20 °P. Este autor relacionou este comportamento em seus experimentos com o aumento da pressão osmótica e com elevados níveis de etanol.

Tabela 5.19. Velocidades específicas máximas de consumo de extrato aparente para cada ensaio do planejamento fatorial 2^2 e para os quatro ensaios de ponto central.

Ensaio	Variável Concentração (°P)	Variável Temperatura (°C)	μ máximo (g/g.h)
1	12	10	0,569
2	15	10	0,691
3	12	15	1,105
4	15	15	1,128
5	13,5	12,5	0,433
6	13,5	12,5	0,428
7	13,5	12,5	0,414
8	13,5	12,5	0,431

5.3.3. Comparação da Produção de Etanol entre os Diferentes Ensaios do Planejamento e seus Pontos Centrais

A produção de etanol apresentou uma relação proporcional com a concentração inicial de açúcares no mosto com adjunto de banana (Figura 5.7). O aumento na produção de etanol com o aumento da concentração inicial de substrato no mosto cervejeiro foi verificado por vários autores (CUNNINGHAM; STEWART, 1998; DRAGONE *et al.*, 2003; McCAIG *et al.*, 1992; SILVA, 2005). Observa-se também, que o aumento da concentração inicial de açúcares ocasionou um aumento no tempo necessário para o aparecimento considerável de etanol no meio.

A Figura 5.7 mostra que o aumento da temperatura favoreceu a produção de etanol permitindo atingir uma determinada concentração do produto num menor tempo de fermentação, ou seja, aumentando sua produtividade.

Figura 5.7. Comparação do consumo de etanol (g/L) para diferentes condições de fermentação (A) Ensaio do planejamento fatorial 2^2 (Ensaios: 1 □; 2 ○; 3 ■; 4 ●) (B) Pontos centrais (Ensaios: 5 □; 6 ○; 7 ■; 8 ●).

A Tabela 5.20 mostra que a máxima velocidade específica de produção de etanol foi obtida para a concentração inicial de extrato aparente de 15 °P com fermentação a 15 °C.

Tabela 5.20. Velocidades específicas máximas de produção de etanol para cada ensaio do planejamento fatorial 2^2 e para os quatro ensaios de ponto central.

Ensaio	Variável Concentração (°P)	Variável Temperatura (°C)	μ máximo (h^{-1})
1	12	10	0,264
2	15	10	0,460
3	12	15	0,409
4	15	15	0,585
5	13,5	12,5	0,480
6	13,5	12,5	0,217
7	13,5	12,5	0,224
8	13,5	12,5	0,203

5.4. Análise Estatística para a resposta Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp) em Mosto de Alta Densidade (17,5 °P) Fermentado após Suplementação Nutricional

Tem sido observado que o uso de alguns nutrientes orgânicos como fontes de nitrogênio, ergosterol e ácido oléico (DRAGONE *et al.*, 2003; CASEY *et al.*, 1984) e de alguns nutrientes inorgânicos tais como sais de magnésio (REES; STEWART, 1997 a,b) tem melhorado a fermentabilidade e a produção alcoólica em mostos cervejeiros de alta densidade (high-gravity worts). Neste estudo, realizado no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho – Portugal, mosto com adjunto de banana foi fermentado na concentração de 17,50 °P a 15 °C. As fermentações descontínuas foram conduzidas em mini-bioreatores cilindrocônicos (Figura 4.7) com volume útil de 0,54 L. O perfil de carboidratos do mosto no tempo inicial das fermentações foi de 62,63 % provindo do mosto base, 2,02 % provindo da inoculação e 35,37 % originário das bananas.

Os dados experimentais foram processados estatisticamente a fim de se avaliar a influência dos fatores estudados na resposta *Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp)* e determinar as condições que permitiriam obter uma cerveja de qualidade em um menor tempo de processo. Os experimentos foram conduzidos segundo um planejamento fatorial 2^2 de acordo com metodologia proposta por Barros Neto; Scarminio; Bruns, 1995; Box *et al.* (1978) e Rodrigues; lemma (2005), avaliando-se os seguintes fatores: A Suplementação Inorgânica (mg/L de $MgSO_4$) e a Suplementação Orgânica (% p/v de extrato de levedura, mg/L de Ergosterol e % v/v Tween 80) do mosto. Os ensaios foram avaliados num mesmo instante ($t = 64h$), correspondente ao tempo do primeiro experimento que alcançou 1 °P residual em

extrato fermentável antes do término da fermentação. Assim, buscou-se evitar a influência do fator tempo de fermentação nas respostas analisadas. O esquema da matriz do planejamento e os níveis utilizados estão demonstrados na Tabela 5.21.

Tabela 5.21. Matriz do planejamento do projeto fatorial completo 2^2 com dois ensaios de ponto central.

Ensaio	Variáveis independentes				Variável dependente
	Níveis reais		Níveis codificados		Qp (g/L.h)
	SI**	SO*	SI**	SO*	
1	360	(0,8; 24; 0,24)	+1	+1	0,67
2	360	(0,4; 12; 0,12)	+1	-1	0,67
3	60	(0,8; 24; 0,24)	-1	+1	0,64
4	60	(0,4; 12; 0,12)	-1	-1	0,64
5	210	(0,6; 18; 0,18)	0	0	0,66
6	210	(0,6; 18; 0,18)	0	0	0,66

SI**: Suplementação Inorgânica (mg/L de $MgSO_4$);

SO*: Suplementação Orgânica (% p/v de Extrato de Levedura, mg/L de Ergosterol e % v/v Tween 80).

As estimativas dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (QP) encontram-se na Tabela 5.22, onde se pode verificar que o efeito principal do fator suplementação orgânica [FSO] não apresentou significância estatística ao nível de 95 % de confiança. Além disso, a interação entre este fator e o fator suplementação inorgânica ([FSI].[FSO]) também não foi significativa a 95 % de confiança. Pode-se observar ainda na Tabela 5.22 que o efeito principal do fator suplementação inorgânica [FSI] foi o único termo que apresentou significância estatística ($p < 0,05$), sendo ainda este efeito positivo. Deste modo, quando se passou do nível -1 para o nível +1 a (Qp) aumentou em média 0,03 unidades de Qp.

Tabela 5.22. Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (Qp) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com dois ensaios de ponto central.

Fatores de interação	Estimativas	Erros-padrão	T	P
Média	0,656667	0,001667	394,0000	0,000006*
[FSI]	0,030000	0,004082	7,3485	0,018019*
[FSO]	0,000000	0,004082	0,0000	1,000000
[FSI] [FSO]	0,000000	0,004082	0,0000	1,000000

*Significativo ao nível de 95% de confiança.

Verificando-se que somente o fator suplementação inorgânica [FSI] apresentou efeito significativo, apresentando MS residual= 0,0000167, $R^2 = 0,96429$ e R ajustado= 0,91071, ignorou-se os fatores não significativos a fim de se melhorar estes coeficientes de determinação. A Tabela 5.23 demonstra a estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (Qp) com os efeitos não significativos ignorados. Observa-se que esta análise resultou na melhora do MS residual (0,0000083) e do coeficiente de determinação R ajustado (0,95536), mantendo o valor de R^2 .

Tabela 5.23. Estimativa do efeito significativo, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (Qp) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com dois ensaios de ponto central.

Fatores de interação	Estimativas	Erros-padrão	T	P
Média	0,656667	0,001179	557,2001	0,000000*
[FSI]	0,030000	0,002887	10,3923	0,000489*

*Significativo ao nível de 95 % de confiança.

Uma vez que a suplementação inorgânica apresentou um efeito positivo, significa que uma maior adição de $MgSO_4$ no mosto com adjunto de banana durante o processo fermentativo, favoreceu a produtividade volumétrica em etanol. Rees; Stewart (1997a) avaliaram os efeitos da adição dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} no desempenho de leveduras *ale* (*S. cerevisiae*) e leveduras *lager* [*S. uvarum (carlsbergensis)*] em mostos de alta densidade convencionais (20 °P) e observaram que em todas as cepas empregadas, o aumento na proporção do magnésio em relação ao cálcio proporcionou uma elevação no fator de conversão, na produtividade volumétrica em etanol e na vitalidade no fim da fermentação. No caso específico das cepas *lager*, verificou-se que, aumentando a proporção de cálcio em relação ao magnésio, houve um decréscimo na velocidade inicial de fermentação e um acréscimo no tempo de atenuação do mosto. Eles notaram também que o aumento dessa relação (Ca^{2+} / Mg^{2+}) conduziu a uma diminuição na produção de etanol e no consumo de maltotriose. Especificamente nas cepas *lager*, o consumo de maltose foi adversamente afetado nestas condições. Estes autores verificaram que estas alterações nos níveis de cálcio e magnésio não afetaram a viabilidade das leveduras, nem os níveis de glicogênio.

Na seqüência foi feita uma análise de regressão múltipla para estimativa dos coeficientes que compõe o modelo matemático representativo de (Qp). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.24.

Tabela 5.24. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^2 com dois ensaios de ponto central.

Variáveis independentes	Parâmetros	Coeficientes	Erros-padrão	T	P
Constante	Constante	0,656667	0,001667	394,0000	0,000006*
[FSI]	SI	0,015000	0,002041	7,3485	0,018019*
[FSO]	SO	0,000000	0,002041	0,0000	1,000000
[FSI] [FSO]	SI.SO	0,000000	0,002041	0,0000	1,000000

$R^2 = 0,96429$ e R ajustado $= 0,91071$,

*Significativo ao nível de 95% de confiança.

Na análise de regressão múltipla também se ignorou os fatores não significativos a fim de se melhorar estes coeficientes de determinação. A Tabela 5.25 demonstra os coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a (QP) com os efeitos não significativos ignorados. Observa-se que esta análise resultou também na melhora do coeficiente de determinação R ajustado (0,95536), mantendo o valor de R^2 .

Tabela 5.25. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^2 com dois ensaios de ponto central.

Variável independente	Parâmetros	Coeficientes	Erros-padrão	T	P
Constante	Constante	0,656667	0,001667	394,0000	0,000006*
[FSI]	SI	0,015000	0,001443	10,3923	0,000484*

$R^2 = 0,96429$ e R ajustado $= 0,95536$,

*Significativo ao nível de 95 % de confiança.

Com base nos dados obtidos na Tabela 8, a equação de um modelo linear proposta para descrever a produtividade volumétrica em etanol (Q_p), na região em estudo foi:

$$Q_p = 0,656667 + 0,015000SI$$

Onde:

Q_p - é a produtividade volumétrica em etanol, (g/L.h).

SI - Valor codificado da variável suplementação inorgânica.

Este modelo linear é um modelo matemático simples, do tipo ($y = ax + b$) e demonstra uma produtividade volumétrica em etanol crescente dentro da região estudada. Como somente o fator suplementação inorgânica (SI) foi significativo, uma sequência *não estatística* foi desenvolvida a fim de se otimizar esta produtividade. Isto pôde ser feito através da adição ao mosto de valores em mg/L de MgSO_4 superiores ao máximo do estabelecido no planejamento estatístico.

5.4.1. Otimização da Produtividade Volumétrica em Etanol (Q_p) no Mosto Fermentado após Suplementação Nutricional

A otimização (de forma não estatística) da *Produtividade Volumétrica em Etanol* (Q_p) no instante ($t = 64$ h) pela adição de (Mg^{2+}) no tempo inicial de fermentação pode ser observada na Figura 5.8. Investigou-se a Q_p em função desta adição (MgSO_4), levando-se em consideração não só os principais níveis do planejamento [$(-1) = 60$; $(0) = 210$; $(+1) = 360$ mg] como também as adições crescentes deste sal em cinco fermentações ($F1 = 420$; $F2 = 480$; $F3 = 540$; $F4 = 600$; $F5 = 660$ mg/L), com mais uma fermentação controle, ou seja, sem adição do sal ($FC = 0$ mg/L).

Figura 5.8. Otimização da Produtividade Volumétrica em Etanol em função da Adição do Nutriente MgSO_4 (■) nas fermentações em mini-bioreatores cilíndricos.

Num primeiro estudo, verificamos que nenhum grau de polinômio se ajustou coerentemente a esta curva, descartando a análise para a previsão do ponto ótimo por uma equação polinomial de uma ordem n qualquer. Visualmente podemos verificar que o melhor ponto (“ótimo”) é encontrado quando se adiciona 420 mg/L de MgSO_4 no tempo inicial da fermentação. Observa-se na Figura 5.8, que quando a adição do sal é aumentada de 0 (FC = 0 mg) para 420 mg/L de MgSO_4 (F1 = 420 mg de MgSO_4) no mosto, a produtividade volumétrica em etanol (Q_p) aumenta em 0,68 g/L.h. Ou seja, quando se atinge o instante $t = 64$ h, a Q_p nesta condição, alcança 0,68 g/L.h. Após este valor de adição (420 mg/L ou 3,5 mM), pode-se verificar no mesmo gráfico que valores superiores em mg de MgSO_4 começam a influenciar a fermentação resultando na queda brusca dos valores de Q_p . Isto pode ter ocorrido pelo fato de que estas adições somadas à quantidade de íons Mg^{2+} já existentes provenientes do malte (EDNEY *et al.*, 2007) e da banana (BLEINROTH, 1985), ter inibido a fermentação alcoólica por ter ultrapassado demasiadamente a quantidade requerida pela levedura e/ou aumentado a pressão osmótica do meio. De acordo com Walker (2000), a concentração ótima de cátion magnésio para estimular o crescimento de leveduras se situa na faixa de 2 - 4 mM. Este mesmo autor relata que o magnésio é um requisito absoluto para a levedura crescer e está presente nas células em torno de 0,3% do seu peso seco (representando concentrações dentro de células na faixa de mM) desempenhando funções estruturais e metabólicas essenciais. Por exemplo, as enzimas de transfosforilação tem uma estrita dependência dos íons Mg^{2+} (exemplo: na síntese de ATP), como também, as enzimas envolvidas na síntese, expressão e tradução da informação genética. Os níveis de Mg^{2+} nas células de levedura variam com as condições de crescimento e com o ciclo das fases celulares.

Pode-se verificar ainda que, ao se comparar a fermentação (F1) com a (F2) nota-se que um acréscimo de 60 mg/L de MgSO_4 faz a produtividade volumétrica em etanol, aumentar em 0,04 unidades de Q_p .

5.5.1.1. Análise da Produção de Etanol e do Consumo de Açúcares no Ponto Ótimo

A Figura 5.9 demonstra as principais características da fermentação do Ponto Ótimo no mini-bioreator cilíndrico tais como o consumo de extrato aparente e a produção de etanol pela levedura.

Figura 5.9. Consumo de Extrato Aparente (●) e Produção de Etanol (■), pela Levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.

Nessa figura, pode-se observar duas etapas distintas: uma primeira etapa até o tempo de 8h, onde a levedura consumiu uma quantidade muito pequena de extrato aparente (3,07 g/L) produzindo apenas 1,21 % do etanol total, e uma segunda etapa após 8 h, onde a produção de etanol esteve profundamente relacionada com o consumo de substrato. Na primeira etapa observa-se uma fase lag muito curta com uma concentração inicial de açúcares muito elevada 176,40 g/L. A duração dessa fase varia principalmente com a concentração do inoculo, ou seja, com a concentração celular inicial, com a idade do microrganismo e com o seu estado fisiológico (HISS, 2001). Estando o mosto com banana aerado nesta fase, pode-se explicar o surgimento do etanol pelo o *efeito Crabtree*. Já foi observado que *S. cerevisiae*, em presença de elevada concentração de glicose mesmo em condições estritamente aeróbias, possui metabolismo do tipo respiro-fermentativo. Esse comportamento metabólico é provocado por este efeito conhecido como *efeito Crabtree*. Esse efeito se pronuncia em condições onde a concentração de glicose ultrapassa um valor limite. O mecanismo responsável pela repressão catabólica pode ser bastante complexo, mas estudos mostram que ocorre principalmente através do forte efeito repressivo da glicose sobre a atividade de enzimas respiratórias e também, possivelmente, pela inibição da expressão genética de enzimas constituintes da via respiratória, fazendo com que parte do piruvato

que não pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs, seja reduzido a etanol pelo processo fermentativo (BAKKER *et al.*, 2001).

Analisando a Figura 5.10, verifica-se um aumento da produtividade volumétrica e do rendimento em etanol em função do tempo de fermentação do mosto com banana. Um comportamento similar foi encontrado por Marc *et al.* (1983). Segundo estes autores, o aumento do rendimento em etanol durante a fermentação, resulta da diminuição do rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$). O fator que também pode influenciar na diminuição deste ($Y_{x/s}$) é a manutenção celular, ou seja, além do substrato estar sendo utilizado na formação dos produtos de fermentação, ele também é destinado ao desempenho de funções vitais que compreendem o trabalho osmótico para manter os gradientes de concentração de substâncias entre o interior da célula e o seu meio ambiente, as modificações de componentes celulares que requeiram energia e a mobilidade celular (MARC *et al.*, 1983). De acordo com Hiss (2001), dificilmente são observados valores constantes dos fatores de conversão, em fermentações industriais. Estas observações também puderam ser evidenciadas nestes ensaios laboratoriais utilizando mini-bioreatores cilíndricos.

A produtividade volumétrica em etanol na fermentação do mosto de alta densidade com adjunto de banana atingiu um valor máximo de 0,68 g/L.h, a partir do tempo de 64 h. O rendimento aparente em etanol foi máximo neste mesmo tempo, alcançando o valor de 0,45 g/g. Este resultado foi superior ao rendimento em etanol, próximo de 0,40 g/g, obtido por Dragone, (2002), na fermentação conduzida em fermentadores cilindro-cônicos de 180 L com volume útil de 140 L, utilizando mostos de 17,50 °P, fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* lager à 12,5 °C.

Figura 5.10. Produtividade Volumétrica (□) e Rendimento em Etanol (■), pela Levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.

Panchal; Stewart (1980) observaram que o aumento da pressão osmótica (devido a elevada concentração inicial de substrato) diminuiu o rendimento em etanol. Esse efeito foi causado por três motivos diferentes: a) outros compostos de carbono foram produzidos além do etanol e do CO₂, b) o etanol permaneceu dentro da célula e c) o etanol foi oxidado rapidamente para acetato. Utilizando um meio com 10 % p/v de sacarose e 30 % p/v de sorbitol (açúcar não metabolizado pela levedura), como uma concentração inicial de inoculo de 5 g/L, observaram que no tempo de 24 h de fermentação, a maior parte do etanol era intracelular. Porém, após 73 h de fermentação, menos de 5 % do etanol total produzido era localizado dentro da célula. De acordo com esses autores, a concentração relativa de glicerol interno e externo, variou de maneira similar à do etanol. Entretanto, a concentração intracelular de glicerol foi geralmente menor do que a concentração extracelular, indicando que o glicerol foi excretado da célula mais rapidamente que o etanol. Sem a adição de sorbitol no meio, a concentração total de glicerol permaneceu constante, mas com o aumento da concentração de sorbitol (aumento da pressão osmótica), a quantidade de glicerol produzido aumentou consideravelmente durante a fermentação.

Na Figura 5.11, verifica-se o aumento da produção de glicerol durante a fermentação correspondente ao ensaio ótimo. A elevada concentração de glicerol pelo desvio do metabolismo dos açúcares nesse ensaio pode demonstrar que um melhor rendimento aparente em etanol poderia ser alcançado.

Figura 5.11. Produção de Glicerol (▼), pela Levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.

A formação do glicerol, o mais abundante dos compostos orgânicos secundários da fermentação, está acoplada à manutenção do equilíbrio redox celular, o qual é alterado quando da formação de ácidos orgânicos, biomassa e da presença de sulfito no mosto. A formação de glicerol também está relacionada a uma resposta ao estresse osmótico, quando de concentrações elevadas de açúcares ou de sais no mosto (ALMEIDA LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; WALKER, 2000). Segundo Berry (1989), este comportamento é associado com diminuições no rendimento em biomassa e em etanol, nas condições aeróbias. Na Figura 5.12, verifica-se também nas primeiras 8 h de fermentação uma elevada conversão de açúcares fermentáveis em glicerol, onde foi detectada uma presença mínima de etanol (0,56 g/L). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* responde à diminuição do valor de atividade da água do meio, sintetizando glicerol, para tentar diminuir a diferença de pressão osmótica que sofre a membrana plasmática (ROSE, 1987; WALKER, 2000).

Outra característica ligada ao consumo do substrato e a formação de produtos é a queda gradual da densidade do mosto com banana no decorrer da fermentação (Figura 5.13). Este fenômeno está inteiramente associado tanto ao consumo do substrato para a construção e manutenção celular como na formação de produtos menos densos e/ou voláteis. Um bom exemplo é a formação de CO_2 que provém da fermentação dos açúcares. Uma parte deste gás fica solúvel e outra deixa o mosto. Sabe-se que em concentrações apreciáveis no bioreator, o CO_2 inibe a fermentação. Este composto é recolhido da parte superior do reator e podendo ser reutilizado mais tarde com a finalidade de carbonatação da cerveja nas etapas finais (CARVALHO *et al.*, 2009).

Figura 5.12. Rendimento em Glicerol (▼), pela Levedura *S. cerevisiae* 308 tipo lager, durante a fermentação do mosto com banana a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.

A Figura 5.13 também demonstra as diferentes fases do crescimento da levedura, durante a fermentação do mosto com banana de 17,50 °P a 15 °C. Nas primeiras 8h de fermentação, observa-se uma fase de latência ou fase lag, que se segue imediatamente após a inoculação do meio com a levedura. Trata-se de um período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. Esta fase é acrescida de um período de transição das 8 às 32 h em que se observa o início da reprodução microbiana propriamente dita. Assim, há um aumento gradual tanto da velocidade de reprodução como da velocidade específica de crescimento. No

fim desse período, a população inteira de leveduras começa a se dividir em um intervalo regular médio de tempo (HISS, 2001).

O período entre as 32 e 50 h de fermentação (Figura 5.13) apresenta um rápido crescimento celular, correspondente a fase logarítmica ou exponencial. Durante este intervalo de tempo, a velocidade específica de crescimento é constante e máxima (HISS, 2001). Ao lado da velocidade específica de crescimento, a fase exponencial também é caracterizada pelo tempo de geração, que é o intervalo de tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular. Aplicando-se a equação ($t_g = 0,693 / \mu_{xMáx}$), pode-se obter o tempo de geração.

O progressivo aumento na concentração das células em suspensão foi interrompido após 50 h horas de fermentação do mosto com banana. Pode-se observar então um período estacionário das 50 às 53 h, conhecido como fase estacionária. Nessa fase, a concentração de leveduras atinge o valor máximo e constante (3,13 g/L), onde há um balanço entre a velocidade de crescimento e a velocidade de morte da levedura, ocorrendo também modificações bioquímicas na célula.

Figura 5.13. Células Totais em Suspensão (■), da levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, e Densidade do mosto com banana (◇) durante a fermentação a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.

Após as 53 h de fermentação do mosto com banana, observou-se uma queda gradual da concentração das leveduras em suspensão com o decorrer do tempo. Esta fase é denominada fase

morte, declínio ou lise celular. Nesta fase o valor da concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de formação de novas leveduras. Ocorre durante o declínio uma lise celular, autólise ou rompimento das leveduras, provocado pela ação de enzimas intracelulares. Nesta fase ocorre a floculação das leveduras no mosto cervejeiro e esta floculação tem início quando a glicose é removida do meio (ENGASSER, 1981).

5.5.1.2. Análise das Velocidades de Transformação no Ponto Ótimo

A Figura 5.14 representa a variação das velocidades específicas de crescimento das células em suspensão, consumo de “açúcares totais” na forma de extrato aparente e produção de etanol, em função do tempo para as condições do ponto ótimo estabelecido. As velocidades foram calculadas a partir dos dados ajustados das concentrações, utilizando o método geométrico de cálculo de derivadas proposto por Le Duy; Zajic (1973). Pode-se observar que as velocidades específicas de consumo de açúcar (μ_s) e produção de etanol (μ_p), apresentam perfis semelhantes, correlacionando-se assim muito bem. A velocidade específica de crescimento (μ_x) da levedura apresenta, aproximadamente, o andamento das outras duas curvas. Assim a produção do etanol, o metabólito primário, está associada ao crescimento.

Com esta figura, utilizando a velocidade específica máxima de crescimento das células em suspensão em mosto com banana ($0,039 \text{ h}^{-1}$), pode-se calcular o já citado tempo de geração da levedura ($t_g = 0,693 / \mu_{x\text{Máx}} = 17,77 \text{ h}$).

Observa-se também na Figura 5.14 para esta fermentação que, μ_x , μ_s e μ_p atingiram os seus valores máximos ($0,038 \text{ h}^{-1}$; $1,035 \text{ g/g.h}$ e $0,522 \text{ g/g.h}$) nos tempos de (31,8; 32,4 e 30,8 h), respectivamente.

Figura 5.14. Velocidades Específicas de Crescimento de Células em Suspensão ($\blacktriangle \mu_x$), Consumo de Extrato Aparente ($\circ \mu_s$) e Produção de Etanol ($\square \mu_p$), na fermentação do mosto com banana a 17,50 °P e 15 °C, no ponto otimizado da adição de nutriente.

5.5. Reprodução do Ponto Otimizado das Fermentações nos Mini-bioreatores de 0,9 L para Bioreator de 180 L na Planta Piloto

Após a realização dos experimentos nos mini-bioreatores cilíndricos no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (DEB - UMinho) – Portugal, reproduziu-se em escala piloto na EEL – USP, o ponto otimizado destes experimentos (item 5.4; subitem 5.4.1).

Os principais constituintes monitorados durante as fermentações primária e secundária (maturação) do mosto com banana suplementado com $MgSO_4$, encontram-se na Tabela 5.26.

Tabela 5.26. Principais variantes e constituintes da cerveja com banana no ensaio otimizado (reproduzido na planta piloto) nos diferentes tempos da fermentação e maturação.

Constituintes	T inicial	32 h	64 h	128 h	176 h
	Fermentação			Maturação	
Acetaldeído, mg/L	30,00	26,25	36,25	33,75	30,75
Acetato de Etila, mg/L	< 12,50	18,75	25,00	21,25	22,50
Acetato de Isoamila, mg/L	< 0,63	< 0,63	1,75	1,63	1,75
Hexanoato de Etila, mg/L	8,50	6,25	4,88	4,13	< 0,63
N-Propanol mg/L	< 25,00	< 25,00	33,75	< 25,00	< 25,00
Isobutanol, mg/L	< 25,00	28,75	30,00	< 25,00	27,50
Alcoóis Amílicos*, mg/L	120,00	139,00	445,00	442,50	154,25
Alcoóis Superiores Totais, mg/L	150,00	733,75	101,75	442,5	157,75
Dimetilssulfureto (DMS), mg/L	< 0,075	< 0,075	< 0,075	< 0,075	< 0,075
Diacetil (2,3-Butanodiona), mg/L	1,14	1,15	2,66	1,6	1,25
Dicetonas Vicinais Totais, mg/L	1,19	1,46	3,71	2,19	1,69
Potássio (K), mg/L	912,87	898,49	851,37	858,93	848,68
Cálcio (Ca), mg/L	16,64	17,16	17,20	16,42	16,13
Magnésio (Mg), mg/L	235,00	238,75	235,62	224,06	229,37
Sódio (Na), mg/L	107,84	118,41	111,78	112,97	106,22
Ferro (Fe), mg/L	1,91	1,31	< 0,12	2,78	1,64
Cobre (Cu), mg/L	< 0,07	< 0,07	< 0,07	< 0,07	< 0,07
Extrato Aparente, °P	17,5	11,24	5,52	5,19	4,57
Grau aparente de fermentação, %	0,00	26,39	66,47	68,77	72,40
Etanol, % v/v	0,00	2,30	6,04	6,30	7,00
Células Viáveis, Cél/mL	3,2x10 ⁷	10,4 x10 ⁷	5,7x10 ⁷	1,7x10 ⁷	1,4x10 ⁷
Células Não Viáveis, Cél/mL	0,05x10 ⁷	0,05x10 ⁷	0,15x10 ⁷	0,3x10 ⁷	0,1x10 ⁷
Células Totais, Cél/mL	3,25x10 ⁷	10,45x10 ⁷	5,85x10 ⁷	2,0x10 ⁷	1,5x10 ⁷
pH	4,90	4,40	4,20	4,30	4,40

*Álcoois Amílico + Isoamílico.

Na sequência, após a maturação e acabamentos, diluiu-se esta cerveja obtida a partir de mosto de alta densidade (17,5 °P), para valores de uma cerveja Pilsen comum (de 7,00 % v/v para 4,8 % v/v de etanol). Esta diluição foi feita com água carbonatada no mesmo pH da cerveja. A Tabela 5.27 demonstra as características da cerveja com banana (4,8 % v/v) e de algumas cervejas *lager* tipo Pilsen do mercado.

Tabela 5.27. Caracterização da Cerveja com Banana após diluição e comparação com cervejas do mercado.

Constituintes	Cerveja com Banana	Cervejas do Mercado
Acetaldeído, mg/L	29,00	20,00**
Acetato de Etila, mg/L	15,39	32,00**
Acetato de Isoamila, mg/L	1,20	0,30**
Hexanoato de Etila, mg/L	< 0,43	0,2***
N-Propanol, mg/L	< 17,11	9,00**
Isobutanol, mg/L	18,82	20,00**
Alcoóis Amílicos, mg/L	105,96	135***
Alcoóis Superiores Totais, mg/L	107,78	150**
Dimetilssulfureto (DMS), mg/L	< 0,05	< 0,09***
Diacetil (2,3-Butanodiona), mg/L	0,20	0,10**
Dicetonas Vicinais Totais, mg/L	0,89	0,06**
Potássio (K), mg/L	600,68	200,00*
Cálcio (Ca), mg/L	11,04	56,00*
Magnésio (Mg), mg/L	156,94	60,00*
Sódio (Na), mg/L	72,68	80,00*
Ferro (Fe), mg/L	1,12	< 0,10*
Cobre (Cu), mg/L	< 0,05	< 0,16*
Extrato Aparente, °P	3,13	2,50*
Etanol, % v/v	4,8	3,90*
pH	4,2	4,20*

Composição física e química de cervejas de baixa fermentação do mercado de acordo com: (Broderick, 1977)*; (Cruz, 2007)**; (Carvalho *et al.*, 2009)***.

Nesta tabela (5.27) pode-se observar que a cerveja com banana possui elevados teores de acetaldeído e de diacetil (2,3-butanodiona), em relação às cervejas do mercado. O acetaldeído confere a cerveja um *flavour* de “amônia”, já o diacetil confere um *flavour* de manteiga rançosa (CARVALHO; ROSSI; ALMEIDA e SILVA, 2007). Em contrapartida, a cerveja com banana apresentou uma concentração de dimetilssulfureto (DMS) muito baixa, o que é benéfico ao *flavour*, e uma concentração de acetato de isoamila, superior ao da cerveja do mercado.

Outra característica peculiar da cerveja com banana é a elevadíssima concentração de potássio (K) nesta cerveja (580,68 mg/L) em relação às cervejas do mercado (200,00 mg/L), ou seja, três vezes mais potássio. Esta cerveja apresenta também um baixo teor de sódio (72,68 mg/L).

A cerveja com banana do tipo *lager* obtida após a diluição e filtração pode ser observada na Figura 5.15.

Figura 5.15. Cerveja com banana do tipo *lager* com teor alcoólico de 4,8 % v/v.

5.6. Análise Sensorial das Cervejas Otimizadas Produzidas na Planta Piloto

O ensaio de otimização realizado na planta piloto da Microcervejaria da EEL – USP (item 5.2), bem como a reprodução nesta planta piloto do ensaio otimizado na Uminho - Portugal com o mosto de alta densidade suplementado (itêm 5.5), foram avaliados sensorialmente através de testes de consumidor. Para isto realizou-se testes de preferência do tipo comparação pareada, e testes de aceitação com escala hedônica estruturada de nove pontos. Nestes testes foram avaliadas apenas a preferência e aceitação global, ou seja, foi avaliada a cerveja como um todo.

Realizaram-se os testes com 50 consumidores de acordo com o item 4.9. As amostras foram codificadas com numeração de três dígitos, escolhidos ao acaso, de forma a não influenciar os

julgadores. Assim, somente os apresentadores das amostras sabiam identificar se as amostras eram as experimentais (Teste 1 ou Teste 2) ou as do mercado (M1 ou M2).

Na realização dos testes de preferência do tipo comparação pareada, observou-se que para a cerveja com banana otimizada obtida da fermentação a 12 °P e 15 °C (Teste 1), 35 dos 50 consumidores preferiram esta cerveja em relação à do mercado. Já para a cerveja com banana otimizada (pela suplementação do mosto com Mg^{2+} na forma de sulfato) obtida da fermentação a 17,5 °P e 15 °C e diluída (Teste 2), 33 dos 50 consumidores preferiram esta cerveja em relação à do mercado. A interpretação destes resultados foi baseada no número de julgamentos totais em relação ao número de julgamentos corretos ou concordantes. Ou seja, se o número de julgamentos corretos ou concordantes for superior ou igual ao valor tabelado, pode-se concluir que existe preferência entre as amostras ao nível de significância observado. Assim, pôde-se verificar que a amostra experimental do Teste 1, foi preferida em relação a do mercado no nível de significância de 1 %. Já a amostra experimental do Teste 2 foi significativamente preferida em relação a do mercado em nível de 4 % de probabilidade. Concluiu-se que as amostras experimentais otimizadas de cerveja com banana foram estatisticamente preferidas em relação às amostras do mercado.

Os testes de aceitação foram realizados com o objetivo de avaliar se os consumidores gostaram ou desgostaram da cerveja com banana. Para isso, utilizou-se uma escala hedônica estruturada. Os consumidores receberam as amostras codificadas, com números de três dígitos, e foram solicitados a avaliar os seus sentimentos com relação a cada amostra de cerveja. Os resultados da escala hedônica foram determinados por meio de análise de variância (ANOVA), que considera conjuntamente as avaliações de todos os consumidores e assume que todos apresentam o mesmo comportamento, desconsiderando suas individualidades. Ou seja, a ANOVA leva em consideração a média do grupo de consumidores que testaram as amostras de cerveja. Os resultados das análises de variância com os testes de F para a determinação da aceitação das amostras experimentais Teste 1 e Teste 2 assim como as do mercado, se encontram nas tabelas 5.28 e 5.29.

Tabela 5.28. Resumo da ANOVA dos resultados do teste de aceitação para as amostras de cerveja do mercado e o Teste 1.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F calculado
Amostra (A)	1	7,84	7,84	1,54*
Julgadores (J)	49	68,24	1,39	0,27
Resíduo (R)	49	250,16	5,10	-
Total	99	326,24	-	-

*Não significativo a 5 % da significância (F calculado < F tabelado); F tabelado = 4,03.

Pôde-se observar que o grupo de teste sensorial que avaliou a cerveja Teste 1, manifestou sua aceitação média na escala hedônica entre “gostei muito” e “gostei moderadamente”, e a cerveja do mercado teve sua aceitação entre “gostei moderadamente” e “gostei ligeiramente”. Já, o grupo de julgadores que avaliou a cerveja Teste 2 manifestou sua aceitação em “gostei moderadamente”, ficando a cerveja do mercado novamente com a aceitação entre “gostei moderadamente” e “gostei ligeiramente”.

Tabela 5.29. Resumo da ANOVA dos resultados do teste de aceitação para as amostras de cerveja do mercado e o Teste 2.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F calculado
Amostra (A)	1	5,76	5,76	1,28*
Julgadores (J)	49	66,24	1,352	0,30
Resíduo (R)	49	220,24	4,495	-
Total	99	292,24	-	-

*Não significativo a 5 % da significância (F calculado < F tabelado); F tabelado = 4,03.

Após análise estatística realizada em cada grupo de teste sensorial, e estando os valores obtidos entre as amostras muito próximos entre si, foi verificado que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) quanto ao grau de aceitação entre os produtos correspondentes às amostras experimentais otimizadas e as amostras do mercado. Ou seja, as amostras de cerveja com banana foram tão aceitas pelo consumidor quanto às amostras de cerveja do mercado. Tudo isto demonstra que é sensorialmente viável produzir as cervejas com banana, tanto elaboradas com mostos convencionais como elaboradas com mosto de alta densidade (de 17,5 °P).

5.7. Análise Preliminar da Viabilidade Econômica do Processo

A análise preliminar da viabilidade econômica foi realizada segundo os fatores que mais influenciam a produção de cerveja com banana a partir de mosto de alta densidade (17,5 °P): consumo de matérias-primas, equipamentos fundamentais, produtos químicos e custos fixos para a produção de cerveja madura filtrada ou chope filtrado de banana tipo *lager*.

Para o cálculo foram utilizadas as facilidades auxiliares existentes no Departamento de Biotecnologia / USP - EEL, tais como: ar comprimido, gás propano encanado, cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) e a linhagem de levedura cervejeira (*S. cerevisiae* 308 de baixa fermentação).

5.7.1. Base do Estudo Preliminar

A análise preliminar de viabilidade econômica a seguir foi realizada para a produção de cerveja com banana (875 L / mês) executada a partir de fermentadores, ou bioreatores de 250 L. Para isto foram analisadas cada etapa do bioprocessos, desde a chegada do malte e da banana até o envase do chope.

5.7.2. Custo de Investimento Inicial

A Tabela 5.30 apresenta o orçamento e a quantidade dos equipamentos fundamentais utilizados desde a caracterização das matérias-primas, obtenção da cerveja e posterior envase em barris; com isso foi calculado o custo para investimento inicial.

No levantamento do orçamento levou-se em consideração a vantagem da compra de uma planta (Microcervejaria Mec Bier*) com os seguintes equipamentos: uma plataforma; painel de comando; gerador de água quente, tanque de mosturação / cozimento / whirlpool de 250 L; tanque de filtração de 250 L; unidade de resfriamento de 250 L/h; aerador de mosto, bomba trasfega, dois tanques de fermentação / maturação de 250 L; conjunto de refrigeração do mosto; conjunto de refrigeração dos tanques, máquina de envasar em barris; filtro de placas horizontais com cartucho de terra diatomácea e um moinho de rolos.

5.30. Orçamento dos equipamentos utilizados na produção de cerveja com banana.

Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Alcolyzer Plus Beer	Unid.	1	125.000,00	125.000,00 ¹
Autoclave vertical	Unid.	1	3.300,00	3.300,00 ²
Balança analítica	Unid.	1	3.240,00	3.240,00 ²
Bancada de fluxo laminar	Unid.	1	31.315,00	31.315,00 ²
Barril de 50 L	Unid.	17	250,00	4.250,00 ⁴
Bomba de vácuo e ar comprimido	Unid.	1	1.250,00	1.250,00 ²
Centrífuga “Sharples”	Unid.	1	11.220,00	11.220,00 ²
Espectrofotômetro	Unid.	1	29.250,00	29.250,00 ²
Estufa de esterilização e secagem	Unid.	1	1.250,00	1.250,00 ²
Estufa para cultura microbiológica	Unid.	1	2.390,00	2.390,00 ²
Forno tipo mufla	Unid.	1	4.570,00	4.570,00 ²
Incubadora de bancada “shacker”	Unid.	1	8.900,00	8.900,00 ²
Liquidificador Industrial	Unid.	1	107,00	107,00 ¹
Microcervejaria Mec Bier*	Unid.	1	134.478,00	134.478,00 ³
pHmetro	Unid.	1	990,00	990,00 ²
Refratômetro Portátil	Unid.	1	570,00	570,00 ²
Refrigerador	Unid.	2	1.250,00	2.500,00 ²
Custo de Investimento Inicial				364.580,00

Fontes de Cotação: 1. Polimate (2009); 2. Cândido (2008); 3. Mec Bier - Harmo e Darin Indústria e Comércio Ltda (2009); Germânia – Lorena / SP (2009).

5.7.3. Custo de Produção da Cerveja com Banana

De acordo com Cândido (2008), os custos de produção são aqueles que ocorrem na fabricação do produto final e são classificados em: Custos diretos variáveis e custos diretos fixos.

a) Custos diretos variáveis: são aqueles que variam de acordo com a quantidade produzida, sendo os principais na produção de cerveja com banana os que seguem:

- Matérias-primas e materiais auxiliares,
- Consumo de energia elétrica no processo produtivo,
- Água industrial,

b) Custos diretos fixos: são aqueles que normalmente não variam proporcionalmente à produção, sendo os principais para esse bioprocessos os que seguem:

- Manutenção, depreciação e impostos.
- Mão de obra.

Considere-se como base de cálculo um mês de produção equivalente a 24 dias de trabalho, com 4 fermentações / maturações descontínuas, ocorrendo de duas em duas simultaneamente. Os cálculos das matérias-primas levam em consideração a produção de cerveja a 600 L / mês de cerveja com teor alcoólico de 7,00 % v/v, onde após a diluição alcança a produção de 875 L / mês desta cerveja, numa graduação alcoólica de 4,8 % v/v.

O esquema apresentado de produção de cerveja com banana (4,8 % v/v), a partir de mosto de alta densidade se estabelece da seguinte forma:

- Lavagem e assepsia dos tanques,
- Moagem do malte (105 Kg) e trituração da polpa da banana muito madura (175,5 Kg). Deve-se comprar 287,7 Kg de Banana, pois a razão entre a polpa e a banana com casca é de 0,61,
- Elaboração do suco de banana (com 525 L de água) deve levar em consideração a umidade da banana muito madura (~ 65,12 %) nos cálculos e redução da viscosidade do suco (com Pectinase Novozymes a 0,084 % v/p sobre o purê de banana),
- Brassagem com o suco de banana,
- Fermentação / maturação e análises para o controle de qualidade,
- Acabamentos e envase em barris.

Neste estudo preliminar econômico, é importante salientar que foi considerado no cálculo um turno de trabalho diário de oito horas com uma equipe de um especialista (engenheiro químico ou engenheiro bioquímico ou engenheiro de alimentos), um técnico e um auxiliar técnico. Além disso, para a estimativa do custo de produção mensal estabeleceu-se o gasto com cada etapa do processo conforme mostrado na Tabela 5.31, sendo os valores expressos em reais. A quantidade de energia calculada foi baseada no estudo de Prado *et al.*, 2008, que estabeleceram um gasto de 0,1113 KW.h de energia elétrica para a produção de cada litro de cerveja elaborada a partir de mosto de alta densidade com 18,8 °P.

Tabela 5.31. Custo direto variável relacionado à produção de cerveja com banana a partir de mosto de 17,5 °P.

Tabela 0.07: Custo direto variável relacionado à produção de cerveja com banana a partir do mosto de H₂O¹.

1ª Fase: Limpeza e Assepsia da Planta				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Água de Lavagem ¹	L	3000	0,0022	2,20
Divostar 4 (a base de Hidróxido de Sódio) ²	L	5	27,53	137,65
Divosan Forte (a base de Ácido Paracético) ²	L	1	33,98	33,98
				Subtotal: 173,83
2ª Fase: Moagem do Malte e Trituração das Bananas				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Malte tipo Pilsen ³	Kg	105	2,73	286,27
Bananas (com casca para a compra) ⁴	Kg	287,7	0,30	86,31
				Subtotal: 372,58
3ª Fase: Elaboração do Suco de Banana				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Enzima Pectinolítica Comercial (em Solução) ⁵	L	0,15	223,00	33,45
Bicarbonato de Amônio ⁶	Kg	0,08	9,24	0,74
Água Primária ¹	L	410,71	0,0022	0,90
				Subtotal: 35,09
4ª Fase: Brassagem Utilizando o Suco de Banana				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Iodo Ressublimado ⁶	Kg	4x10 ⁻⁶	163,20	0,0007
Cloreto de Cálcio . 2 H ₂ O ⁶	Kg	0,13	21,43	2,84
Ácido Lático (L-85 %) ⁶	L	0,07	17,25	1,19
Sulfato de Magnésio . 7 H ₂ O ⁷	Kg	0,25	15,60	3,93
Lúpulo em Extrato (com 30 % de Ácidos Alfa) ²	Kg	0,07	220,71	16,30
Lúpulo em Pellets HP (com 8,0 % de Ácidos Alfa) ²	Kg	0,63	146,41	92,66
Água Secundária ¹	L	244,15	0,0022	0,54
				Subtotal: 117,46
5ª Fase: Fermentação / Maturação e Análises (Físico-Químicas e Microbiológicas)				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Azul de Metileno ⁶	Kg	5,6x10 ⁻⁵	168,80	0,0095
Fosfato de Potássio Monobásico ⁶	Kg	0,0076	33,88	0,26
Fosfato de Sódio Bibásico . 12 H ₂ O ⁶	Kg	0,0013	21,34	0,03
Solução Tampão (4) ⁶	L	0,01	12,80	0,13
Solução Tampão (7) ⁶	L	0,01	12,80	0,13
				Subtotal: 0,56
6ª Fase: Acabamentos (Filtração e Envase)				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Terra Diatomácea (Diatomita Perfila) ⁶	Kg	6,02	8,31	50,03
Água de Diluição ¹	L	275,00	0,0022	0,61
				Subtotal: 50,64
Gasto com Energia Elétrica				
Serviço	Quantidade Mensal			Valor Total
Energia Elétrica (KW.h) ¹	267,12			71,53
				Subtotal: 71,53
TOTAL: R\$ 821,69				

Fontes de Cotação: 1. Cândido (2008); 2. Weconsultoria (2009); 3. Malteria do Vale (2009); 4. Emater de Cristina – MG (2009); 5. Novozymes (2009); 6. Synth (2009); 7. Caal LTDA (2009).

A Tabela 5.32 apresenta os custos em salários mensais, sendo os valores expressos em reais.

Tabela 5.32. Custo direto fixo: salários, encargos financeiros e depreciação.

Cargo	Quant.	Salário Básico¹	Encargos¹	Total
Engenheiro Químico	1	3.350,00	1.817,04	5.167,04
Técnico	1	840,00	455,62	1.295,62
Auxiliar Técnico	1	500,00	271,2	771,00
				TOTAL: R\$ 6.733,66

Fonte de Cotação: 1. Candido (2008).

Para estimar os custos diretos fez-se a somatória dos valores gastos com matérias-primas e materiais, serviços auxiliares e salários. Assim, tem-se: Custos Diretos: $821,69 + 6733,66 = \text{R\$ } 7.555,35$.

Os custos indiretos referem-se à depreciação, correspondente a um valor de 1 % mensal do valor referente aos equipamentos. Deste modo, Custos Indiretos: $364.580,00 * 1 \% = \text{R\$ } 3.645,80$.

Logo o custo de produção mensal de cerveja com banana é o somatório dos custos diretos e indiretos totalizando um valor de $\text{R\$ } 11.201,15$.

Como a estimativa da produção mensal de cerveja com banana é de 875 L, pode-se dizer que o valor da produção é de $\text{R\$ } 12,80 / \text{L}$ de cerveja.

De forma comparativa, o custo de cerveja com banana no primeiro mês de produção é 204,76 % maior de que de um chope de uma marca comercial conhecida. Segundo Cândido (2008), isto acontece devido aos gastos com investimentos iniciais referentes à compra e instalação de equipamentos. Este mesmo autor previu um cenário de seis anos para a obtenção do retorno esperado na elaboração de seu produto (um edulcorante biotecnológico).

O que se espera para a produção da cerveja com banana é um retorno do investimento e a geração de lucro num cenário de tempo menor visto que o custo direto variável de produção desta cerveja em microcervejaria é de $\text{R\$ } 0,94 / \text{L}$ contra $\text{R\$ } 1,10 / \text{L}$ de cerveja puro malte produzida também em microcervejaria nas mesmas condições de processo. Isto significa que é 14,55 % mais barato produzir a cerveja com adjunto de banana do que uma cerveja puro malte.

Para se prever o tempo de retorno e o lucro sobre o produto, deve-se fazer um estudo de viabilidade econômica mais apurado a partir destes resultados preliminares do estudo econômico-financeiro. Para isto é necessário estabelecer o fluxo de caixa com os valores de *pay-back* simples e o *pay-back* descontado, levando-se em consideração a taxa interna de retorno (TIR).

6. Conclusões

✓ Após a quantificação dos carboidratos presentes na banana prata em diferentes graus de maturação, pôde-se observar que a condição de maturação “muito-madura”, apresentou o mais alto teor de carboidratos totais solúveis (15,65 %) e o mais baixo teor de amido (0,48 %), o que beneficia a utilização desta fruta como adjunto do malte no processamento da cerveja com banana. Além do mais, esta condição de maturação não apresenta valor comercial.

✓ Os resultados obtidos no estudo da extração aquosa a quente dos sólidos solúveis da banana “muito-madura” com a metodologia de superfície de resposta foram provenientes de um modelo matemático empírico quadrático ($Y = 5.58 + 1.25 X_1 - 0.26 X_2 - 0.37 X_2^2$) para se obter a ótima condição de extração. Os valores que otimizaram esta extração (Y) foram 38,5 g de purê de banana (X_1) e tempo de extração de 39,7 minutos. Estes valores foram comparados com os valores previstos para o modelo matemático indicando que o mesmo ajusta os dados experimentais e descreve a região estudada. Além do mais, o ensaio realizado em um tanque de dimensão superior (105 L) demonstrou a eficiência e a possibilidade da implementação industrial deste processo.

✓ No estudo da otimização na planta piloto da EEL – USP, da fermentação do mosto com adjunto de banana em densidades convencionas (12 e 15 °P), observou-se que a 12 °P e a 15 °C obteve-se uma Qp de 0,58 g/L.h em 72 h de fermentação e apenas 6,07 % do açúcar metabolizado pela levedura cervejeira foi desviado para a geração de produtos secundários, garantindo um Yp/s real de 0,48 g/g que é bem próximo ao teórico (0,511), o que demonstrou a não necessidade de se gerar novo projeto fatorial com os valores das variáveis concentração e temperatura utilizadas neste estudo.

✓ Ao se estudar na planta piloto o comportamento cinético da levedura cervejeira *Saccharomyces cerevisiae* 308 de baixa fermentação (tipo *lager*) em mostos com banana de densidade convencional, observou o máximo valor de μ_x (0,114 h⁻¹) foi alcançado com a fermentação a 12 °P e 15 °C. Os valores máximos de μ_s e μ_p (1,128 e 0,585 g/g.h, respectivamente) foram conseguidos com a fermentação a 15

$^{\circ}\text{P}$ e 15°C . Estes resultados cinéticos possibilitam determinar novos parâmetros deste processo fermentativo.

✓ Na otimização da produtividade volumétrica em etanol (Q_p) em mostos de alta densidade ($17,5^{\circ}\text{P}$) fermentados após suplementação com diferentes nutrientes em mini-bioreatores cilíndricos de 0,9 L da Uminho – Portugal, observou-se que apenas a adição de MgSO_4 foi significativa estatisticamente para o aumento de Q_p . Observou-se também que o melhor valor de Q_p (0,68 g.L/h) foi alcançado em 64 h de fermentação após suplementação com 420 mg/L de MgSO_4 .

✓ Com a caracterização físico-química da cerveja obtida com a reprodução do experimento otimizado em mini-bioreator cilíndrico de 0,9 L da Uminho - Portugal no fermentador de 180 L da USP – Brasil, verificou-se que a cerveja com banana de 4,8 % v/v apresentou uma elevada concentração de potássio (600,68 mg/L) e de acetado de isoamila (1,20 mg/L) em relação as cervejas *lager* convencionais do mercado (200 e 0,30 mg/L respectivamente), tornando esta cerveja característica, aumentando a possibilidade de novas pesquisas com a mesma.

✓ Após a realização da análise sensorial das cervejas com banana obtidas nas condições otimizadas na planta piloto e comparação com cervejas do mercado brasileiro observou-se em relação aos testes de preferência, que as cervejas com banana foram estatisticamente preferidas em relação às amostras do mercado. Já os testes de aceitação demonstraram que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) quanto ao grau de aceitação entre os produtos correspondentes às amostras experimentais otimizadas e as amostras do mercado. Ou seja, as amostras de cerveja com banana foram tão aceitas pelo consumidor quanto às amostras de cerveja do mercado. Tudo isto demonstra que é sensorialmente viável produzir as cervejas com banana, tanto elaboradas com mostos convencionais como elaboradas com mosto de alta densidade.

✓ O estudo preliminar da viabilidade econômica de obtenção de chope com adjunto de banana (4,8 % v/v) demonstrou, dentro de uma estimativa de produção de 875 L/mês que o custo inicial é 204,76 % superior a de um chope comercial de uma marca conhecida no primeiro mês de produção. Isto ocorre devido a gastos com investimentos iniciais referentes a compra e instalação de equipamentos. O que se

espera para a produção deste chope é um retorno do investimento e a geração de lucro num cenário de tempo pequeno visto que o custo direto variável de produção em microcervejaria deste chope é de R\$ 0,94 / L contra R\$ 1,10 / L de chope puro malte produzido nas mesmas condições de processo.

Sugestões para Trabalhos Futuros

- ✓ Elaborar o suco de banana de forma separada e anteriormente a brassagem para só então adicionar o malte sobre o suco, com o propósito de se reduzir o tempo de filtração. Outra alternativa é utilizar um complexo enzimático rico em celulasas e hemicelulasas que seja viável economicamente, a fim de se reduzir a carga de materiais insolúveis de banana na tina de filtração, o que beneficia também o ganho do rendimento em carboidratos para o mosto.
- ✓ Realizar um estudo mais aprofundado da viabilidade econômica do processo a partir dos dados preliminares determinados neste trabalho, estabelecendo o fluxo de caixa com os valores de *pay-back* simples e o *pay-back* descontado com a taxa interna de retorno (TIR), para se prever o tempo de retorno financeiro e o lucro.
- ✓ Estudar a obtenção de cerveja com banana, sem álcool, para uso por esportistas devido o elevado teor de potássio (K) que foi conseguido neste trabalho, com a cerveja alcoólica com adjunto de banana.
- ✓ Fazer uma avaliação sensorial mais apurada desta cerveja utilizando equipes treinadas através da técnica de *Análise Descritiva Quantitativa* (ADQ).

Referências

- ADÃO, R. C.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of “Prata” banana (*Musa acuminata* X *M. balbisiana*). **Food Chemistry**, n. 90, p. 705-711, 2005.
- ALMEIDA E SILVA JB. Inovações nos Processos de Obtenção de Bebidas Fermentadas e Destiladas. In: VII BRAZILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOOD AND BEVERAGES, Dezembro, 2008, Lorena.
- ALMEIDA E SILVA, J. B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, G. W. **Tecnologia de Bebidas**. São Paulo: Edgar Blücher, 2005. 550 p.
- ALMEIDA LIMA, U.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: Almeida Lima, U.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell. **Biotecnologia Industrial. Volume 3. Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p.01–46.
- ALMEIDA, R. B.; ALMEIDA ESILVA, J. B.; ALMEIDA LIMA, U.; ASSIS, A. N. Evaluation of fermentation parameters during high-gravity beer production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 18, n. 04, p. 459-465, 2001.
- ANDERSON, R.; BRITES SANCHES, A.; DEVREUX, A.; DUE, J.; HAMOND, J. R. M.; MARTIN, P. A.; OLIVER-DAUMEN, B.; SMITH, I. Fermentation and Maturation. In: EBC TECHNOLOGY AND ENGINEERING FORUM, 2000, Getranke-Fachverlag, Germany.
- ARRUDA, A. R.; CASIMIRO, A. R. S.; GARRUTI, D. S.; ABREU, F. A. P. Fermented banana beverage processing. **Revista Ciência Agronômica**, n. 34, p. 161-167, 2003.
- ASBC - **Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists**. Eighth Revised Edition. Minnesota: The Technical Committee and the Editorial Committe of the ASBC, 1996.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. NBR 12806; Análise **sensorial dos alimentos e bebidas: terminologia**. São Paulo, Comitê Brasileiro de Alimentos e Bebidas, 1993.
- BAFRNCOVA, P.; SMOGROVICOVA, D.; SLAVIKOVA, I.; PAIKOVA, J.; DOMEÉNY, Z. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 337-341, 1999.
- BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; van MARIS, A. J. A.; KÖTTER, P.; LUTTIK, A. H.; van DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, **FEMS Microbiology Review**, v. 25, p. 15-37, 2001.
- BARBOSA, C. R.; ROSSI, A. A.; BASSO, R.; SILVA, M. B.; CARVALHO, G. B. M. Avaliação da suplementação com nutrientes na fermentação do suco de maçã por *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Analytica**, n. 31, p. 52-63, 2007.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas, 1995. 299 p.
- BENARD, M. Controle Organoléptico. In: **Biotecnologia**. SCRIBAN, R. São Paulo: Editora Manole Ltda., 1985. p.371-383.
- BENITEZ, J. L.; FORSTER, A.; DE KEUKELEIRE, D.; MOIR, M.; SHARPE, F. R.; VERHAGEN, L. C.; WESTWOOD, K. T. Hops and Hop Products. In: EBC TECHNOLOGY AND ENGINEERING FORUM, 1997, Getranke-Fachverlag, Germany.

BERGER, H. Banana. In: MAARSE, H. Volatile compounds in foods and beverages. New York: Marcel Dekker Inc, 1991. p. 292-293.

BERRY, D. R. Growth of yeast. In: NEWAY, J. O. **Fermentation process development of industrial organisms**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 277-310.

BLEINROTH, E. W. Matéria-prima. In: MEDINA, C.; BLEINROTH, E. W.; MARTIN, Z. J.; TRAVAGLINI, D. A.; OKADA, M.; QUAST, D. G.; HASHIZUME, T.; MORETTI, V. A.; BICUDO NETO, L. C.; ALMEIDA, A. S. B.; RENESTO, O. V. **Banana – Cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: Ital, 1985. p. 1133-196.

BOLINI, H. M. A.; FARIA, J. B. Perfil sensorial e características físico-químicas de aguardentes comerciais brasileiras envelhecidas e sem envelhecer. **Brasilian Journal of Food Technology**, v. 32, p. 31-40, 2000.

BOLINI, H. M. A.; FARIA, J. B.; BOSCOLO, M.; ISIQUE, W. D.; ODELLO, L.; FRANCO, D. W. Evaluation of brazilian woods as an alternative to oak for cachaça's aging casks. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 83-87, 2003.

BOLINI, H. M. A.; FRANCO, D. W.; FARIA, J. B.; BOSCOLO, M. Changes in the volatile composition in brazilian sugar cane spirit during ageing in oak (*Quercus spp*) casks. **Alimentaria**, v. 357, p. 105-116, 2004.

BORZANI, W. Cinética de processos fermentativos. **Revista Brasileira de Engenharia**, v.3, n.2, p.61, 1986.

BOUDHRIQUA, N.; GIAMPAOLI, P.; BONAZZI, C. Changes in aromatic components of banana during ripening and air-drying. **Swiss Society of Food Science and Technology**, v. 36, p. 633-642, 2003.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. New York: John Wiley and Sons Inc, 1978. 653 p.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing: Science and Practice**, Cambridge: CRC Press, 2004.

BRIGGS, D. E.; HOUGH, J. S.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W. **Malting and brewing science**, London: Chapman and Hall Ltd, 1981, 643p.

CANCALON, P. F.; PARISH, M. E. Changes in the chemical composition of orange juice during growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Glucobacter oxydans*. **Food Microbiology**, v. 12, p.117-124, 1995.

CÂNDIDO, E. J. M. **Estudo de viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada**. 2008. 157p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) Departamento de Biotecnologia, EEL-USP, Lorena, 2008.

CARDELLO, H. M. A. B. Análise Sensorial de Aguardentes. In: BRAZILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOOD AND BEVERAGES, 1999, Araraquara.

CARVALHO, C. R. L.; MANTOVANI, D. B. M.; CARVALHO, P. R. N.; MORAES, P. M. **Análises químicas de alimentos**. Campinas: ITAL, 1990. 121p.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 3º parte – A maturação. **Revista Analytica**, n. 26, p. 46-54, 2007.

CARVALHO, G. B. M.; ROSSI, A. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2º parte – A fermentação. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 26, p. 46-54, 2007.

CARVALHO, G. B. M.; SILVA, D. P.; BENTO, C. V.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Banana as adjunct in beer production: Applicability and performance of fermentative parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, (in press), 2008a.

CARVALHO, G. B. M.; SILVA, D. P.; SANTOS, J. C.; IZÁRIO FILHO, H. J.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Total soluble solids from banana: Evaluation and optimization of extraction parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, (in press), 2008b.

CARVALHO, G. B. M.; SILVA, D. P.; TEIXEIRA, J. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Cerveja a partir de banana como adjunto do malte. In: Venturini Filho, G. W. **Ciência e Tecnologia de Bebidas**. São Paulo: Edgar Blücher, 2009, *in press*.

CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLEDEW, W. M. High gravity brewing: Effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 3 p. 639-646, 1984.

CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLEDEW, W. M. High gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 639-646, 1984.

CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLEDEW, W. M. High gravity brewing: Nutrient enhanced production of high concentrations of ethanol by brewing yeast. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 6, p. 429-434, 1983.

CERQUEIRA DE JESUS, S.; FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U.; CARDOSO, R. L. Caracterização física e química de frutos de diferentes genótipos de bananeira. **Bragantia - Campinas**, v. 63, n. 3, p. 315-323, 2004.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**, n. 24, p. 449-452, 2001.

CRUZ, J. M. M. Cerveja. In: FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Reactores Biológicos**. Lisboa/Porto: Lidel, 2007. p. 277-305.

CUNNINGHAM, S.; STEWART, G. G. Effects of high gravity brewing and acid washing on brewers' yeast. **Journal of the American Society of the Brewing Chemists**, v. 56, n. 1, p. 12-18, 1998.

DAMORE, T.; CELOTTO, G.; STEWART, G.G. Advances in the fermentation of high gravity wort. In: 23RD EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 1991, Lisboa.

DANTAS, J. L. L. Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: **ALVES, E. J. (Org): A Cultura da Banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Cruz das Almas, BA: EMBRAPA_CNPMF, 1997. p. 27-34.

DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G.; CZEWSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Analysis of total and reducing sugar in foods. A comparative study between colorimetric and titration techniques. **Agrarian Science and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 65-78, 2002.

DRAGONE, G. **Estudo cinético do processo fermentativo de produção de cervejas em mostos concentrados**. 2002. 111p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2002.

DRAGONE, G. **Fermentação primária para a produção de cervejas de altas densidades por processo contínuo utilizando leveduras imobilizadas em bagaço de malte**. 2007. 140p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, EEL-USP, Lorena, 2007.

DRAGONE, G.; SILVA, D. P.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing. **Lebensm-Wiss Technology**, v. 37, p. 797-802, 2004.

DRAGONE, G.; SILVA, D. P.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; LIMA, U. A. Improvement of the ethanol productivity in a high gravity brewing at pilot plant scale. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1171-1174, 2003.

DUFOR, J. P. **Brewing Science Course**, Louvain-la-Neuve, Bélgica, 1989.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**, Curitiba: Editora Champagat, 1996. 122 p.

ENGASSER, J. M.; MARC, I.; MOLL, M.; DUTEURTRE, B. Kinetic Modeling of Beer Fermentation. In: 18 TH EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 1981, Copenhagen.

FAVARO, T. Banana brasileira ganha mercado externo. Disponível em: [http:// www. estado. estado.com.br/suplementos/agri/2003/02/05/agri022.html](http://www.estado.estadao.com.br/suplementos/agri/2003/02/05/agri022.html). Acesso em 02/2003.

HARDWICK, W. A. **Handbook Brewing**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994. 714 p.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. p. 93-122.

HOUGH, J. S. **The biotechnology of malting and brewing**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. 587 p.

HU, C. K.; BAI, F. W.; AN, L. J. Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg^{2+} via reduction in plasma membrane permeability. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1191-1194, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTS. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. São Paulo, SP: Secretaria de Estado da Saúde, 1985. p. 46-56.

LE DUY, A.; ZAJIC, J. E. A Geometrical Approach for Differentiation of an Experimental Function at a Point: Applied to Growth and Product Formation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 15, p. 805-815, 1973.

LE QUÉRÉ, J. M.; HUSSON, F.; RENARD, C. M. G. C.; PRIMAULT, J. French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations. **Lebensm-Wiss Technology**, v. 39, p. 1033-1044, 2006.

LEE, W. C.; YUSOF, S.; HAMID, N. S. A; BAHARIN, B. S. Optimizing conditions for hot water extraction of banana juice using response surface methodology (RSM). **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 473-479, 2006.

LICHTENBERG, L. A. Colheita e pós-colheita da banana. **Informe Agropecuário**, v. 20, n. 196, p. 73-90, 1999.

LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTILA, M. Recent advances in the malting and brewing industry. **Journal of Biotechnology**, n. 65, p. 85-98, 1998.

MATSUURA, F. C. A. U.; CARDOSO, R. I.; RIBEIRO, D. E. Qualidade sensorial de frutos de híbridos de bananeira cultivar pacovan. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 263-266, 2002.

MATTOS, R. Vida de prateleira de cervejas - estabilidade microbiológica - Parte III. **Engarrafador Moderno**, n. 127, p. 30-34, 2004.

McCAIG, R.; McKEE, J.; PFISTERER, E. A.; HYSERT, D. A.; MUNOZ, E.; INGLEDEW, W. M. Very high gravity brewing - Laboratory and pilot plant trials. **Journal of the American Society of the Brewing Chemists**, v. 50, p.18-26, 1992.

MOLINA, M. A. B. **Avaliação de caldo de cana-de-açúcar para obtenção de 2,3-butanodiol**. 1995. 110p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP, São Paulo, 1995.

MORETTI, V. A.; BICUDO NETO, L. C.; ALMEIDA, A. S. B.; RENESTO, O. V. Aspectos econômicos de produção e mercado. In: MEDINA, C.; BLEINROTH, E. W.; MARTIN, Z. J.; TRAVAGLINI, D. A.; OKADA, M.; QUAST, D. G.; HASHIZUME, T.; MORETTI, V. A.; BICUDO NETO, L. C.; ALMEIDA, A. S. B.; RENESTO, O. V. **Banana – Cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: Ital, 1985. p. 197-265.

MOSER, A. Bioprocess Technology. **Kinetics and Reactors**. New York: Springer-Verlag, 1988, 451p.

MUNROE, J. H. Fermentation. In: HARDWICK, W. A. **Handbook of Brewing**. New York: Taylor & Francis - CRC, 2006. p. 487-524.

MURRAY, C. R.; STEWART, G. G. Esperienze com il sistema high gravity per la produzione di birre lager. **Birra e Malto**, v. 44, p. 52-64, 1991.

ODUMERU, J. A.; DAMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Effects of heat shock and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*) brewing yeast strain during fermentation of high gravity wort. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 10, p. 111-116, 1992.

PANCHAL, C. J.; STEWART, G. G. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 86, p. 207-210, 1980.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAM, E. C. S. Fungos: As Leveduras. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980, p. 345-366.

POLYCHRONIADOU, E.; KANELAKI, M.; ICONOMOPOULOU, M.; KOUTINAS, A. A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Grape and apple wines volatile fermentation products and possible relation to spoilage. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 337-339, 2003.

PRADO, A. A.; JAMIL, H.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; DRAGONE, G.; SILVA, D. P. Conservação de Energia em um Estudo Comparativo entre o Processo Cervejeiro Convencional e de Altas Densidades. In: VII BRASILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOODS AND BEVERAGES, 2008, Lorena.

PRIEST, F. G., CAMPBELL, I. **Brewing Microbiology**. London: Chapman & Hall, 1996. 232 p.

REES, E. M. R.; STEWART, G. G. The Effect of the Divalent Ions Magnesium and Calcium on Yeast Fermentation Performance in Conventional (12 °P) and High (20 °P) Gravity Worts in Both Static and Shaking Fermentations. In: 26TH EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 1997a, London.

REIS, R. C.; MINIM, V. P. R. Testes de aceitação. In: Minim, V. P. R. **Análise Sensorial**. Viçosa: Editora UFV, 2006. p.67-83.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Editora Casa do Pão, 2005, p.323.

ROSE, A. H. Responses to the Chemical Environment. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. The Yeast Second Edition. Volume I. **Yeast and the environment**, London: Academic Press, 1987. p. 540.

RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Brewing. In: REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise: enzymes, biomass, food and feed**. Weinheim: VCH, 1995. p. 419-462.

SEIDL, C. **O catecismo da cerveja**. São Paulo: Editora SENAC, 385 p, 2003.

SILVA D. P. **Produção e Avaliação Sensorial de Cerveja Obtida a Partir de Mostos com Elevadas Concentrações de Açúcares**. 2005. 177p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, 2005.

SILVA, D. P. BRÁNYIK, T.; DRAGONE, G.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B. High gravity batch and continuous processes for beer production: evaluation of fermentation performance and beer quality. **Chemical Papers**, Bratislava, v. 62, n. 1, p. 34-41, 2008.

SINDICERV. Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. Origem da cerveja - História. [online]. Disponível em: <http://www.sindicerv.com.br/historia.htm>. Acesso em 10/2003.

SIQUEIRA, P. B.; MACEDO, G. A.; BOLINI, H. M. A. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 177-182, 2008.

SOLENZAL, A. I. N.; RÍOS, M. D.; MARTÍNEZ, E. A.; BUENO, M. G.; SANTANA, E. M. Tecnologia del proceso de obtención de licores de xilosa a partir de bagazo de caña, para la producción biotecnológica de xilitol. **Brasilian Journal of Food Technology**, p. 57-64, 2005.

STEWART, G. G. A brewer's delight. **Chemistry and Industry**, n. 6, p. 706-709, 2000.

STEWART, G. G. Adjuncts. In: HARDWICK, W. A. **Handbook of Brewing**. New York: Marcel Dekker, 1994. p.121-132.

STEWART, G. G.; D'AMORE, T.; PANCHAL, C. J.; RUSSELL, I. Factors that influence the ethanol tolerance of brewer's yeast strains during high gravity wort fermentations. **M B A A Technical Quarterly**, v. 25, p. 47-53, 1988.

STEWART, G. G.; RUSSELL, I. **An Introduction to Brewing Science & Technology: series III: brewer's yeast**. London: The Institute of Brewing, 1998. 108 p.

SUIHKO, M. L.; VILPOLA, A.; LINKO, M. Pitching rate in high gravity brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 99, p. 341-346, 1993.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very high gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.5, p.1519-1524, 1994.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Process Biochemistry*, v. 31, n. 4, p. 321-331, 1996.

TORNIC, H. E. Da cevada a bebida. **Revista Alimentos e Tecnologia**, v. 1, n. 7, p. 11-16, 1986.

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e Cervejarias. A História, a Arte e a Tecnologia**. São Paulo: Editora Aden, 2001. 223 p.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial. Volume 4. Biotecnologia na Produção de Alimentos**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. p.91-144.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J. P.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S.; DELVAUX, F. R. Flavor – active esters: adding fruitiness to beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Japan, v. 96, n. 02, p. 110-118, 2003.

VIRKAJÄRVI, I. **Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast**. 2001. 137p. Tese (Doutorado em Tecnologia), HUT, Helsinki, Finlândia, 2001.

VITOLO, M. Aplicação de Enzimas na Tecnologia de Alimentos. In: ALMEIDA LIMA, U., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial. Volume 4. Biotechnologia na Produção de Alimentos**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 387- 420.

VIVIANI, L. **Avaliação da qualidade pós-colheita da banana prata anã associada a embalagens**. 2006. 73p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), FEAGRI, UNICAMP, Campinas, 2006.

VIVIANI, L.; LEAL, P. M. Qualidade pós-colheita de banana prata anã armazenada sob diferentes condições. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n.3, p. 465-470, 2007.

von POSER, G. L. Polissacarídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editoras da UFSC/UFRGS, 1999. p. 497-517.

WALKER, G. M. Yeast Physiology and Biotechnology, In: **Yeast Technology**. Scotland: Wiley, p. 265-320, 2000.

YOUNIS, O. S.; STEWART, G. G. Effect of malt wort, very high gravity malt wort, and very high gravity adjunct wort on volatile production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the American Society of the Brewing Chemists**, v. 57, n. 2, p. 39-45, 1999.

ZHANG, R. L. P.; WHISTLER, J. N.; BEMILLER, B. R.; HAMAKER. Banana starch: Production, physicochemical properties, and digestibility - a Review. **Carbohydrate Polymers**, n. 59, p. 443-458, 2005.

APÊNDICES

Apêndice 01. Cinética da Concentração de Células em Suspensão

Os valores experimentais da concentração de células totais e células não viáveis em suspensão foram representadas em função do tempo de fermentação para cada um dos ensaios correspondentes ao planejamento fatorial 2^2 do item 5.2.

Figura 01.1: (A) Células em suspensão (□ g/L, ● cel/mL) e (B) Células não viáveis da levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 12 °P a 10 °C. (Ensaio 1 do item 5.2).

Figura 01.2: (A) Células em suspensão (□ g/L, ● cel/mL) e (B) Células não viáveis da levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 15 °P a 10 °C. (Ensaio 2 do item 5.2).

Figura 01.3: (A) Células em suspensão (□ g/L, ● cel/mL) e **(B)** Células não viáveis da levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 12 °P a 15 °C. (Ensaio 3 do item 5.2).

Figura 01.4: (A) Células em suspensão (□ g/L, ● cel/mL) e **(B)** Células não viáveis da levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 15 °P a 15 °C. (Ensaio 4 do item 5.2).

Figura 01.5: (A) Células em suspensão (□ g/L, ● cel/mL) e (B) Células não viáveis da levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 13,5 °P a 12,5 °C. (Ensaio 5 do item 5.2).

Figura 01.6: (A) Células em suspensão (□ g/L, ● cel/mL) e (B) Células não viáveis da levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 13,5 °P a 12,5 °C. (Ensaio 6 do item 5.2).

Figura 01.7: (A) Células em suspensão (□ g/L, ● cel/mL) e (B) Células não viáveis da levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 13,5°P a 12,5°C (Ensaio 7 do item 5.2).

Figura 01.8: (A) Células em suspensão (□ g/L, ● cel/mL) e (B) Células não viáveis da levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 13,5°P a 12,5°C (Ensaio 8 do item 5.2).

Apêndice 02. Cinética do Consumo de Açúcares e Produção de Etanol

Nesta seção estão representados os valores experimentais da concentração de açúcares totais e do etanol em função do tempo de fermentação, de acordo com as diferentes condições estabelecidas pelo planejamento fatorial 2^2 do item 5.2. As figuras mostram também, as relações entre a produtividade volumétrica e o rendimento aparente em etanol, para cada um dos ensaios realizados.

Figura 02.1: (A) Consumo de extrato aparente (□), produção de etanol (●) e (B) Produtividade volumétrica (▨) e rendimento aparente em etanol (□), pela levedura *S. cerevisiae* 380 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 12 °P a 10 °C (Ensaio 1 do item 5.2).

Figura 02.2: (A) Consumo de extrato aparente (●), produção de etanol (□) e (B) Produtividade volumétrica (▨) e rendimento aparente em etanol (□), pela levedura *S. cerevisiae* 380 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 15 °P a 10 °C (Ensaio 2 do item 5.2).

Figura 02.3: (A) Consumo de extrato aparente (●), produção de etanol (□) e **(B)** Produtividade volumétrica (▨) e rendimento aparente em etanol (□), pela levedura *S. cerevisiae* 380 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 12 °P a 15 °C (Ensaio 3 do item 5.2).

Figura 02.4: (A) Consumo de extrato aparente (●), produção de etanol (□) e **(B)** Produtividade volumétrica (▨) e rendimento aparente em etanol (□), pela levedura *S. cerevisiae* 380 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 15 °P a 15 °C (Ensaio 4 do item 5.2).

Figura 02.5: (A) Consumo de extrato aparente (●), produção de etanol (□) e (B) Produtividade volumétrica (▨) e rendimento aparente em etanol (□), pela levedura *S. cerevisiae* 380 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 13,5 °P a 12,5 °C (Ensaio 5 do item 5.2).

Figura 02.6: (A) Consumo de extrato aparente (●), produção de etanol (□) e (B) Produtividade volumétrica (▨) e rendimento aparente em etanol (□), pela levedura *S. cerevisiae* 380 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 13,5 °P a 12,5 °C (Ensaio 6 do item 5.2).

Figura 02.7: (A) Consumo de extrato aparente (●), produção de etanol (□) e (B) Produtividade volumétrica (▨) e rendimento aparente em etanol (□), pela levedura *S. cerevisiae* 380 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 13,5 °P a 12,5 °C (Ensaio 7 do item 5.2).

Figura 02.8: (A) Consumo de extrato aparente (●), produção de etanol (□) e (B) Produtividade volumétrica (▨) e rendimento aparente em etanol (□), pela levedura *S. cerevisiae* 380 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 13,5 °P a 12,5 °C (Ensaio 8 do item 5.2).

Apêndice 03. Velocidade Específica de Transformação

Neste item são mostrados os gráficos das velocidades específicas de crescimento das células em suspensão, consumo de açúcares e produção de etanol, em função do tempo de fermentação, para cada ensaio do planejamento fatorial 2^2 do item 5.2. As velocidades foram calculadas a partir dos dados ajustados da concentração de células em suspensão, consumo de açúcares totais e de produção de etanol, utilizando o método geométrico de cálculo de derivadas proposto por Le Duy; Zajic (1973).

Figura 03.1: Velocidade específica de crescimento de células em suspensão (μ_x , ■), consumo de açúcares (μ_s , ○) e produção de etanol (μ_p , △) na fermentação do mosto cervejeiro com 12 °P e 10 °C, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager* (Ensaio 1 do item 5.2).

Figura 03.2: Velocidade específica de crescimento de células em suspensão (μ_x , ■), consumo de açúcares (μ_s , ○) e produção de etanol (μ_p , △) na fermentação do mosto cervejeiro com 15 °P e 10 °C, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager* (Ensaio 2 do item 5.2).

Figura 03.3: Velocidade específica de crescimento de células em suspensão (μ_x , ■), consumo de açúcares (μ_s , ○) e produção de etanol (μ_p , △) na fermentação do mosto cervejeiro com 12 °P e 15 °C, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager* (Ensaio 3 do item 5.2).

Figura 03.4: Velocidade específica de crescimento de células em suspensão (μ_x , ■), consumo de açúcares (μ_s , ○) e produção de etanol (μ_p , △) na fermentação do mosto cervejeiro com 15 °P e 15 °C, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager* (Ensaio 4 do item 5.2).

Figura 03.5: Velocidade específica de crescimento de células em suspensão (μ_x , ■), consumo de açúcares (μ_s , ○) e produção de etanol (μ_p , △) na fermentação do mosto cervejeiro com 13,5 °P e 12,5 °C, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager* (Ensaio 5 do item 5.2).

Figura 03.6: Velocidade específica de crescimento de células em suspensão (μ_x , ■), consumo de açúcares (μ_s , ○) e produção de etanol (μ_p , △) na fermentação do mosto cervejeiro com 13,5°P e 12,5°C, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager* (Ensaio 6 do item 5.2).

Figura 03.7: Velocidade específica de crescimento de células em suspensão (μ_x , ■), consumo de açúcares (μ_s , ○) e produção de etanol (μ_p , △) na fermentação do mosto cervejeiro com 13,5 °P e 12,5 °C, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager* (Ensaio 7 do item 5.2).

Figura 03.8: Velocidade específica de crescimento de células em suspensão (μ_x , ■), consumo de açúcares (μ_s , ○) e produção de etanol (μ_p , △) na fermentação do mosto cervejeiro com 13,5 °P e 12,5 °C, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager* (Ensaio 8 do item 5.2).

Apêndice 04. Cinética do Consumo de Açúcares Fermentáveis

Nesta seção encontram-se apresentados por meio de curvas e em tabelas, os resultados obtidos para as concentrações de açúcares fermentáveis e suas velocidades específicas de consumo, das amostras retiradas durante a fermentação, para todos ensaios do planejamento fatorial 2^2 do item 5.2.

Figura 04.1: (A) Consumo de açúcares fermentáveis (glicose ▲; frutose ▽; maltose ■; maltotriose ○) e (B) Velocidades específicas de consumo (μ_{glicose} ▲; μ_{frutose} ▽; μ_{maltose} ■; $\mu_{\text{maltotriose}}$ ○) pela levedura *S.cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana cervejeiro de 12ºP à 10°C. (Ensaio 1 do item 5.2)

Figura 04.2: (A) Consumo de açúcares fermentáveis (glicose ▲; frutose ▽; maltose ■; maltotriose ○) e (B) Velocidades específicas de consumo (μ_{glicose} ▲; μ_{frutose} ▽; μ_{maltose} ■; $\mu_{\text{maltotriose}}$ ○) pela levedura *S.cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 12ºP à 15°C. (Ensaio 3do item 5.2)

Figura 04.3: (A) Consumo de açúcares fermentáveis (glicose ▲; frutose ▽; maltose ■; maltotriose ○) e (B) Velocidades específicas de consumo (μ_{glicose} ▲; μ_{frutose} ▽; μ_{maltose} ■; $\mu_{\text{maltotriose}}$ ○) pela levedura *S.cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 15°P à 15°C. (Ensaio 4 do item 5.2)

Figura 04.4: (A) Consumo de açúcares fermentáveis (glicose ▲; frutose ▽; maltose ■; maltotriose ○) e (B) Velocidades específicas de consumo (μ_{glicose} ▲; μ_{frutose} ▽; μ_{maltose} ■; $\mu_{\text{maltotriose}}$ ○) pela levedura *S.cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 13,5°P à 12,5°C. (Ensaio 5 do item 5.2)

Figura 04.5: (A) Consumo de açúcares fermentáveis (glicose ▲; frutose ▽; maltose ■; maltotriose ○) e (B) Velocidades específicas de consumo (μ_{glicose} ▲; μ_{frutose} ▽; μ_{maltose} ■; $\mu_{\text{maltotriose}}$ ○) pela levedura *S.cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 13,5°P à 12,5°C. (Ensaio 6 do item 5.2)

Figura 04.6: (A) Consumo de açúcares fermentáveis (glicose ▲; frutose ▽; maltose ■; maltotriose ○) e (B) Velocidades específicas de consumo (μ_{glicose} ▲; μ_{frutose} ▽; μ_{maltose} ■; $\mu_{\text{maltotriose}}$ ○) pela levedura *S.cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 13,5°P à 12,5°C. (Ensaio 7 do item 5.2).

Figura 04.7: (A) Consumo de açúcares fermentáveis (glicose ▲; frutose ▽; maltose ■; maltotriose ○) e **(B)** Velocidades específicas de consumo (μ_{glicose} ▲; μ_{frutose} ▽; μ_{maltose} ■; $\mu_{\text{maltotriose}}$ ○) pela levedura *S.cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 13,5°P à 12,5°C. (Ensaio 8 do item 5.2)

Figura 04.8: (A) Consumo de açúcares fermentáveis (glicose ▲; frutose ▽; maltose ■; maltotriose ○) e **(B)** Velocidades específicas de consumo (μ_{glicose} ▲; μ_{frutose} ▽; μ_{maltose} ■; $\mu_{\text{maltotriose}}$ ○) pela levedura *S.cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 13,5°P à 12,5°C. (Ensaio 8 do item 5.2)

Tabela A1.1. Consumo de açúcares fermentáveis e velocidades específicas de consumo, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 12°P à 10°C . (Ensaio 1 do item 5.2).

Tempo (h)	Maltose (g/L)	Maltotriose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	μMaltose (g/gh)	μMaltotriose (g/gh)	μGlicose (g/gh)	μFrutose (g/gh)
0	44,70	14,76	22,72	14,07	0,261	0,155	0,21	0,064
6	39,41	12,11	18,62	12,46	0,23	0,139	0,183	0,054
12	41,93	10,92	18,14	13,14	0,354	0,116	0,245	0,144
18	31,05	9,72	13,43	9,31	0,334	0,057	0,251	0,156
24	27,21	9,69	12,20	9,12	0,056	0,004	0,163	0,037
30	23,16	9,68	8,28	8,42	0,061	0,002	0,217	0,06
36	25,75	9,66	5,96	7,52	0,08	0,013	0,195	0,105
42	28,28	9,38	4,18	6,23	0,097	0,012	0,094	0,107
48	27,72	9,36	4,36	4,92	0,073	0,003	0,069	0,055
60	27,16	9,34	1,06	4,70	0,031	0,001	0,074	0,056
72	25,09	9,33	0,90	3,81	0,079	0,001	0,004	0,059
84	21,57	9,31	0,90	1,46	0,23	0,003	0,001	0,032
96	16,30	9,28	0,85	1,16	0,31	0,001	0,001	0,009
108	11,24	9,26	0,83	1,13	0,278	0,001	0,001	0,002
120	5,30	9,24	0,81	1,10	0,148	0	0	0

Tabela A1.3. Consumo de açúcares fermentescíveis e velocidades específicas de consumo, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com 12°P à 15°C . (Ensaio 3)

Tempo (h)	Maltose (g/L)	Maltotriose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	μMaltose (g/gh)	μMaltotriose (g/gh)	μGlicose (g/gh)	μFrutose (g/gh)
0	41,50	16,84	20,25	13,81	0,093	0,028	0,358	0,002
6	41,61	16,73	18,84	13,43	0,147	0,03	0,39	0,004
12	39,98	16,61	16,75	14,42	0,21	0,064	0,477	0,159
18	38,63	15,76	12,11	11,07	0,108	0,038	0,401	0,219
24	36,78	15,69	7,54	9,20	0	0,009	0,307	0,18
30	31,72	15,54	1,95	5,19	0,192	0,006	0,153	0,129
36	27,31	15,39	0,48	3,21	0,317	0,008	0,036	0,097
42	19,82	15,24	0,88	1,63	0,472	0,016	0	0,07
48	11,74	14,93	1,19	1,12	0,452	0,026	0	0,026
60	6,88	14,4	1,20	1,12	0,135	0,026	0	0
72	2,49	13,17	1,19	1,11	0,068	0,01	0	0

Tabela A1.4 .Consumo de açúcares fermentáveis e velocidades específicas de consumo, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 15°P à 15°C (Ensaio 4 do item 5.2).

Tempo (h)	Maltose (g/L)	Maltotriose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	μ_{Maltose} (g/gh)	$\mu_{\text{Maltotriose}}$ (g/gh)	μ_{Glicose} (g/gh)	μ_{Frutose} (g/gh)
0	43,88	16,9	25,45	23,55	0,298	0,053	0,01	0,07
6	41,07	16,84	25,37	23,41	0,221	0,08	0,07	0,1
12	40,31	15,57	25,34	21,84	0,061	0,031	0,353	0,127
18	40,06	15,02	18,08	21,14	0,101	0,03	0,555	0,164
24	38,91	15,00	14,18	19,57	0,21	0,002	0,407	0,313
30	33,96	14,98	6,91	11,44	0,302	0	0,377	0,339
36	29,69	14,96	2,28	9,08	0,395	0,002	0,288	0,37
42	25,71	14,95	0,57	3,58	0,285	0	0,08	0,21
48	17,60	14,90	0,41	1,27	0,248	0,02	0,006	0,042
60	7,58	13,51	0,32	0,79	0,184	0,06	0,002	0,009
72	2,49	9,69	0,27	0,69	0,08	0,08	0,001	0,006
84	2,20	8,01	0,21	0,50	0,02	0,087	0,001	0,001

Tabela A1.5. Consumo de açúcares fermentáveis e velocidades específicas de consumo, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto cervejeiro com banana 13,5°P à 12,5°C (Ensaio 5 item 5.2).

Tempo (h)	Maltose (g/L)	Maltotriose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	μ_{Maltose} (g/gh)	$\mu_{\text{Maltotriose}}$ (g/gh)	μ_{Glicose} (g/gh)	μ_{Frutose} (g/gh)
0	32,98	15,34	26,42	20,38	0,071	0,018	0,21	0,063
6	31,48	14,86	21,89	19,28	0,07	0,02	0,18	0,06
12	29,97	14,61	18,16	17,43	0,042	0,008	0,112	0,018
18	29,70	14,57	17,21	18,79	0,03	0,003	0,14	0,07
24	28,97	14,53	12,92	14,99	0,056	0,004	0,165	0,127
30	26,86	14,35	8,84	12,07	0,03	0,05	0,11	0,05
36	26,80	14,17	4,50	11,29	0,016	0,005	0,072	0,032
42	25,96	13,99	3,51	10,00	0,02	0,005	0,04	0,05
54	22,96	13,81	1,67	6,87	0,1	0,006	0,04	0,08
60	20,85	13,63	0,73	5,05	0,066	0,007	0,023	0,08
72	19,89	13,45	0,82	2,56	0,156	0,004	0,003	0,07
84	11,89	13,43	0,66	1,04	0,259	0,001	0,001	0,036
96	8,82	13,42	0,73	1,01	0,237	0	0	0,006
108	3,55	13,41	0,69	0,91	0,157	0,02	0,003	0,005
120	1,88	12,52	0,61	0,79	0,088	0,049	0	0,003

Tabela A1.6: Consumo de açúcares fermentáveis e velocidades específicas de consumo, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 13,5°P à 12,5°C. (Ensaio 6 item 5.2).

Tempo (h)	Maltose (g/L)	Maltotriose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	μMaltose (g/gh)	μMaltotriose (g/gh)	μGlicose (g/gh)	μFrutose (g/gh)
0	35,87	15,26	28,73	22,16	0,124	0,035	0,229	0,07
6	34,24	14,79	23,80	20,97	0,07	0,02	0,199	0,06
12	32,59	14,54	19,75	18,96	0,05	0,008	0,135	0,022
18	32,29	14,50	18,72	20,43	0,04	0,003	0,141	0,07
24	31,51	14,46	14,04	16,30	0,058	0,004	0,091	0,137
30	29,21	14,28	14,54	13,13	0,03	0,005	0,113	0,063
36	29,14	14,10	4,89	12,27	0,017	0,005	0,125	0,035
42	28,23	13,92	3,82	10,87	0,04	0,005	0,05	0,006
48	24,97	13,74	1,82	7,47	0,073	0,005	0,045	0,070
60	22,67	13,56	0,79	5,49	0,085	0,007	0,029	0,088
72	21,63	13,38	0,89	2,78	0,173	0,003	0,001	0,078
84	12,93	13,36	0,72	1,13	0,274	0,002	0,003	0,039
96	9,59	13,35	0,80	1,10	0,255	0,001	0	0,003
108	3,87	13,34	0,74	0,98	0,169	0,022	0,002	0,005
120	2,04	12,46	0,66	0,86	0,098	0,046	0,003	0,008

Tabela A1.7. : Consumo de açúcares fermentáveis e velocidades específicas de consumo, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 13,5°P à 12,5°C. (Ensaio 7 do item 5.2).

Tempo (h)	Maltose (g/L)	Maltotriose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	μMaltose (g/gh)	μMaltotriose (g/gh)	μGlicose (g/gh)	μFrutose (g/gh)
0	36,41	15,49	29,16	22,49	0,072	0,018	0,212	0,064
6	34,75	15,01	24,16	21,28	0,07	0,02	0,186	0,06
12	33,09	14,76	20,05	19,25	0,042	0,008	0,113	0,018
18	32,78	14,72	19,00	20,74	0,03	0,004	0,143	0,07
24	31,98	14,68	14,26	16,55	0,057	0,004	0,167	0,128
30	29,65	14,49	14,76	13,33	0,03	0,005	0,116	0,05
36	29,58	14,31	4,96	12,46	0,016	0,005	0,073	0,032
42	28,66	14,13	3,88	11,03	0,02	0,005	0,04	0,05
48	25,35	13,95	1,85	7,58	0	0,005	0,041	0,072
60	23,02	13,77	0,80	5,57	0,067	0,007	0,023	0,081
72	21,95	13,58	0,90	2,82	0,158	0,004	0,003	0,071
84	13,13	13,56	0,73	1,14	0,262	0,001	0,001	0,036
96	9,73	13,55	0,81	1,12	0,239	0	0	0,006
108	3,92	13,54	0,76	1,00	0,159	0,020	0,003	0,005
120	2,07	12,65	0,67	0,87	0,089	0,049	0	0,003

Tabela A1.8. : Consumo de açúcares fermentáveis e velocidades específicas de consumo, pela levedura *S. cerevisiae* 308 tipo *lager*, durante a fermentação do mosto com banana de 13,5°P à 12,5°C. (Ensaio 7 do item 5.2)

Tempo (h)	Maltose (g/L)	Maltotriose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	μ _{Maltose} (g/gh)	μ _{Maltotriose} (g/gh)	μ _{Glicose} (g/gh)	μ _{Frutose} (g/gh)
0	36,16	15,39	28,96	22,34	0,071	0,018	0,211	0,063
6	34,51	14,90	23,99	21,13	0,07	0,016	0,184	0,059
12	32,86	14,65	19,91	19,11	0,042	0,008	0,112	0,018
18	32,55	14,61	18,87	20,60	0,03	0,003	0,141	0,07
24	31,76	14,57	14,16	16,43	0,056	0,004	0,165	0,127
30	29,45	14,39	14,66	13,23	0,03	0,004	0,114	0,005
36	29,38	14,21	4,93	12,37	0,016	0,005	0,072	0,032
42	28,46	14,03	3,85	10,96	0,02	0,005	0,043	0,053
48	25,17	13,85	1,83	7,53	0	0,005	0,041	0,071
60	22,86	13,67	0,80	5,53	0,066	0,007	0,023	0,080
72	21,80	13,49	0,90	2,80	0,156	0,004	0,003	0,070
84	13,04	13,47	0,72	1,14	0,260	0,001	0,001	0,036
96	9,66	13,46	0,80	1,11	0,238	0	0	0,006
108	3,90	13,45	0,75	0,99	0,157	0,02	0,003	0,005
120	2,06	12,56	0,66	0,86	0,088	0,049	0	0,003

Apêndice 05. Resultados dos Ensaio do Planejamento 2².do item 5.2.

O fermentador cilindro-cônico utilizado nos diferentes ensaios do planejamento proposto foi desenvolvido visando verificar a homogeneidade das concentrações de biomassa, de substrato e de produto dentro do recipiente no decorrer do processo fermentativo, através de análise das amostras.

Nesta seção encontram-se para cada ensaio do planejamento, os valores obtidos das concentrações de células em suspensão, de extrato aparente e de etanol em função do tempo de fermentação. A conversão de unidades das concentrações aparente de açúcares (°P) e do etanol (%v/v) para (g/L), foram realizados de acordo com as seguintes equações.

$$\text{Extrato aparente (g/L)} = \text{Extrato aparente (°P)} \times \text{Densidade do mosto (g/mL)} \times 10$$

$$\text{Etanol (g/L)} = \text{Etanol (\%v/v)} \times 0,789 \text{ (g/mL)} \times 10$$

Onde: 0,789 (g/mL) é a densidade do etanol à 20°C.

Tabela A2.1: Fermentação do mosto com banana nas condições: Concentração inicial de açúcares: 12°P; Temperatura: 10°C. (Ensaio 1 do item 5.2)

Tempo (h)	pH	Células (g/L)	Células Viáveis (cel/mL)	Células não Viáveis (cel/mL)	Células Totais (cel/mL)	Grau Aparente de fermentação (%)	Extrato Aparente (°P)	Etanol (%v/v)	Densidade (g/mL)
0	4,97	1,76	5,9E+07	2,5E+05	5,9E+07	0	12,07	0,00	1,04678
6	4,85	2,75	9,2E+07	0,0E+00	9,2E+07	6,15	11,46	0,44	1,04420
12	4,81	1,45	4,8E+07	0,0E+00	4,8E+07	7	11,29	0,49	1,04350
18	4,72	1,67	5,6E+07	0,0E+00	5,6E+07	10,42	11,04	0,74	1,04245
24	4,71	3,04	1,0E+08	0,0E+00	1,0E+08	14,31	10,59	1,01	1,04475
30	4,64	2,16	7,2E+07	0,0E+00	7,2E+07	17,86	10,21	1,27	1,03901
36	4,69	1,60	5,3E+07	0,0E+00	5,3E+07	18,6	9,89	1,29	1,03789
42	4,52	1,77	5,8E+07	1,0E+06	5,9E+07	20,96	9,57	1,48	1,03633
48	4,66	2,16	7,2E+07	0,0E+00	7,2E+07	28,21	8,79	1,98	1,03317
60	4,58	1,79	6,0E+07	0,0E+00	6,0E+07	36,16	7,97	2,56	1,02982
72	4,5	2,57	8,6E+07	0,0E+00	8,6E+07	45,45	6,8	3,19	1,02508
84	4,53	1,29	4,3E+07	0,0E+00	4,3E+07	50,57	6,12	3,51	1,02234
96	4,47	1,49	5,0E+07	0,0E+00	5,0E+07	56,12	5,45	3,90	1,02309
108	4,43	1,44	4,5E+07	2,5E+06	4,8E+07	60,32	4,89	4,29	1,01742
120	4,41	2,51	8,3E+07	2,0E+06	8,5E+07	64,35	4,43	4,48	1,01559

Tabela A2..2: Fermentação do mosto com banana nas condições: Concentração inicial de açúcares: 15°P; Temperatura: 10°C. (Ensaio 2 do item 5.2).

Tempo (h)	pH	Células (g/L)	Células Viáveis (cel/mL)	Células não Viáveis (cel/mL)	Células Totais (cel/mL)	Grau Aparente de fermentação (%)	Extrato Aparente (°P)	Etanol (%v/v)	Densidade (g/mL)
0	4,87	0,60	1,80E+07	1,50E+06	1,95E+07	0	15,42	0	1,06097
6	4,83	1,24	4,05E+07	1,00E+06	4,15E+07	0	14,35	0	1,05639
12	4,74	1,30	3,95E+07	4,00E+06	4,35E+07	2,26	13,98	0,08	1,05482
18	4,63	1,70	5,60E+07	1,00E+06	5,70E+07	9,94	13,37	0,73	1,05223
24	4,63	1,85	6,15E+07	5,00E+05	6,20E+07	10,82	13,27	0,76	1,05181
30	4,6	1,89	6,30E+07	5,00E+05	6,35E+07	11,00	13,2	0,8	1,05151
36	4,57	1,94	6,35E+07	1,50E+06	6,50E+07	11,34	13,16	0,85	1,05134
42	4,62	2,04	6,65E+07	2,00E+06	6,85E+07	17,34	11,87	1,43	1,04592
48	4,57	1,51	4,80E+07	2,50E+06	5,05E+07	38,64	11,64	1,62	1,04695
60	4,64	1,94	5,90E+07	6,00E+06	6,50E+07	21,85	11,41	1,82	1,04400
72	4,61	2,61	8,60E+07	2,00E+06	8,80E+07	27,47	10,62	2,27	1,04071
84	4,53	1,79	6,00E+07	0,00E+00	6,00E+07	38,01	9,48	3,25	1,03800
96	4,59	1,76	5,40E+07	5,00E+06	5,90E+07	44,24	8,65	3,83	1,03280
108	4,59	1,97	6,20E+07	4,00E+06	6,60E+07	47,55	8,13	4,1	1,03047
120	4,55	2,02	6,00E+07	8,00E+06	6,80E+07	51,86	7,53	4,5	1,02803
132	4,56	1,32	4,20E+07	2,00E+06	4,40E+07	54,90	7,07	4,76	1,02617
144	4,59	1,33	4,05E+07	4,00E+06	4,45E+07	59,08	6,46	5,15	1,02697
156	4,58	1,07	3,30E+07	2,50E+06	3,55E+07	60,61	6,26	5,31	1,02620
168	4,53	1,55	4,95E+07	2,50E+06	5,20E+07	69,22	4,81	5,92	1,01710
180	4,57	1,60	4,95E+07	4,00E+06	5,35E+07	76,46	4,21	6,4	1,01471

Tabela A2.3: Fermentação do mosto com banana nas condições: Concentração inicial de açúcares: 12ºP; Temperatura: 15°C. (Ensaio 3 do item 5.2)

Tempo (h)	pH	Células (g/L)	Células Viáveis (cel/mL)	Células não Viáveis (cel/mL)	Células Totais (cel/mL)	Grau Aparente de fermentação (%)	Extrato Aparente (ºP)	Etanol (%v/v)	Densidade (g/mL)
0	5,01	0,61	1,96E+07	4,45E+05	2,00E+07	0	11,95	0	1,04625
6	4,84	0,78	2,44E+07	1,33E+06	2,58E+07	3,98	10,83	0,25	1,04266
12	4,84	1,02	3,38E+07	0,00E+00	3,38E+07	12,87	10,15	0,92	1,03878
18	4,82	2,01	6,67E+07	8,89E+05	6,76E+07	14,03	9,94	1,00	1,03790
24	4,76	2,41	7,78E+07	3,33E+06	8,11E+07	18,47	9,15	1,34	1,03484
30	4,63	4,32	1,34E+08	3,33E+06	1,46E+08	32,91	7,49	2,44	1,02787
36	4,45	2,97	9,67E+07	3,33E+06	1,00E+08	37,36	6,91	2,76	1,02552
42	4,37	2,61	8,33E+07	2,22E+06	8,78E+07	44,09	6,00	3,23	1,02186
48	4,89	1,56	5,11E+07	1,11E+06	5,22E+07	59,92	3,88	3,87	1,01341
60	4,38	1,52	4,89E+07	1,78E+06	5,07E+07	64,44	3,42	4,89	1,01522
72	4,36	9,56	3,18E+08	6,67E+06	3,24E+08	68,66	3,08	5,30	1,01391

Tabela A2.4: Fermentação do mosto com banana nas condições: Concentração inicial de açúcares: 15ºP; Temperatura: 15°C. (Ensaio 4 do item 5.2).

Tempo (h)	pH	Células (g/L)	Células Viáveis (cel/mL)	Células não Viáveis (cel/mL)	Células Totais (cel/mL)	Grau Aparente de fermentação (%)	Extrato Aparente (ºP)	Etanol (%v/v)	Densidade (g/mL)
0	5,15	1,05	3,35E+07	1,50E+06	3,50E+07	0	14,59	0	1,05741
6	5,09	1,33	4,30E+07	1,50E+06	4,45E+07	2,32	13,13	0,4	1,05121
12	4,86	1,55	5,15E+07	5,00E+05	5,20E+07	4,63	13,26	0,28	1,05178
18	4,79	1,32	4,35E+07	5,00E+05	4,40E+07	10,68	12,6	0,78	1,04898
24	4,78	2,35	7,75E+07	1,50E+06	7,90E+07	20,27	11,45	1,57	1,04416
30	4,7	2,89	9,50E+07	2,50E+06	9,75E+07	34,81	9,4	2,8	1,03587
36	4,63	1,20	4,00E+07	0,00E+00	4,00E+07	41,97	8,3	3,32	1,03117
42	4,55	2,86	9,50E+07	1,25E+06	9,63E+07	49,59	7,1	3,84	1,02629
48	4,55	2,86	9,38E+07	2,50E+06	9,63E+07	59,39	5,88	4,7	1,02137
60	4,49	3,58	1,19E+08	2,50E+06	1,21E+08	68,46	4,58	5,41	1,01618
72	4,53	2,95	9,65E+07	3,00E+06	9,95E+07	71,94	4,01	5,58	1,01392
84	4,48	1,51	4,95E+07	1,00E+06	5,05E+07	82,47	3,51	6,39	1,01194

Tabela A2.5: Fermentação do mosto com banana nas condições: Concentração inicial de açúcares:13,5°P; Temperatura: 12,5°C. (Ensaio 5 do item 5.2).

Tempo (h)	pH	Células (g/L)	Células Viáveis (cel/mL)	Células não Viáveis (cel/mL)	Células Totais (cel/mL)	Grau Aparente de fermentação (%)	Extrato Aparente (°P)	Etanol (%v/v)	Densidade (g/mL)
0	4,86	1,96	6,59E+07	0,00E+00	6,59E+07	0	13,53	0	1,05291
6	4,85	4,17	1,41E+08	0,00E+00	1,41E+08	0	13,00	0	1,05067
12	4,98	3,20	1,06E+08	1,83E+06	1,08E+08	4,97	11,77	0,73	1,04550
18	4,81	3,08	1,04E+08	0,00E+00	1,04E+08	9,94	11,63	0,91	1,04491
24	4,74	3,73	1,24E+08	1,83E+06	1,26E+08	13,01	11,48	0,99	1,0429
30	4,73	6,65	2,21E+08	3,66E+06	2,25E+08	19,92	10,21	1,61	1,03901
36	4,65	6,17	2,09E+08	0,00E+00	2,09E+08	24,47	9,57	2,01	1,03637
42	4,63	4,11	1,39E+08	0,00E+00	1,39E+08	32,71	8,70	2,71	1,03280
54	4,63	3,35	1,12E+08	1,83E+06	1,13E+08	37,86	8,02	3,15	1,03002
60	4,61	3,14	1,06E+08	0,00E+00	1,06E+08	40,21	7,69	3,33	1,02868
72	4,62	2,29	7,59E+07	9,15E+05	7,69E+07	44,23	7,13	3,69	1,02641
84	4,6	1,80	5,95E+07	9,15E+05	6,04E+07	49,92	6,37	4,2	1,02334
96	4,58	1,29	4,30E+07	0,00E+00	4,30E+07	52,72	6,21	4,43	1,02270
108	4,57	2,04	6,68E+07	1,83E+06	6,86E+07	56,67	5,26	4,69	1,01889
120	4,56	1,53	5,12E+07	0,00E+00	5,12E+07	61,80	4,53	5,19	1,01596

Tabela A2.6: Fermentação do mosto com banana nas condições: Concentração inicial de açúcares:13,5°P; Temperatura: 12,5°C. (Ensaio 6 do item 5.2).

Tempo (h)	pH	Células (g/L)	Células Viáveis (cel/mL)	Células não Viáveis (cel/mL)	Células Totais (cel/mL)	Grau Aparente de fermentação (%)	Extrato Aparente (°P)	Etanol (%v/v)	Densidade (g/mL)
0	4,84	1,95	6,56E+07	0,00E+00	6,56E+07	0	13,47	0	1,05265
6	4,83	4,14	1,40E+08	0,00E+00	1,40E+08	0	12,94	0	1,05041
12	4,96	3,14	1,06E+08	1,82E+06	1,07E+08	5,40	11,71	0,73	1,04525
18	4,79	3,08	1,04E+08	0,00E+00	1,04E+08	10,81	11,57	0,91	1,04468
24	4,72	3,67	1,24E+08	1,82E+06	1,26E+08	14,15	11,43	0,99	1,04406
30	4,71	6,53	2,21E+08	3,64E+06	2,24E+08	21,66	10,16	1,60	1,03880
36	4,63	6,17	2,09E+08	0,00E+00	2,08E+08	26,61	9,52	1,99	1,03816
42	4,61	4,11	1,39E+08	0,00E+00	1,38E+08	35,57	8,66	2,69	1,03265
54	4,61	3,32	1,12E+08	1,82E+06	1,13E+08	41,17	7,98	3,13	1,02966
60	4,59	3,14	1,06E+08	0,00E+00	1,06E+08	43,72	7,65	3,32	1,02852
72	4,60	2,26	7,59E+07	9,10E+05	7,65E+07	48,10	7,09	3,68	1,02825
84	4,58	1,77	5,95E+07	9,10E+05	6,01E+07	54,29	6,34	4,18	1,02652
96	4,56	1,29	4,30E+07	0,00E+00	4,28E+07	57,33	6,18	4,41	1,02258
108	4,55	1,99	6,68E+07	1,82E+06	6,83E+07	61,62	5,23	4,67	1,02225
120	4,54	1,53	5,12E+07	0,00E+00	5,10E+07	67,20	4,51	5,17	1,01590

Tabela A2.7: Fermentação do mosto com banana nas condições: Concentração inicial de açúcares:13,5°P; Temperatura: 12,5°C. (Ensaio 7 do item 5.2).

Tempo (h)	pH	Células (g/L)	Células Viáveis (cel/mL)	Células não Viáveis (cel/mL)	Células Totais (cel/mL)	Grau Aparente de fermentação (%)	Extrato Aparente (°P)	Etanol (%v/v)	Densidade (g/mL)
0	4,91	1,98	6,65E+07	0,00E+00	6,65E+07	0	13,67	0	1,05475
6	4,90	4,20	1,42E+08	0,00E+00	1,42E+08	0	13,13	0	1,05121
12	5,03	3,23	1,07E+08	1,85E+06	1,09E+08	5,48	11,88	0,74	1,04787
18	4,86	3,11	1,05E+08	0,00E+00	1,05E+08	10,97	11,75	0,92	1,04737
24	4,79	3,79	1,26E+08	1,85E+06	1,28E+08	14,36	11,60	1,01	1,04678
30	4,78	6,70	2,24E+08	3,70E+06	2,27E+08	21,99	10,31	1,63	1,03942
36	4,70	6,23	2,11E+08	0,00E+00	2,11E+08	27,01	9,67	2,02	1,03678
42	4,68	4,14	1,40E+08	0,00E+00	1,40E+08	36,11	8,79	2,74	1,03317
54	4,68	3,41	1,13E+08	1,85E+06	1,15E+08	41,79	8,10	3,18	1,03035
60	4,66	3,17	1,07E+08	0,00E+00	1,07E+08	44,38	7,76	3,37	1,02897
72	4,67	2,31	7,67E+07	9,24E+05	7,76E+07	48,82	7,20	3,73	1,02961
84	4,65	1,82	6,01E+07	9,24E+05	6,10E+07	55,11	6,43	4,24	1,02689
96	4,63	1,30	4,34E+07	0,00E+00	4,34E+07	58,20	6,27	4,47	1,02624
108	4,62	2,06	6,75E+07	1,85E+06	6,93E+07	62,55	5,31	4,74	1,02253
120	4,61	1,55	5,18E+07	0,00E+00	5,18E+07	68,22	4,57	5,25	1,01614

Tabela A2.8: Fermentação do mosto com banana nas condições: Concentração inicial de açúcares:13,5°P; Temperatura: 12,5°C. (Ensaio 8 do item 5.2).

Tempo (h)	pH	Células (g/L)	Células Viáveis (cel/mL)	Células não Viáveis (cel/mL)	Células Totais (cel/mL)	Grau Aparente de fermentação (%)	Extrato Aparente (°P)	Etanol (%v/v)	Densidade (g/mL)
0	4,87	1,97	6,61E+07	0,00E+00	6,61E+07	0	13,57	0	1,05307
6	4,86	4,17	1,41E+08	0,00E+00	1,41E+08	0	13,04	0	1,05083
12	4,99	3,20	1,06E+08	1,84E+06	1,08E+08	5,45	11,80	0,73	1,04583
18	4,82	3,11	1,05E+08	0,00E+00	1,05E+08	10,89	11,66	0,92	1,04504
24	4,75	3,76	1,25E+08	1,84E+06	1,27E+08	14,26	11,52	1,00	1,04445
30	4,74	6,68	2,22E+08	3,67E+06	2,26E+08	21,84	10,24	1,62	1,03914
36	4,66	6,17	2,09E+08	0,00E+00	2,09E+08	26,82	9,60	2,01	1,03649
42	4,64	4,11	1,39E+08	0,00E+00	1,39E+08	35,86	8,73	2,72	1,03292
54	4,64	3,38	1,12E+08	1,84E+06	1,14E+08	41,50	8,04	3,16	1,03010
60	4,62	3,14	1,06E+08	0,00E+00	1,06E+08	44,07	7,71	3,35	1,02878
72	4,63	2,29	7,62E+07	9,18E+05	7,71E+07	48,49	7,15	3,71	1,02649
84	4,61	1,81	5,97E+07	9,18E+05	6,06E+07	54,72	6,39	4,21	1,02342
96	4,59	1,29	4,31E+07	0,00E+00	4,31E+07	57,79	6,23	4,44	1,02278
108	4,58	2,05	6,70E+07	1,84E+06	6,88E+07	62,12	5,28	4,71	1,01897
120	4,57	1,54	5,14E+07	0,00E+00	5,14E+07	67,74	4,54	5,21	1,01602

Apêndice 06. Resultados do Ensaio Experimental Otimizado do item 5.4

Estes resultados são referentes ao ponto experimental otimizado nos mini-bioreatores cilíndricos da UMinho – Portugal.

Tabela A3.1- Evolução dos valores ajustados da Concentração Celular (g/L) com o tempo de fermentação (h) do mosto com banana para o cálculo dos valores de μ_x (h^{-1}) no ponto ótimo.

Tempo	[X]	dx/dt	μ_x
0	1,19	0,000	0,000
8	1,25	0,006	0,004
16	1,28	0,009	0,007
24	1,40	0,031	0,022
32	1,78	0,069	0,039
40	2,51	0,078	0,031
48	3,03	0,030	0,010
56	2,99	-0,072	-0,024
64	1,87	-0,131	-0,070
72	0,95	-0,075	-0,084
80	0,66	-0,024	-0,036
88	0,52	-0,012	-0,024
96	0,46	-0,004	-0,010
104	0,45	-	-

Tabela A3.2 Evolução dos valores ajustados da Concentração de Extrato Aparente (g/L) com o tempo de fermentação (h) do mosto com banana para o cálculo dos valores de μ_s ($g_s/g_x.h$) no ponto ótimo.

Tempo	[S]	ds/dt	μ_s
0	176,16	0,000	0,000
8	169,33	-1,165	0,932
16	151,09	-1,188	0,928
24	144,08	-1,134	0,810
32	130,47	-1,995	1,121
40	109,91	-2,154	0,858
48	94,7	-1,345	0,444
56	86,04	-0,934	0,312
64	79,48	-0,673	0,360
72	75,02	-0,512	0,568
80	71,27	-0,408	0,618
88	68,46	-0,199	0,382
96	67,96	-0,014	0,030
104	68,24	-	-

Tabela A2.3. Evolução dos valores ajustados da Concentração de Etanol (g/L) com o tempo de fermentação (h) do mosto com banana para o cálculo dos valores de μ_s ($g_p/g_x.h$) no ponto ótimo.

Tempo	[P]	dp/dt	μ_p
0	0	0,000	0,000
8	1,35	0,303	0,243
16	5,05	0,495	0,387
24	9,29	0,684	0,488
32	16,5	0,983	0,552
40	25,15	1,066	0,425
48	33,56	0,757	0,250
56	38,13	0,561	0,188
64	42,54	0,362	0,193
72	44,22	0,174	0,193
80	45,33	0,125	0,189
88	46,22	0,075	0,145
96	46,54	0,015	0,033
104	46,46	-	-

Tabela A3.4. Consumo do Extrato Aparente ($^{\circ}P$) com as produções de Etanol (%v/v) e Células Totais em Suspensão (Cel/mL) no decorrer do tempo de fermentação do mosto com banana, para o ponto ótimo.

Tempo	[Extrato Aparente]	[Etanol]	Células Totais
0	16,55	0,00	4,0E+7
8	16,28	0,07	4,2E+7
16	13,96	0,67	4,3E+7
24	13,85	1,06	5,4E+7
32	12,59	2,07	6,0E+7
40	10,04	3,21	8,4E+7
48	9,08	4,34	1,0E+8
56	8,35	4,79	1,0E+8
64	7,71	5,49	6,3E+7
72	7,30	5,61	3,1E+7
80	6,96	5,74	2,2E+7
88	6,65	5,88	1,7E+7
96	6,65	5,88	1,5E+7
104	6,65	5,88	1,5E+7