



CATÓLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FABRICO DE MOSTO DE CERVEJA

por

Verónica Coelho Guimarães Rodrigues

outubro 2021



CATÓLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FABRICO DE MOSTO DE CERVEJA

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da
Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar

por

Verónica Coelho Guimarães Rodrigues

Supervisor/a (Empresa): Eng.^a Cláudia Teixeira
Orientador/a (Universidade): Doutora Conceição Hogg

outubro 2021

Resumo

Este projeto foi desenvolvido na empresa Super Bock Bebidas S.A., no Departamento da Qualidade do Centro de Produção de Cerveja de Leça do Balio, tendo como objetivo melhorar o controlo da atenuação limite: obter valores superiores e menor tempo de brassagem. Este projeto foi dividido em duas partes. A primeira consistiu no estudo bibliográfico, e no acompanhamento do processo industrial, onde foi realizada uma caracterização da situação atual e uma análise do histórico de resultados. A segunda parte focou-se na otimização da atividade enzimática, usando como variáveis o pH e a temperatura.

A etapa da brassagem é a etapa mais importante no processo de produção do mosto. Tem como principal finalidade a conversão do amido presente nas matérias-primas num extrato solúvel com açúcares fermentáveis, por meio de ação enzimática. A propriedade mais importante das enzimas é a sua atividade na quebra de ligações químicas. Conhecendo os fatores que influenciam a atividade enzimática na brassagem é possível otimizar a formação de açúcares fermentescíveis. A atividade enzimática é principalmente influenciada pela temperatura e tempo de brassagem, pH e rácio água/cereais. Com a identificação destes parâmetros e, após um acompanhamento detalhado do processo de fabrico do mosto, foram identificadas oportunidades de melhoria no processo e foram definidas três ações a implementar: otimização dos valores de pH na empastagem, introdução de patamar de sacarificação a 72°C e diminuição do tempo no patamar de ação da β -amilase. Com as alterações efetuadas foi possível a concretização do objetivo proposto para o projeto.

Foi igualmente validada a utilização de um novo auxiliar enzimático que contém a enzima glucoamilase, para ser utilizada em épocas em que o grau de atenuação limite não está controlado, por exemplo, por alterações na qualidade do malte utilizado. Este objetivo foi alcançado, conhecendo-se a utilização da enzima: dosagem, diagrama de brassagem, grau de atenuação atingido, performance da fermentação e sem impacto no produto acabado.

Palavras-chave: brassagem, atividade enzimática, açúcares fermentescíveis, atenuação limite.

Abstract

This project was developed at Super Bock Bebidas, S.A, in the Quality Department in the Leça do Balio Beer Production center, with the objective of improving the control of attenuation: higher values and shorter brewing time. This project was divided into two parts. The first part consisted of bibliographic study and in the monitoring of the industrial process, where was performed the current characterization of the process and an analysis of the historical results. The second part focused on optimizing the enzymatic activity, using pH and temperature as variables.

The mashing step is the most important step in the wort production. The main purpose is the conversion of starch present in raw materials into a soluble extract with fermentable sugars, through enzymatic action. The most important property of enzymes is their activity in breaking chemical bonds. Understand the factors that have influence in the enzyme activity in the wort, it is possible to optimize the formation of fermentable sugars. Enzyme activity is mainly influenced by wort temperature and time, pH and quantity water/grist. With the identification of these parameters and, after a detailed monitoring of the wort production, opportunities for improvement the process were identified and defined three action to be implemented: optimization of pH values in mashing, introduction of saccharification step at 72°C and reduction of time at the β -amilase step. With the changes made, it was possible to achieve the proposed objective for the project.

It is also studying the use of a new enzymatic auxiliary containing the glucoamylase enzyme, to be utilized in times when the degree of attenuation limit is not controlled, for example, due to changes in the quality of the malt used. This objective was achieved, knowing the use of the enzyme: dosage, mashing diagram, degree of attenuation reached, fermentation performance and no impact on the finished product.

Keywords: mashing, enzyme activity, fermentable sugars, limit attenuation.

Agradecimentos

A experiência adquirida durante este estágio curricular foi muito enriquecedora, tanto a nível pessoal como profissional.

À Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto, pela qualidade de ensino e, em particular, à professora Conceição Hogg por todo o conhecimento e orientação ao longo deste percurso, e por nunca ter desistido de mim e da conclusão deste objetivo.

À empresa Super Bock Bebidas, S.A. por esta oportunidade. À minha orientadora, Cláudia Teixeira e à Ana Bela Pinheiro por toda a orientação, ajuda e disponibilidade demonstrada, pela disciplina, proatividade e muita paixão pelo mundo cervejeiro. Um obrigado especial à Cristina Silva por me encorajar para conclusão desta etapa da minha vida.

A todos os meus colegas da Direção da Qualidade.

À Dulce, Ana Isabel Ribeiro, Serafim Sales e Pedro Frias pela orientação e alegria ao longo deste percurso e por me permitirem fazer “parte da equipa”. Gostaria de agradecer a todos os técnicos de produção pela paciência e por toda a ajuda durante esta etapa, tiveram um papel fundamental no sucesso deste projeto.

Aos meus colegas estagiários, Sofia, Ricardo e Renato pelos fantásticos momentos que passamos juntos e por toda a paciência.

À minha família, namorado e amigos, pela força, apoio e motivação.

E a ti, pai. Pela tua força de viver, pela tua coragem e determinação. Obrigada por tudo o que me ensinaste. Se termino esta etapa é por ti. A tua força foi e é a minha força.

Índice

Resumo.....	2
Abstract	3
Agradecimentos.....	4
Lista de tabelas	7
Lista de abreviaturas.....	8
1. Introdução	9
1.1. Enquadramento e Apresentação do Projeto.....	9
2. Apresentação da empresa.....	11
3. Estado da Arte.....	12
3.1. Introdução.....	12
3.2. Processo industrial de produção de cerveja	12
3.2.1. Matérias-primas.....	12
3.2.2. Produção de mosto	14
3.2.3. Fermentação, maturação, estabilização a frio e enchimento	19
3.3. Processo de degradação enzimático – degradação do amido	21
3.3.1. Enzimas responsáveis pela degradação do amido - amilases.....	25
3.3.2. Fatores que influenciam a atividade enzimática	26
3.4. Brassagem com adjuntos	30
3.5. Utilização de auxiliares enzimáticos	30
4. Materiais e Métodos.....	32
4.1. Caracterização do objeto de estudo	32
4.2. Delineamento experimental.....	32
4.3. Parâmetros analisados e métodos laboratoriais	32
5. Resultados e Discussão	37
5.1. Caracterização da situação atual.....	37
5.2. Análise da situação atual vs histórico	39
5.3. Definição de propostas de ação e parte experimental.....	40
6. Conclusões gerais.....	53
7. Trabalho futuro	57
8. Bibliografia	58

Lista de figuras

Figura 1 - Etapas do Processo de Produção da Cerveja (Fonte: (Young, 2009)).....	14
Figura 2 - Exemplo de Brassagem por Infusão (Fonte: IFBM - French Institute of Beverages, Brewing and Malting).....	16
Figura 3 - Exemplo de Brassagem por Decoção (Fonte: IFBM - French Institute of Beverages, Brewing and Malting).....	17
Figura 4 - Estrutura do amido: amilose (Fonte: (Jespersen, 2008)).	21
Figura 5 - Estrutura do amido: amilopectina (Fonte: (Jespersen, 2008)).	22
Figura 6 - Etapas da degradação do amido (Fonte: (Kunze, 2014)).	23
Figura 7 - Degradação enzimática do amido (Fonte: (Briggs, 2004)).	26
Figura 8 - Degradação do Amido por α e β -amilase (Fonte: (Kunze, 2014))	26
Figura 9 - Fatores que influenciam a velocidade da reação enzimática (fonte IFBM - French Institute of Beverages, Brewing and Malting).	27
Figura 10 - Concentração de açúcares fermentescíveis (glicose, maltose e maltotriose) e a relação com a α -amilase e β -amilase, os patamares de temperatura e o tempo de empastagem (Stenholm <i>et al.</i> , 1996).	28
Figura 11 - Atividade da β -amilase depende na temperatura de brassagem e da duração do tempo de repouso (Fonte: Kunze, 2014).	29
Figura 12 - Resultado do teste do iodo a 72°C, foto da esquerda. Resultado do teste a 78°C, foto da direita.	48

Lista de tabelas

Tabela 1 - Parâmetros analisados em cada uma das fases de produção.	33
Tabela 2 - Situação atual dos parâmetros de controlo do mosto X, na Caldeira de Caldas.	38
Tabela 3 - Situação atual dos parâmetros de controlo do mosto X, na Caldeira de Empastagem.	38
Tabela 4 - Valores das especificações atuais e alvo teórico do pH nas caldeiras.	41
Tabela 5 - Resultados do pH empastagem griz, malte, mistura e % de atenuação limite, dos fabricos controlo e ensaio.	42
Tabela 6 - Resultados do extrato solúvel da dreche e % atenuação limite do mosto, dos fabricos controlo e ensaio.	44
Tabela 7 - Resultados da % atenuação limite do mosto, dos fabricos controlo e ensaio.	45
Tabela 8 - Resultados da sacarificação do empaste e % atenuação limite do mosto, dos fabricos controlo e ensaio.	47
Tabela 9 - Resultados das análises à levedura em stockagem utilizada nos fabricos controlo e ensaio.	48
Tabela 10 - Resultados das análises físico-químicas em fermentação e tempo de redução do extrato durante a fermentação.	49
Tabela 11 - Resultados das análises em maturação.	50
Tabela 12 - Resultados das análises à levedura recolhida.	50
Tabela 13 - Resultados das análises de atenuação real, álcool, estabilidade de espuma e polifenóis totais do produto acabado.	51
Tabela 14 - Resultados das análises de diacetilo, SO ₂ e turvação do produto acabado.	51
Tabela 15 - Resultados das análises de acetaldeído e DMS do produto acabado.	51
Tabela 16 - Especificações após alteração da receita do mosto X.	54

Lista de abreviaturas

EBC - European Brewery Convention

LSE - Limite Superior da Especificação

LIE - Limite Inferior da Especificação

1. Introdução

1.1. Enquadramento e Apresentação do Projeto

O presente estágio foi desenvolvido numa envolvente empresarial no âmbito do Mestrado em Engenharia Alimentar da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa. Neste projeto são descritas as atividades e os projetos realizados na empresa Super Bock Group, bem como os seus resultados e conclusões. Também é apresentada uma pequena apresentação da empresa e uma revisão bibliográfica sobre o tema do projeto.

A cerveja é o resultado de um processo biotecnológico, tradicionalmente descontínuo, que engloba um conjunto de processos biológicos e enzimáticos, realizados com o apoio de diversas operações unitárias. O processo mais importante na produção da cerveja é a fermentação dos açúcares fermentescíveis contidos no mosto para formar o álcool e o dióxido de carbono e outros subprodutos com características sensoriais, através do metabolismo anaeróbio da levedura (Willaert, 2004).

O teor de açúcares presente no mosto está diretamente relacionado com a produção de álcool. Do ponto de vista tecnológico e económico, o conteúdo em açúcares fermentescíveis é um parâmetro determinante para os custos de produção e para a qualidade da cerveja.

Estes açúcares fermentescíveis são convertidos, por ação enzimática, durante a produção do mosto, na etapa da brassagem. Ao longo desta etapa ocorrem várias reações bioquímicas que promovem o desdobramento e conversão do amido em açúcares fermentescíveis, por ação de enzimas específicas, como a α e β amilase (Briggs, 2004). Todas as substâncias resultantes desta etapa que passam para a solução são referidas como extrato, como por exemplo açúcares, dextrinas, proteínas, substâncias inorgânicas, etc. A proporção de açúcares fermentescíveis está diretamente relacionada com a seleção das condições ótimas para a atividade enzimática. A atenuação limite é a percentagem de açúcares fermentescíveis presentes no extrato final do mosto (Kunze, 2014).

O primeiro objetivo deste projeto incidiu-se no estudo bibliográfico, caracterização do mosto em estudo e análise dos dados. Com base nesses dados foram propostas ações de otimização usando como variáveis do projeto o pH e a temperatura.

Paralelamente efetuaram-se ensaios para validação de um novo auxiliar enzimático. Esta solução tem um custo implícito, pela que a sua utilização é apenas como recurso para as épocas em que ocorrem desvios na atenuação inerentes ao processo.

Paralelamente foram ainda realizadas análises laboratoriais às leveduras utilizadas na fermentação. Este procedimento foi efetuado para o cálculo da percentagem de levedura viável com a finalidade de calibrar e colocar em funcionamento um equipamento industrial denominado “Aber”. Este equipamento irá permitir que todo o processo de sementeira seja automatizado, onde o cálculo da dosagem da quantidade de levedura será exato e automático. Este último foi calibrado durante o presente trabalho, mas, no final, ainda não tinha sido colocado em funcionamento.

Objetivos

O estágio está dividido em três ações e implementação das mesmas cujos objetivos são:

- Melhorar controlo da atenuação limite
 - Obter valores superiores de atenuação limite e dentro da especificação
 - Menor tempo de brassagem

Relativamente à validação de um novo auxiliar enzimático, o objetivo é o conhecimento da sua utilização (dosagem, receita de empastagem e atenuação atingida) sem impacto negativo no processo e nas características do mosto e produto acabado.

Devido à confidencialidade do trabalho, existem alguns parâmetros que não podem ser revelados por serem confidenciais.

2. Apresentação da empresa

A Super Bock Group é a maior empresa portuguesa de bebidas cuja atividade principal assenta nos negócios das cervejas e das águas engarrafadas. Mantém igualmente presença no segmento dos refrigerantes, sumos e vinhos. Outros segmentos da empresa são a produção e comercialização de malte e o negócio do turismo, possuindo os parques Lúdico-Termas de Vidago e de Pedras Salgadas.

A Super Bock Group é uma empresa de capital maioritariamente português, em que 56% das ações pertencem ao grupo VIACER e 44% ao grupo Carlsberg.

A missão da empresa é a dedicação à produção de bebidas e ao desenvolvimento de marcas, a inovação, o crescimento e valorização das pessoas e das marcas e a contribuição para o desenvolvimento sustentável, obtendo o reconhecimento e a valorização adequados por parte da comunidade e dos acionistas.

A empresa está dividida nas seguintes áreas: Administrativo-Financeira, Comercial, Marketing, Turismo, Brewers Company, Maltibérica e Supply Chain. A última divide-se em vários departamentos, tais como a Produção e Qualidade, Ambiente e Segurança.

O projeto foi concretizado nas instalações da Super Bock Bebidas, S.A., no centro de produção de cervejas de Leça do Balio, em Matosinhos, no Departamento da Qualidade, Ambiente e Segurança mais concretamente na área dos Serviços Técnicos.

3. Estado da Arte

3.1. Introdução

De acordo com a legislação portuguesa, a cerveja é uma bebida obtida através da fermentação alcoólica de um mosto preparado a partir de cereais, principalmente cevada, e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, ao qual foram adicionadas flores de lúpulo ou os seus derivados e água potável (Placeholder1) (Briggs, 2004). A fermentação é realizada pela ação de leveduras selecionadas do género *Saccharomyces cerevisiae* (Briggs, 2004). Segundo a Portaria nº1/96 de 3 de janeiro, o tipo de cerveja é definido de acordo com o teor alcoólico e com o extrato primitivo.

3.2. Processo industrial de produção de cerveja

3.2.1. Matérias-primas

As principais matérias-primas para a produção de cerveja são o malte, a água, o lúpulo e a levedura.

O malte obtém-se a partir da cevada e é o elemento básico para a produção de cerveja, conferindo propriedades visuais, gustativas e olfativas específicas à cerveja (Kunze, 2014). Apresenta um elevado conteúdo de amido, o teor adequado de proteínas (9-11,5%) e é a principal fonte de enzimas que quebram o amido presente, convertendo-o em açúcares fermentescíveis (Eßlinger, 2009).

A água é indubitavelmente a principal matéria-prima da cerveja em termos quantitativos. Posto isto a qualidade da água utilizada no fabrico da cerveja é um fator muito importante e existem vários parâmetros fundamentais que devem ser assegurados para a qualidade do produto final: a água deve ser potável, insípida e inodora e apresentar uma composição química equilibrada em relação aos catiões (cálcio, magnésio e sódio) e aos aniões (carbonato, bicarbonato, cloreto e sulfato) (Briggs, 2004). O conteúdo de sais dissolvidos e o pH são os parâmetros mais importantes a avaliar na água. Por exemplo, o cálcio estabiliza a atividade enzimática durante a brassagem, auxiliando ainda na floculação da levedura, na estabilidade e na clarificação da cerveja. O magnésio permite a redução do pH do mosto, para além de ser cofator de várias enzimas que atuam durante a fermentação (Kunze, 2014).

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta aromática que confere à cerveja o aroma e o amargo característicos. Contribui, igualmente, para a estabilização da espuma e precipitação de proteínas

e para a estabilidade microbiológica uma vez que protege a cerveja contra contaminações microbiológicas (Eßlinger, 2009).

A levedura é um fungo maioritariamente unicelular. As utilizadas na indústria cervejeira pertencem todas ao género *Saccharomyces*. As leveduras podem ser classificadas com base no seu comportamento ao flocular, ou seja, leveduras de fermentação baixa (*lager*) e de fermentação alta (*ale*). As leveduras *ale* são conhecidas como *Saccharomyces carlsbergensis*, enquanto que as leveduras *lager* como *Saccharomyces cerevisiae* (Flickinger, 1999).

Para além do malte podem ser utilizadas matérias-primas secundárias, denominados de adjuntos, como o caso do *gritz*. Este tipo de cereal não possui enzimas e é composto por mais de 75% de amido. Desta forma, deve ser misturado com o malte no processo de fabrico do mosto, para que o amido nele presente seja hidrolisado pelas enzimas presentes no malte (Briggs, 2004). A utilização do *gritz* tem como primordial finalidade a diminuição da percentagem de proteínas, lípidos e polifenóis existentes no mosto, reduzindo o aparecimento de turvação no produto acabado. Providenciam, ainda, uma vantagem económica pois fornecem extrato de uma forma menos dispendiosa comparativamente com o malte (Kristiansen, 2011). Devido à lei de *Reinheitsgebot* (Lei de Pureza Alemã) que normatiza a produção de cervejas a partir do uso de apenas quatro ingredientes: água, malte, lúpulo e levedura, ocasiona a proibição do uso de adjuntos em alguns países (Briggs, 2004).

A qualidade destas matérias-primas é decisiva na qualidade do produto final e o conhecimento das suas propriedades, e o seu efeito no processamento e no produto, possibilita otimizar o seu manuseamento e controlo de todo o processo de fabrico (Kunze, 2014).

O processo de produção da cerveja é constituído por várias etapas, apresentadas na Figura 1, cada uma com características e funções específicas que determinam a qualidade do produto final. Cada uma destas etapas será descrita de seguida, sendo que a etapa da brassagem será abordada mais detalhadamente pois é esta etapa que contempla o foco do presente projeto.

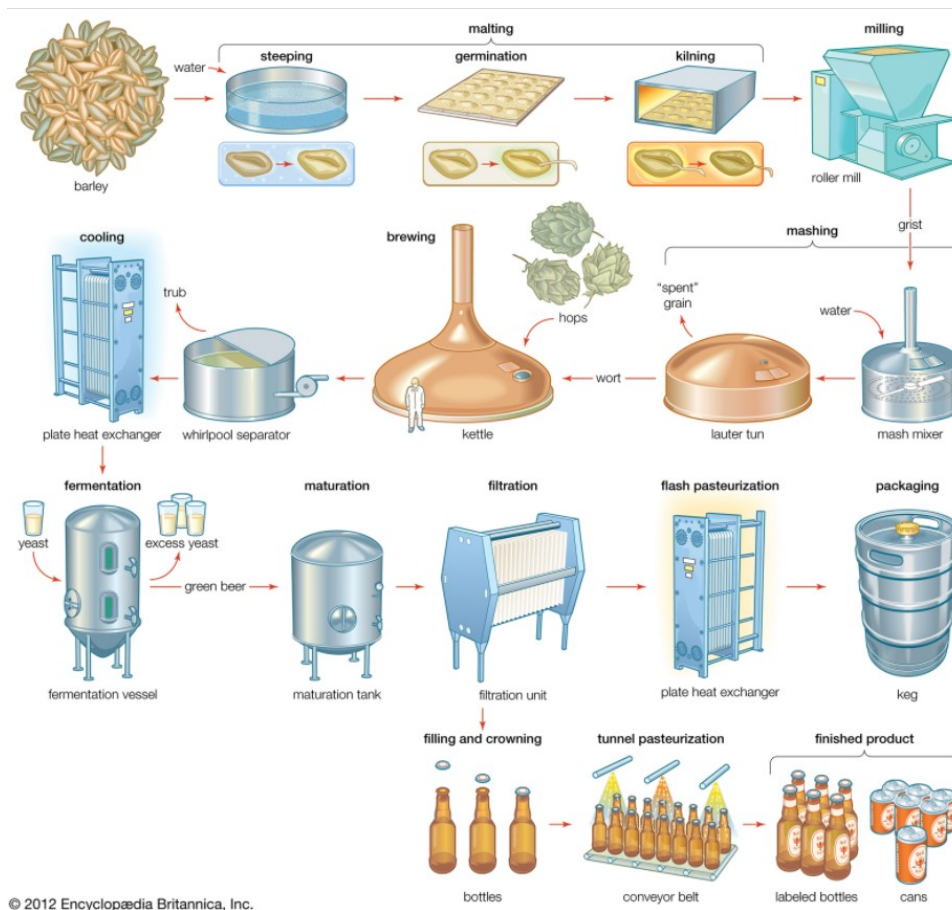


Figura 1 - Etapas do Processo de Produção da Cerveja (Fonte: (Young, 2009)).

3.2.2. Produção de mosto

O processo de fabrico do mosto inicia-se com a receção e ensilagem das matérias-primas, como por exemplo, o malte, a cevada e o *gritz*. A utilização do malte pressupõe a sua moagem e a pesagem. Relativamente ao *gritz*, este já é rececionado na granulometria especificada (não sendo por isso necessário proceder à moagem) ficando em condições de ser utilizado após a pesagem.

A produção e a moagem dos grãos de malte é uma tecnologia que está diretamente relacionada com o processo produtivo da cerveja, uma vez que é esta matéria-prima que fornece um dos principais ingredientes para a sua produção – o amido. A moagem tem como finalidade a desintegração completa das paredes celulares do endosperma, tornando o amido e todos os seus elementos mais acessíveis à ação enzimática (Kunze, 2014).

A etapa que se segue é a brassagem e engloba todo o processo de empastagem e sacarificação. Existem diversos fatores que influenciam a qualidade e o rendimento da brassagem e que devem ser considerados para a tecnologia da brassagem. Dentro deles evidenciam-se: a qualidade do

malte e dos possíveis adjuntos utilizados, a composição e características químicas da água usada, a relação água/quantidade de matéria sólida (concentração do mosto), a variabilidade de tempos/temperaturas no decorrer do processo e o pH do mosto durante esta etapa (Kunze, 2014).

Esta etapa é realizada em caldeiras de aço inoxidável ou cobre, aquecidas por água ou vapor. Resumidamente, nesta etapa ocorre a mistura do malte moído com a água – obtendo-se o empaste - que é aquecido passo a passo até atingir as temperaturas ideais para a atividade enzimática de certas enzimas. Assim, a brassagem consiste num acréscimo da temperatura, seguido de fases de estacionamento – designados patamares – que promovem determinadas reações (Willaert, 2004).

O primeiro patamar, designado por patamar proteolítico, entre 45-52°C, favorece a atuação de proteases e β -glucanases. O patamar seguinte, patamar amilolítico, promove essencialmente a atuação da β -amilase para a formação de maltose e ocorre entre 61-63°C. De referir que, nesta fase, a α -amilase também está ativa, possibilitando a atuação da β -amilase. Este é o patamar essencial para a formação de açúcares fermentescíveis, pelo que as reações que ocorrem nele serão abordadas mais detalhadamente no ponto 3.3. O patamar seguinte, 70-72°C, favorece a atuação da α -amilase e, por fim, um pequeno período a 75-78°C garante a total sacarificação e inativação das enzimas (Kunze, 2014).

As caldeiras possuem pás de agitação – agitadores – que possuem um papel preponderante nesta fase pois garantem uma mistura eficaz e homogénea durante a brassagem. Caso não ocorra agitação (ou quando esta não ocorre eficazmente) durante o período de estabilização entre temperaturas, a mistura produzida não será homogénea (Tom A. Bringhurst, 2003). Nesta etapa a frequência do agitador nas caldeiras deve ser controlada, assim como a oxidação durante a brassagem que tem um elevado impacto na estabilidade organolética da cerveja (Willaert, 2004).

O tempo e as temperaturas da brassagem podem variar consoante o tipo de cerveja a produzir e a qualidade do malte (e adjuntos) utilizados (O'Rourke, 2011). Dependendo do diagrama de empastagem, os processos de brassagem podem ser classificados em dois tipos: por infusão ou por decocção (Kunze, 2014).

Brassagem por infusão

O processo por infusão é o processo de brassagem mais simples e está apresentado na Figura 2. Neste método o mosto é todo aquecido numa caldeira, com períodos de estabilização a uma dada temperatura, considerando as propriedades das enzimas, até ser atingida a temperatura final do processo (Willaert, 2004).

Do ponto de vista das operações unitárias, o método de infusão implica a mistura e hidratação do empaste, reações enzimáticas e separação sólido-líquido e líquido-sólido (Briggs, 2004).

Este processo ocorre apenas numa caldeira de empastagem, e como o empaste não é bombeado a injeção de ar é inexistente. Este facto é vantajoso pois o oxigénio presente durante a brassagem provoca a oxidação dos ácidos gordos insaturados o que conduz a efeitos negativos na estabilidade do sabor da cerveja (Kunze, 2014). Para além desta vantagem, o processo é facilmente automatizado e monitorizado e requer menos 20-30% de energia do que o processo de decocção (Briggs, 2004). No entanto, o processo torna-se desvantajoso pois existe a possibilidade de o rendimento do extrato ser mais baixo (Reichelt, 1983).

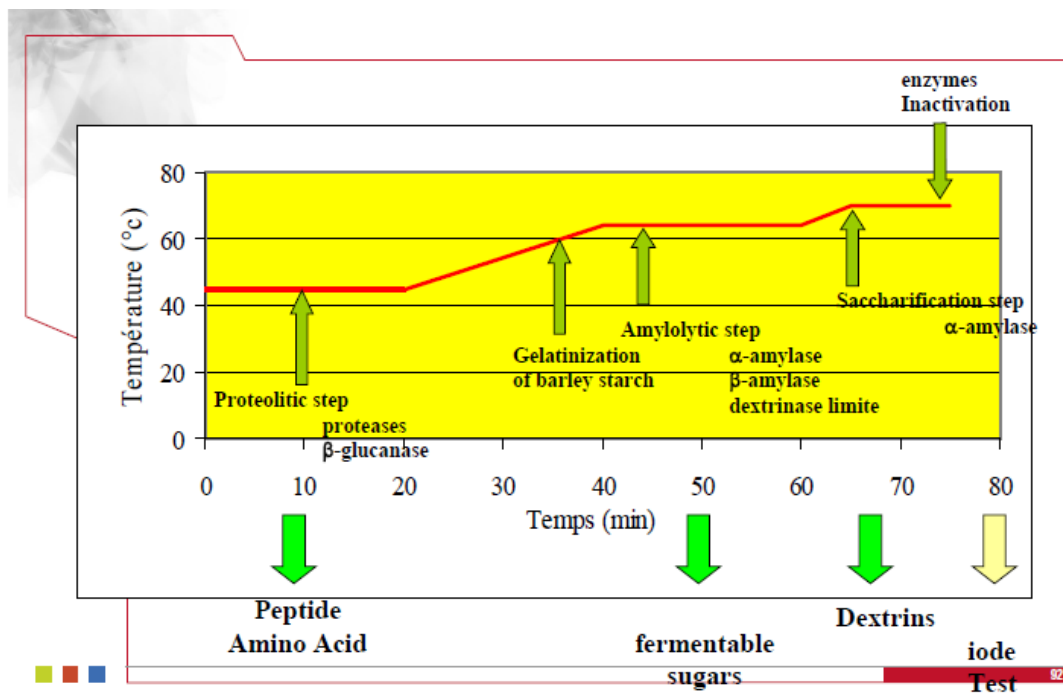


Figura 2 - Exemplo de Brassagem por Infusão (Fonte: IFBM - French Institute of Beverages, Brewing and Malting).

Brassagem por decocção

No processo de decocção, representado na figura 3, o empaste não é todo aquecido à mesma temperatura. Neste processo, uma parte do empaste é aquecido separadamente (Kunze, 2014). Após ser atingida a temperatura de ebulição, a parte do mosto que sofreu o aquecimento em separado é bombeado para o interior da caldeira. Deste modo, a temperatura do empaste total sofre um aumento de temperatura até atingir o patamar seguinte (Willaert, 2004).

No método por decocção, as operações unitárias designam-se pelo aquecimento adicional do empaste, o envio deste para a caldeira de empastagem e posteriormente pela mistura do empaste (Briggs, 2004).

Dependendo do número de ebulições efetuadas, os métodos de decocção podem ser classificados em simples, duplo ou triplo (Reichelt, 1983). Atualmente, apenas os processos de decocção simples e duplo são utilizados, pois a brassagem por decocção tripla consome muita energia e só é realizada na produção de algumas cervejas especiais (Willaert, 2004).

A brassagem pelo método de decocção detém os seguintes efeitos: menor rotura de proteínas no mosto fervido devido ao rápido aquecimento; etapa de gelatinização e liquidificação do amido mais extensa; aumento da extração de cascas e da formação de melanoidina (substância responsável, em parte, pela percepção da qualidade de alimentos ao influenciar a cor, odor e sabor); aumento da remoção de dimetil-sulfeto (DMS), que possui um odor desagradável e característico e aumento da inativação enzimática no mosto (Willaert, 2004).

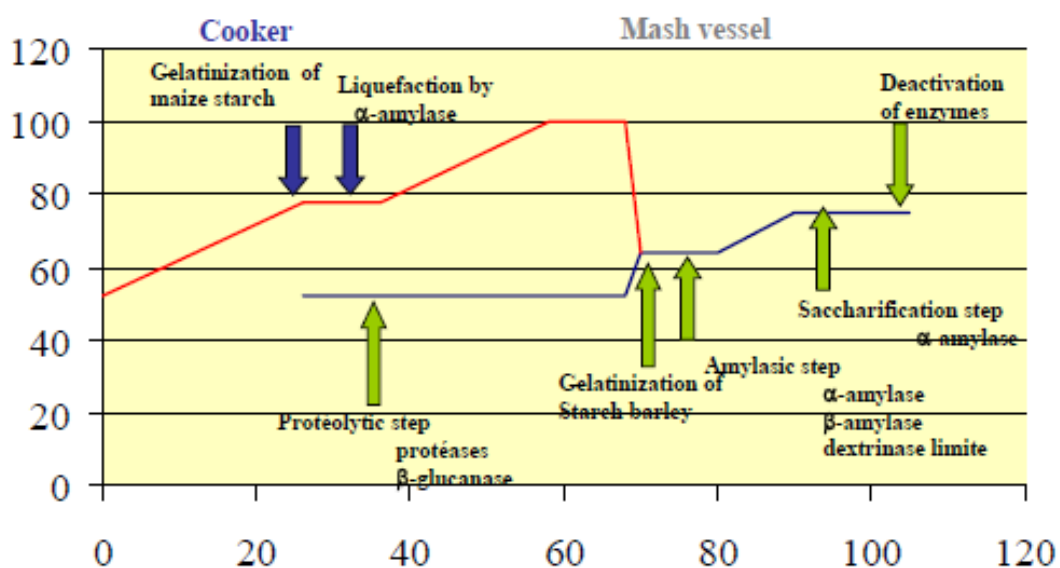


Figura 3 - Exemplo de Brassagem por Decocção (Fonte: IFBM - French Institute of Beverages, Brewing and Malting).

Como referido anteriormente, na etapa da brassagem ocorrem várias reações enzimáticas, sendo que as quatro principais são: a hidrólise das proteínas em péptidos e aminoácidos livres, a degradação das cadeias de β -glucanas e a degradação do amido gelatinizado em hidratos de carbono fermentáveis (Kunze, 2014). Tendo em conta o objetivo deste trabalho será abordado mais detalhadamente o processo de degradação do amido e a atividade enzimática.

A inativação enzimática corresponde à fase final da brassagem que visa a paragem da atuação enzimática. Durante esta etapa é de extrema importância a temperatura não ultrapassar os 80°C para não ocorrer uma extração acentuada de polifenóis, que provocarão adstringência à cerveja (Briggs, 2004).

Após a etapa da brassagem ocorre a filtração do mosto que tem como finalidade a separação da mistura proveniente da brassagem. Essa mistura contém substâncias dissolvidas e outras não dissolvidas que são necessárias separar, ou seja, a filtração desagrega a parte insolúvel (dreche) do filtrado (mosto) (Paludan-Müller, 2009). Esta separação é fundamental uma vez que apenas o mosto, ou seja, a parte aquosa da solução, consequente da extração e da hidrólise do amido, será utilizado para produzir cerveja (Briggs, 2004). A dreche, designada como subproduto da filtração do mosto, constituída por resíduos do malte moído, cascas e substâncias que ficaram retidas no processo, vai ser rejeitada. Este subproduto pode ser vendido como ração animal (Paludan-Müller, 2009). A filtração é efetuada num filtro prensa ou numa cuba filtro, tendo uma duração de cerca de 2-3 horas, a uma temperatura de 75-80°C. Esta fase é fundamental no processo produtivo da cerveja, uma vez que o grau de eficiência da filtração afeta diretamente a qualidade da cerveja final. Após a filtração do mosto, este é enviado para o tanque tampão onde fica armazenado.

O mosto armazenado no tanque tampão é transferido para a caldeira de ebulição. A etapa da ebulição tem como principal função a estabilização da composição do mosto, nomeadamente, isomerização dos compostos derivados do lúpulo, esterilização do mosto, inativação das enzimas, precipitação de proteínas de peso molecular elevado, formação de complexos de proteínas/polifenóis, formação de complexos de cor (reação de *Maillard*), redução do pH do mosto, eliminação de substâncias voláteis indesejáveis como por exemplo o dimetilsulfureto (DMS) e concentração final de extrato do mosto através da evaporação da água (Eßlinger, 2009) (Kunze, 2014). É importante que o mosto seja fervido e agitado para evitar a permanência de sedimento, designado de *trub*, no mosto (Briggs, 2004). Após o término desta fase, o mosto contém precipitado proteico e fragmentos suspensos de lúpulo não solubilizado. Estes

componentes devem ser separados do mosto quente para garantir que o *flavour* e a estabilidade coloidal da cerveja não sejam comprometidos. Para ocorrer esta separação, o mosto é enviado para um decantador onde repousa durante alguns minutos. Desta forma, os componentes mencionados agregam-se e sedimentam, constituindo o *trouble* (Briggs, 2004). Este precipitado recolhido pode ser novamente introduzido no processo de fabricação do mosto, na fase de sacarificação, para rentabilizar o processo de fabricação.

No fim do processo produtivo do mosto obtém-se um mosto limpo, lupulado e rico em açúcares fermentescíveis pronto para ser submetido à próxima etapa que ocorre na adega.

3.2.3. Fermentação, maturação, estabilização a frio e enchimento

Findadas todas as etapas do processo de fabricação do mosto, o mosto é enviado para a unidade da adega onde ocorrem as etapas de fermentação, maturação e estabilização a frio em cubas de fermentação, seguindo-se a etapa de clarificação (Briggs, 2004).

Primeiramente o mosto é arrefecido para temperaturas próximas da temperatura inicial de fermentação, de 9 a 15°C (temperatura ideal para o desenvolvimento da levedura), e é arejado em condições estéreis, de modo a que sejam satisfeitas as necessidades de levedura em oxigénio, nutriente fundamental para a reconstituição da parede da célula e do seu crescimento (Eßlinger, 2009). Após o arrefecimento e inoculação da levedura no mosto, o mosto é enviado para as cubas onde se inicia a etapa da fermentação.

A fermentação é a etapa mais importante de todo o processo cervejeiro uma vez que inclui a operação durante a qual os açúcares do mosto, por ação da levedura, são transformados em álcool e dióxido de carbono. A etapa de fermentação divide-se em duas fases: a fase aeróbia onde ocorre a multiplicação da levedura e a fase anaeróbia onde ocorre a conversão dos açúcares em etanol e dióxido de carbono (Kunze, 2014). O processo é iniciado pela fase denominada “*lag*” ou de respiração, seguindo-se a fase de crescimento, caracterizada essencialmente pela multiplicação intensa das células de levedura, fase de fermentação e por último a fase estacionária, que ocorre quando os agregados de células de levedura sedimentam no fundo da cuba de fermentação. O fim da fermentação ocorre quando já não existem açúcares fermentescíveis na cerveja (Kunze, 2014) (Eßlinger, 2009). Paralelamente à transformação do açúcar em álcool e dióxido de carbono são produzidas outras substâncias, nomeadamente ésteres, ácidos e álcoois superiores responsáveis pelo aroma e sabor da cerveja. No término da fermentação do mosto observa-se uma diminuição do pH e uma redução substancial das

concentrações de açúcares, aminoácidos e vitaminas, contrabalançando com um aumento da concentração de etanol produzido. Estas características fazem da cerveja um meio pouco adequado para o desenvolvimento de bactérias (Briggs, 2004).

Após obtido o mosto fermentado é necessário eliminar as substâncias indesejáveis provenientes da fermentação com o objetivo de melhorar as características do produto final (Willaert, 2004). Assim, após a etapa de fermentação segue-se a etapa de maturação, que consiste no arrefecimento e posterior armazenamento da cerveja a baixas temperaturas, próximas de 0°C, a fim de permitir a libertação e redução de compostos voláteis indesejáveis, nomeadamente o diacetilo, ácido sulfídrico e aldeído acético. Esta fase é caracterizada por um repouso prolongado e contribui para melhorar a clarificação e amadurecimento do aroma e sabor da cerveja, tornando-os mais subtis (Briggs, 2004).

A estabilização é a etapa seguinte e realiza-se a temperaturas perto do ponto de congelação. Esta etapa consiste em promover a agregação e precipitação dos percursores de turvação na cerveja em garrafa, tais como complexos de proteínas, polifenóis e levedura possibilitando, desta forma, a sua remoção, permitindo um equilíbrio coloidal da cerveja (Briggs, 2004).

A etapa que se segue é a etapa de filtração também designada por clarificação. Esta fase tem como objetivo a remoção da levedura residual e das restantes partículas de turvação em suspensão, de modo a clarificar a cerveja (Eßlinger, 2009). Para além da redução da turvação esta etapa também confere estabilidade biológica e química à cerveja (Kunze, 2014). No final deste processo a cerveja está límpida e pronta para ser enviada para os tanques de cerveja filtrada (designados TCF's) onde permanece armazenada.

O enchimento é a última etapa de todo o processo. A cerveja pode ser acondicionada em garrafa, lata ou barril. Durante o enchimento, a incorporação de oxigénio é cuidadosamente controlada. O processo mais utilizado para garantir a estabilidade microbiológica da cerveja, é a pasteurização. Esta pode ser realizada em túnel ou num permutador de calor, esta última designada por pasteurização *flash*. Também existem outras opções como o enchimento a quente e a filtração estéril (Kunze, 2014). Os últimos passos da etapa do enchimento são a rotulagem e o embalamento.

Durante todo o processo de produção da cerveja, e nas diversas etapas do processo, é efetuado um controlo de qualidade rigoroso que permite aferir o cumprimento dos parâmetros específicos de cada tipo de cerveja.

3.3. Processo de degradação enzimático – degradação do amido

A conversão eficiente do amido em açúcares é o principal determinante da eficiência cervejira, uma vez que o principal objetivo é produzir, das matérias-primas, o álcool pretendido (Kunze, 2014). O custo da matéria-prima é um dos principais componentes dos custos globais do funcionamento de uma cervejaria. Deste modo, a maximização do rendimento do seu fabrico torna-se essencial (O'Rourke, 2011).

Posteriormente à célula, o amido é a forma mais abundante de hidratos de carbono produzidos por plantas (Reichelt, 1983) e é a principal fonte de energia na dieta humana. Este pode ser encontrado em cereais, tais como trigo ou cevada. A composição e a estrutura do amido podem variar consoante o cereal escolhido, sendo que o tamanho e a configuração dos grânulos do amido têm uma influência bastante importante em vários parâmetros (Tom A. Bringham, 2003).

Este polímero é constituído por moléculas de glicose ligadas entre si formando dois tipos de polímeros: amilose e amilopectina. A amilose consiste numa cadeia não ramificada (linear) de ligação glicosídica α -1,4 (250-300 unidades de comprimento em forma de hélice). A amilopectina consiste numa cadeia ramificada de ligação glicosídica α -1,4 e α -1,6 (até 1000 unidades de comprimento) (Tom A. Bringham, 2003). A amilopectina é menos solúvel em água comparativamente à amilose (Briggs, 2004).

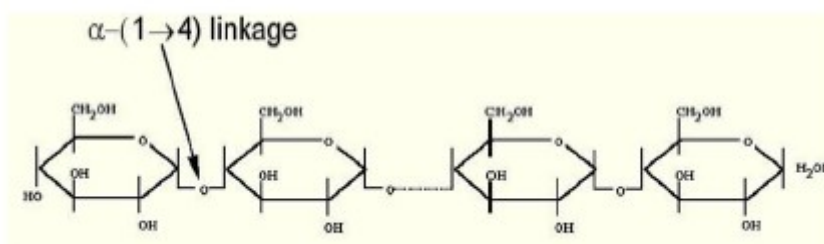


Figura 4 - Estrutura do amido: amilose (Fonte: (Jespersen, 2008)).

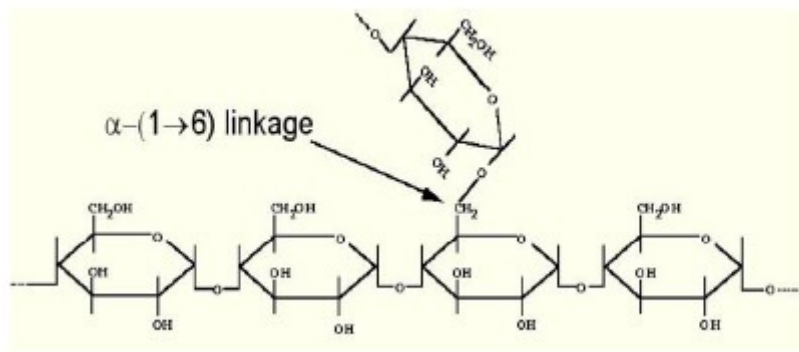


Figura 5 - Estrutura do amido: amilopectina (Fonte: (Jespersen, 2008)).

As quantidades relativas de amilose e amilopectina detêm uma forte interferência sobre as propriedades físicas e químicas do amido (Briggs, 2004). A quantidade destas cadeias afeta as características de processamentos dos cereais, tais como a temperatura de gelatinização, viscosidade e a tendência para retrogradação. Tal pode implicar um efeito grande sobre a eficiência de todo o processamento e, conseqüentemente, sobre o rendimento alcoólico (Tom A. Bringham, 2003) (Kunze, 2014).

A amilopectina tem muito menor suscetibilidade à retrogradação comparativamente à amilose. No entanto, sob condições extremas, tais como alta concentração de amido e temperaturas muito baixas, a amilopectina pode igualmente submeter a retrogradação. Contudo, esta pode ser, em certa medida, reversível. A amilopectina presente no milho é mais propensa à retrogradação do que a amilopectina presente na cevada ou no trigo (O'Rourke, 2011)

A degradação do amido ocorre em três etapas: gelatinização, liquefação e sacarificação ilustradas na figura 6. Esta sequência é imutável, mas ocorre simultaneamente. As principais enzimas envolvidas na degradação do amido são α e β -amilases (Kunze, 2014).

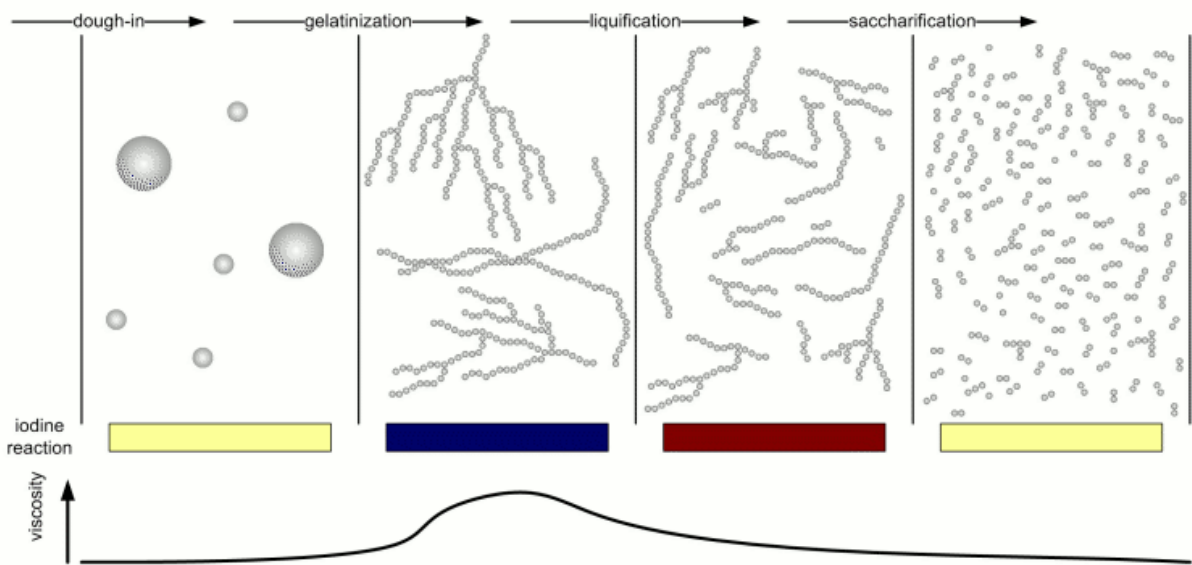


Figura 6 - Etapas da degradação do amido (Fonte: (Kunze, 2014)).

O amido é em parte cristalino e amplamente insolúvel em água. Desta forma, a fim de ser possível a sua degradação, é necessário interromper a sua estrutura granular de modo a que seja possível a absorção da água (Tom A. Bringham, 2003). Segundo Zobel (1984), a gelatinização é um processo de hidratação dos grânulos de amido de modo a que este possa ser solubilizado. Nesta fase não ocorre reação química. Quando os grãos de amido são aquecidos pela água a temperaturas progressivamente mais elevadas, ocorre uma dissociação das regiões helicoidais de amilose e a quebra da estrutura cristalina da amilopectina. Desta forma os grãos vão absorver uma certa quantidade de água, resultando no aumento do seu volume até um certo limite. Quando esse limite é superado, os grãos rompem e forma-se uma solução viscosa (Tom A. Bringham, 2003). A redução da viscosidade depende da quantidade de água absorvida e é diferente para cada tipo de cereal (Kunze, 2014).

Devido à gelatinização, o amido já não se encontra agregado em grãos sólidos, permitindo a sua degradação pelas enzimas presentes. É essencial que o amido seja aquecido acima da temperatura de gelatinização para assegurar o rompimento dos grânulos para um substrato adequado para a ação enzimática (Reichelt, 1983).

Para evitar a retrogradação e uma nova precipitação de complexos amido-amilose, é necessário prosseguir com o processo até a ocorrência de uma hidrólise parcial. Este processo é designado de liquefação (Kunze, 2014). Nesta fase ocorre a ação das α -amilases que tem como finalidade a quebra rápida das longas cadeias de glucose que compõem o amido (amilose e amilopectina)

em cadeias mais pequenas. Desta forma, a etapa de liquefação significa uma rápida redução da viscosidade das cadeias de amido gelatinizadas (Kunze, 2014).

Na fase de sacarificação ocorre a degradação completa do amido em glucose, maltose, maltotriose e dextrinas por ação da α - e β -amilases. É a combinação destas duas enzimas que é responsável pela produção de açúcares a partir do amido. A concentração final dos açúcares resultantes da atividade enzimática interfere na fermentabilidade do mosto, no teor de álcool e no corpo da cerveja (Kunze, 2014).

Os produtos de decomposição do amido compõem a maior parte do extrato do mosto (Briggs, 2004). Cerca de 62-68% do extrato formado durante a brassagem consiste em açúcares fermentescíveis. Desta percentagem, cerca de 43-45% diz respeito à maltose, cerca de 11-13% à maltotriose e o restante glucose, frutose e sacarose (Kunze, 2014). A glucose e a frutose são os primeiros hidratos de carbono a ser utilizados pela levedura, seguindo-se a maltose. Por sua vez, a maltotriose apenas é fermentada após a utilização completa da maltose. A restante percentagem corresponde a extrato não fermentável, maioritariamente dextrinas, proteínas e matéria mineral (Tom A. Bringham, 2003) (Willaert, 2004).

A fase de sacarificação pode ser facilmente monitorizada pela cor de uma amostra do mosto na presença de solução de iodo, designado teste do iodo. Neste teste é usado 0.02N de tintura de iodo (solução de iodo e de iodeto de potássio em álcool) e consiste na análise da reação entre a solução de iodo e o amido. Caso o amido tenha sido totalmente desagregado e apenas exista a presença de açúcares fermentescíveis e de pequenas cadeias de dextrinas, obtém-se uma solução de cor amarela/castanha. Por outro lado, caso exista a presença de amido e de longas cadeias de dextrinas no mosto, obtém-se uma solução de tons azul/roxo (O'Rourke, 2011).

Esta conversão incompleta pode ser um resultado de um controlo não conforme da temperatura durante a conversão, tempo de conversão insuficiente ou pela ausência de enzimas suficientes no malte. Da mesma forma, se a temperatura na etapa da degradação do amido não for cuidadosamente controlada pode ocorrer a retrogradação do amido e, deste modo, o amido torna-se inacessível para a hidrólise enzimática e não vai estar disponível para a produção de açúcares fermentescíveis, resultando perdas significativas de rendimento do álcool (Tom A. Bringham, 2003).

De um modo geral, o processo de brassagem representa um delicado equilíbrio entre a gelatinização e a degradação do amido. Se a temperatura for demasiado baixa, alguns grânulos

de amido permanecem intactos e este não será totalmente gelatinizado, resultando numa perda de rendimento alcoólico. Por outro lado, se a temperatura for excessivamente alta ou se o tempo de brassagem for demasiado longo, ocorrem reações de *Maillard* – estas reações removem aminoácidos, proteínas e açúcares do amido degradado, o que pode resultar numa redução do rendimento alcoólico (Eßlinger, 2009).

3.3.1. Enzimas responsáveis pela degradação do amido - amilases

As amilases são enzimas que catalisam ou aceleram a degradação do amido. A α -amilase quebra as cadeias de amilose e amilopectina para formar cadeias mais curtas, resultando num aumento de extremidades não-redutoras e a β -amilase separa resíduos de maltose dessas extremidades (Kunze, 2014).

A β -amilase é uma exo-enzima (exoamilase) e existe na cevada na forma solúvel e insolúvel (Eßlinger, 2009). Esta enzima quebra as cadeias lineares de amido a partir da penúltima ligação α -1,4 da extremidade da cadeia não redutora de amilose e amilopectina. O resultado desta ação é a formação de maltose (dissacarídeo mais abundante no mosto). Devido à diferença de comprimentos das cadeias, algumas quantidades de glicose e maltotriose são igualmente libertadas. No entanto, esta enzima não tem capacidade de hidrolisar as ligações α -1,6, ou seja, só converte as regiões exteriores da amilopectina. Desta forma, a degradação apenas com esta enzima demoraria vários dias (Briggs, 2004).

A α -amilase é uma endo-enzima (endoamilase) que quebra progressivamente, e de forma aleatória, sobre a ligação α -1,4 no interior das cadeias de amilose ou amilopectina produzindo cadeias mais curtas – designadas dextrinas. A função mais importante desta enzima é a “abertura” das moléculas grandes de amido, que possibilita a ação da β -amilase.

A degradação da amilopectina termina a 2-3 resíduos de glicose uma vez que a α e β -amilases são incapazes de degradar a ligação glicosídica α -1,6. Desta forma quantidades significativas de resíduos ramificados permanecem no mosto. A enzima dextrinase limite, presente no malte, ao contrário da α e β -amilase, consegue quebrar a ligação α -1,6 (Kunze, 2014). Contudo, a temperatura ótima de ação é entre 55-60°C e a enzima é inativada aos 65°C, por isso existe pouco tempo para atuar durante a brassagem (O'Rourke, 2011) (Kunze, 2014).

As figuras 7 e 8 ilustram a degradação do amido por ação enzimática.

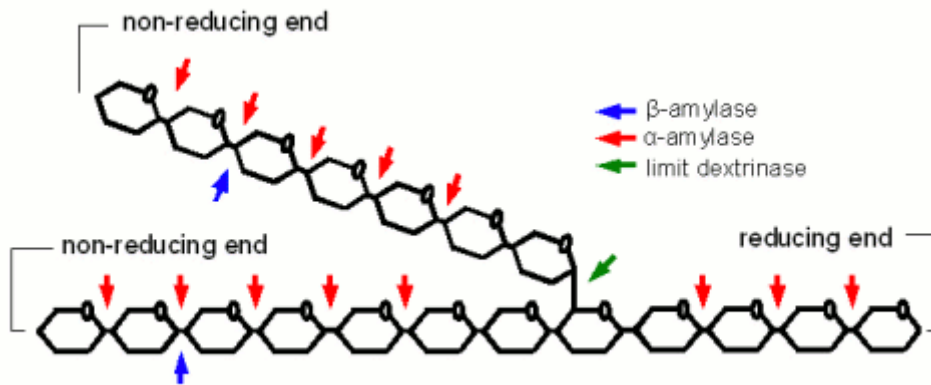


Figura 7 - Degradação enzimática do amido (Fonte: (Briggs, 2004)).

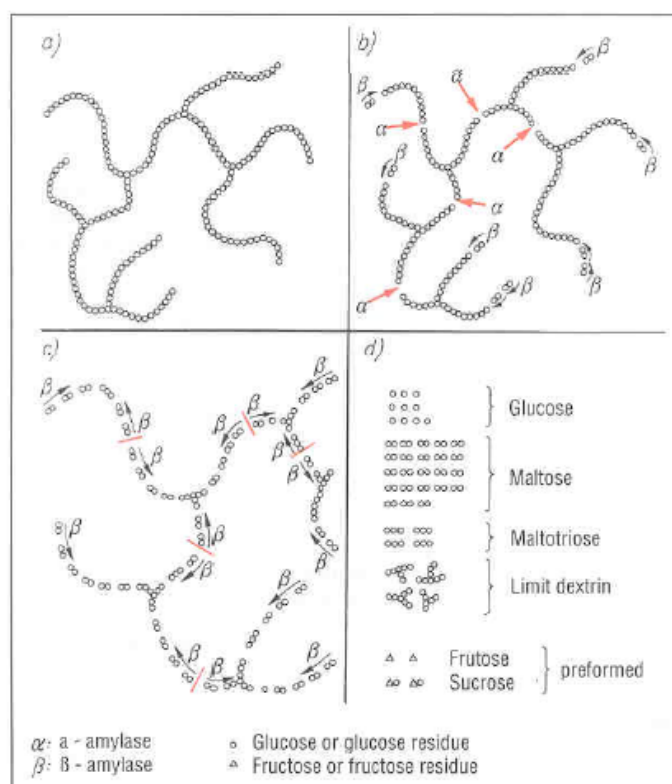


Figura 8 - Degradação do Amido por α e β -amilase (Fonte: (Kunze, 2014))

3.3.2. Fatores que influenciam a atividade enzimática

As enzimas são catalisadores orgânicos. Devido à sua elevada especificidade, à sua biodegradabilidade e à sua capacidade para atuar em soluções aquosas a temperaturas moderadas, as enzimas estão a tornar-se, atualmente, cada vez mais importantes nas indústrias (Flickinger, 1999).

Os principais fatores que influenciam a atividade enzimática são: o pH, a temperatura e o tempo de brassagem, a concentração do substrato disponível no mosto e a concentração enzimática (Kunze, 2014).

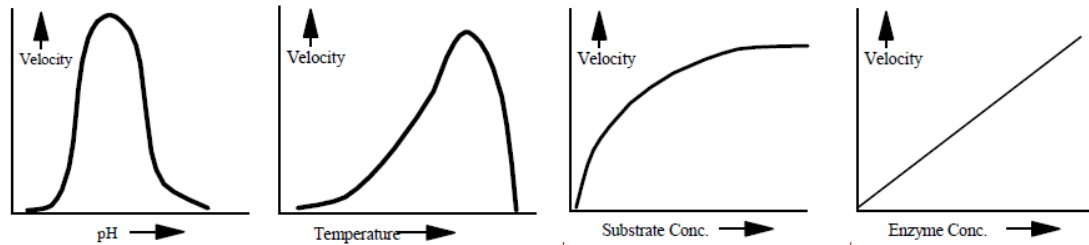


Figura 9 - Fatores que influenciam a velocidade da reação enzimática (fonte IFBM - French Institute of Beverages, Brewing and Malting).

Cada enzima é uma proteína muito específica e o seu desempenho pode ser previsto de acordo com os seguintes princípios, como descrito na figura 9:

Devido à estrutura tridimensional das enzimas ocorrem mudanças na sua atividade enzimática com alteração do valor do pH. Deste modo, a atividade enzimática atinge o seu máximo, específico de cada enzima, e diminui a atividade quando o pH se encontra a valores mais altos ou mais baixos do seu valor ótimo (Tom A. Bringhurst, 2003). Cada enzima tem um pH ótimo, no qual a sua atividade é máxima.

A atividade enzimática aumenta com o aumento da temperatura e cada enzima atinge a sua atividade máxima na sua temperatura ótima de atuação. Por outro lado, quando são ultrapassadas as temperaturas ótimas de atuação enzimática, ocorre a desativação e destruição da sua atividade. Dentro de certos limites, a velocidade da reação enzimática aumenta com o aumento da temperatura, contudo, a partir de uma determinada temperatura, a velocidade da reação diminui drasticamente. As enzimas também atuam a baixas temperaturas, mas a sua atividade é consideravelmente lenta (O'Rourke, 2011) (Kunze, 2014). Algumas enzimas são rapidamente inativadas a certas temperaturas enquanto outras sobrevivem em quantidades praticamente inalteradas no final da brassagem (Briggs, 2004).

A velocidade da reação aumenta com o acréscimo do substrato disponível até um determinado ponto em que a atividade vai estabilizar. Por outro lado, a atividade enzimática também depende da concentração do mosto.

Com quantidade de substrato ilimitado, a velocidade da reação aumenta em proporção direta à quantidade de enzima disponível.

Dentro destes fatores, os fatores que possuem mais efeito são a temperatura e o pH, sendo que o efeito da temperatura na atividade enzimática é superior ao efeito do pH (Kunze, 2014).

- **Efeito da temperatura na degradação do amido**

A β -amilase é a principal enzima responsável pela produção de açúcares fermentescíveis. A temperatura ótima de atuação da β -amilase é 61-63°C e da α -amilase 70-72°C (Kunze, 2014). A α -amilase também tem atividade enzimática considerável a 63-65°C. Desta forma, com um aumento do tempo de brassagem (especialmente a temperaturas entre os 61°C-63°C) há um aumento da concentração de maltose o que origina um aumento do limite de atenuação. Por outro lado, se a etapa de brassagem ocorrer a 72-74°C durante um longo período de tempo obtém-se uma cerveja com menor limite de atenuação (Kunze, 2014). Analisando a figura 10, também é possível verificar que a 72°C existe igualmente produção de açúcares fermentescíveis, contudo numa menor quantidade.

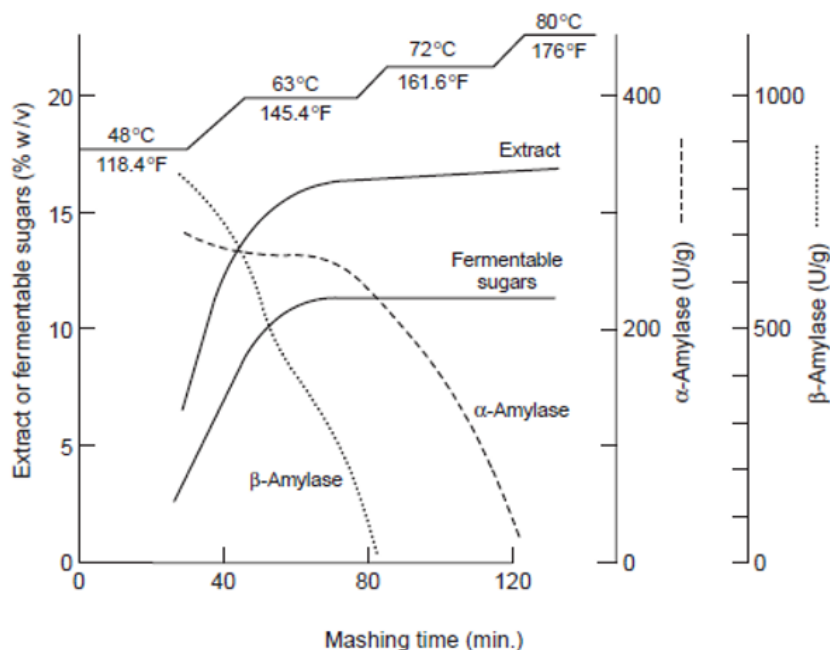


Figura 10 - Concentração de açúcares fermentescíveis (glicose, maltose e maltotriose) e a relação com a α -amilase e β -amilase, os patamares de temperatura e o tempo de empastagem (Stenholm *et al.*, 1996).

- **Efeito do pH na degradação do amido**

A atividade enzimática é muito dependente do pH. A β -amilase tem atividade ótima na gama de pH entre 5.4 – 5.5 e a α -amilase entre 5.6 – 5.8. A etapa da brassagem com valores de pH entre 5.5 – 5.6, que pode ser considerado o intervalo ótimo para atuação de ambas as enzimas, obtém-se uma maior quantidade de extrato quando comparado com a etapa de brassagem com valores de pH mais altos ou mais baixos desse intervalo (Kunze, 2014).

- **Efeito do tempo de brassagem na degradação do amido**

Relativamente ao tempo de repouso para atuação da β -amilase, este não está definido na bibliografia. Contudo, segundo Kunze 2014, a atividade enzimática da enzima é máxima nos primeiros 10-20 minutos à temperatura de 63°C, descendo progressivamente a sua atividade (figura 11). Desta forma, é necessário ter sempre em consideração a temperatura e a duração de cada etapa uma vez que, apesar de existir uma redução da atividade da β -amilase, ela continua a existir. E, existindo atividade enzimática, existe produção de maltose que tem impacto na atenuação do mosto.

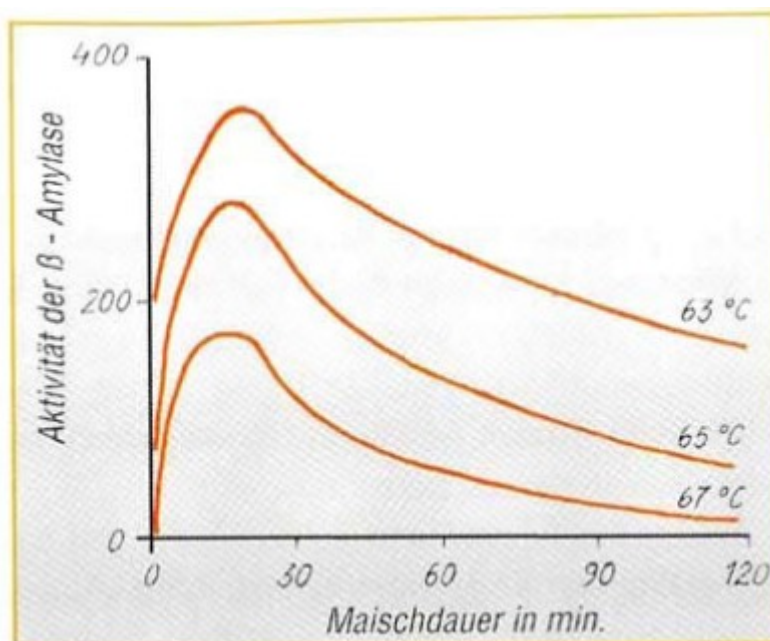


Figura 11 - Atividade da β -amilase depende na temperatura de brassagem e da duração do tempo de repouso (Fonte: Kunze, 2014).

- **Efeito da concentração do mosto (rácio água/cereais) na degradação do amido**

Empastes muito finos afetam a composição do mosto, uma vez que provocam a inativação térmica das β -amilases, o que origina um extrato pobre em açúcares fermentescíveis e rico em dextrinas (Briggs, 2004).

3.4. Brassagem com adjuntos

O açúcar necessário para a fermentação é obtido, pela ação enzimática, a partir do amido presente no malte. Contudo, o amido não está presente apenas no malte, mas em todo o tipo de cereais. Em alguns países estes cereais são substancialmente mais baratos em comparação com o malte e, desta forma, podem ser utilizados como substitutos parciais de malte (designados adjuntos) na preparação do mosto (Kristiansen, 2011). Para além dos custos reduzidos, os adjuntos contribuem para a regulação de certos compostos no fabrico da cerveja, tais como, fornecimento de compostos fermentescíveis sem acrescentar taninos ou proteínas, redução da cor da cerveja e melhoria na estabilidade e no carácter da espuma da cerveja (Reichelt, 1983). Porém, a prática de utilização de adjuntos não deve interferir na qualidade da cerveja, conferindo características inadequadas ao produto.

Nos cereais, tais como o milho, a temperatura de gelatinização é substancialmente mais elevada do que as temperaturas a que as enzimas envolvidas na conversão do amido em açúcares fermentescíveis são capazes de funcionar. A temperatura de gelatinização no milho é entre 68-76°C e, por exemplo, no trigo ronda os 60-64°C (Tom A. Bringhurst, 2003). Desta forma, quando são adicionados adjuntos ao malte, estes têm de sofrer o processo de aquecimento numa caldeira à parte (brassagem por decocção). Este grau de aquecimento depende do cereal utilizado e é vulgarmente determinado pela sua temperatura de gelatinização (Willaert, 2004).

3.5. Utilização de auxiliares enzimáticos

Sob condições normais na produção do mosto, as enzimas naturais presentes no malte podem não ser suficientes para hidrolisar todo o amido em açúcares fermentescíveis (Briggs, 2004).

Para além da utilização de adjuntos que conferem extrato ao mosto, podem ser adicionados enzimas de origem microbiológica. Estas enzimas, designadas de auxiliares, podem ser adicionadas na caldeira aquando da hidratação dos adjuntos, como complemento das enzimas do malte (Willaert, 2004).

A capacidade para alcançar os valores de atenuação pretendidos pode ser dificultada pela variabilidade da qualidade da matéria-prima e do processo de brassagem. Além disso, quando são utilizados adjuntos no fabrico do mosto pode haver a necessidade de adicionar enzimas de sacarificação para atingir o grau pretendido de atenuação para uma fermentação adequada. Desta forma, o seu uso é útil para a otimização das matérias-primas e controlo da atenuação e a sua escolha depende do propósito que seja pretendido, tendo em conta as vantagens, modo de adição, dosagem e condições ótimas de atuação de cada enzima (Novozymes, 2013).

Existe igualmente um conjunto diverso de enzimas estáveis ao calor que poderão ser adicionados ao mosto ou à cerveja e que têm como finalidade o aumento da eficiência do processo cervejeiro através de filtrações mais rápidas, na remoção de compostos indesejáveis e na redução do potencial de formação de turvação no produto final (Novozymes, 2013).

4. Materiais e Métodos

4.1. Caracterização do objeto de estudo

Mosto: o processo de otimização foi realizado para a produção do mosto X com extrato de elevada densidade.

Matérias-primas: água, malte, cereais não maltados – cevada e *gritz* e extrato de lúpulo.

Tipo de empastagem: decocção simples utilizando-se as caldeiras de caldas e de empastagem.

Aditivos e auxiliares enzimáticos: durante a hidratação do adjunto, na caldeira de caldas, são adicionadas uma solução de cloreto de cálcio e uma enzima termoestável α -amilase. Durante a hidratação do malte, na caldeira de empastagem, são adicionados cloreto de cálcio e ácido fosfórico e um auxiliar enzimático que na sua solução contém β -glucanase.

4.2. Delineamento experimental

Numa primeira fase deste projeto efetuou-se um estudo de todo o processo de produção de cerveja de forma a compreender todas as etapas envolvidas. De seguida fez-se um estudo pormenorizado da etapa de brassagem, recorrendo a bibliografia especializada, identificando as variáveis de maior importância para esta etapa em particular. De seguida realizou-se um acompanhamento do processo industrial na sala de fabrico, analisou-se o histórico dos resultados físico-químicos do mosto em estudo e fez-se uma comparação com a situação atual registada no acompanhamento industrial. Com base nos dados recolhidos na primeira fase, a segunda fase do projeto focou-se na definição de propostas de ações de melhoria e na realização de ensaios para atingir o objetivo proposto.

4.3. Parâmetros analisados e métodos laboratoriais

Na tabela 1 são apresentados os parâmetros analisados em cada uma das fases de produção.

As medições do pH foram realizadas no potenciómetro na Produção da Direção de Produção do centro de Leça do Balio. As restantes análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório Central da Direção de Qualidade do centro de Leça do Balio.

Tabela 1 - Parâmetros analisados em cada uma das fases de produção.

Fase de Produção	Etapa	Parâmetros em análise	
Produção de mosto – Sala de fabrico	Brassagem (caldeira de caldas e caldeira de empastagem)	pH	
	Sacarificação (caldeira de empastagem)	Sacarificação do amido	
	Filtração	Extrato solúvel na dreche seca	
	Ebulição	pH fim ebulição	
	Arrefecimento de mosto		Atenuação Limite
			Extrato primitivo
pH			
Coloração			
Produção de cerveja - Adega	Fermentação Maturação Estabilização a frio	Extrato primitivo	
		Álcool	
		Coloração	
		Amargor	
		pH	
		Extrato aparente	
		Atenuação Real	
		Contagem de células da sementeira	
		Resultados microbiológicos da levedura	
		Diacetilo	
Produto Acabado	Controlo de qualidade do produto acabado	Extrato aparente	
		Atenuação Real	
		Álcool	
		pH	
		Coloração	
		Amargor	
		Estabilidade de espuma	
		Turvação 0°C	
		Turvação 20°C	
		Turvação total	
		Diacetilo	
		SO ₂ total	
		Perfil Aromático	
		Teste Triangular	
DMS			
Acetaldeído			

As análises abaixo descritas foram realizados ao longo do presente trabalho. As restantes análises que não foram detalhadamente aludidas, foram realizadas pelos Técnicos do Laboratório Central do Centro de Produção de Leça do Balio.

Produção de mosto – Empaste

- **pH**

O pH das empastagens de malte, *gritz* e da mistura foi medido usando o método potenciométrico a 20°C, do medidor de pH Mettler Toledo Mp220. A calibração do equipamento é realizada diariamente segundo o manual técnico do medidor em questão.

- **Sacarificação do amido – Teste do iodo**

Este teste é realizado para verificar se o empaste está completamente sacarificado. Retira-se uma amostra do empaste a 78°C e coloca-se em contacto com algumas gotas de solução de iodo 0,01N, numa placa branca. Caso haja mudança de cor para roxo/azulado indica que há presença de amido. Por outro lado, uma mudança de cor para alaranjado significa que a sacarificação está completa. A análise é realizada em duplicado.

Produção de mosto – Dreche

- **Extrato solúvel**

A determinação do extrato solúvel da dreche é feita através da extração da água contida na dreche. Este é um método rápido e direto. Para realizar esta análise a dreche é moída num moinho Bulher Miag DLFU regulado para moagem grossa (1,0mm), obtendo-se a água de pressão. Para ser mais fácil a extração, esta análise é realizada após a retirada da dreche do filtro, no momento da filtração, à temperatura de 78°C. A água extraída da moagem é filtrada através de papel de filtro. De seguida, a amostra é arrefecida até cerca de 20°C. O extrato primitivo do mosto limpo é determinado a 20°C a partir do aparelho de laboratório Anton Paar. Os resultados obtidos são expressos em % Plato.

O Anton Paar é um analisador automático para cervejas, utilizado no laboratório, que mede a densidade, álcool, extratos primitivo, real e aparente, grau de fermentação, pH e coloração para mostos, cerveja alcoólicas e não alcoólicas, cervejas fermentadas e/ou produto acabado (Manual Controlo Qualidade - MCQ1183 - Álcool, Extratos e Grau de Fermentação pelo Auto-Analisador Antoon Paar).

Produção de mosto - Arrefecimento do mosto

- **Atenuação Limite**

A determinação da atenuação limite do mosto é feita segundo o EBC, 1998, Method 8.6. Este método tem como princípios básicos que as enzimas amilolíticas do mosto, se estiverem presentes, são inativadas a altas temperaturas; o mosto arrefecido é fermentado com a sua levedura, sendo a fermentabilidade do mosto determinada a partir da alteração da densidade, após fermentação.

Para a realização desta análise é necessária uma amostra de mosto concentrado sem atividade enzimática. A amostra é arrefecida até 20°C e filtrada através de papel de filtro. Coloca-se 200 ml de mosto num matraz de 500 ml e adiciona-se 15 g de levedura *Saccharomyces Cerevisae* prensada. A abertura da matraz é fechada através de algodão cardado e é colocada no agitador onde fica a agitar continuamente durante 24h, a 20°C. Posteriormente a amostra é filtrada através de papel de filtro, refiltrando os primeiros 20-30 ml de filtrado. Agita-se para eliminar algum CO₂ que ainda possa restar e determina-se a atenuação real limite.

Os resultados são expressões em % e são obtidos através dos seguintes cálculos:

$$Aap = \frac{(E-Ef) \times 100}{E}$$

$$Ar = Aap \times 0,81$$

Em que:

Aap = Atenuação aparente limite ou fermentabilidade, em %

E = Extrato do mosto, em g/100 ml

Ef = Extrato aparente do mosto fermentado, em g/100 ml

Ar = Atenuação real limite, em %.

Os valores dos extratos do mosto são determinados a partir da análise do mosto no anton paar.

Produção de cerveja – fermentação

As análises efetuadas ao longo da fermentação e na fase de maturação são analisados pelo Auto-Analisador Anton Paar.

Produto acabado

- **Perfil Aromático**

A avaliação do perfil aromático entende-se a avaliação de cada componente indesejável (“off flavour”) do aroma ou gosto e a sua contribuição no aroma/gosto (“flavour”) total do produto. A avaliação é realizada, sob circunstâncias controladas, por uma equipa de 6 a 14 pessoas especialmente selecionadas e treinadas.

O produto deverá ser provado com, pelo menos, 5 dias após a data de enchimento. As amostras devem ser servidas a uma temperatura uniforme, preferencialmente a 12°C para que a perceção do aroma e gosto (“flavour”) seja completa. A quantidade a colocar em cada copo é de 30 a 50 ml.

A avaliação do “Flavour Total” para cada amostra é dada num boletim e apresenta-se os resultados da avaliação global e de todas as características referidas.

- **Teste triangular**

Aplica-se sempre que seja necessário determinar se há ou não diferença significativa entre duas amostras de cerveja, mosto ou água, envolvendo parte ou todos os atributos sensoriais. Entende-se por teste triangular a avaliação sobre duas amostras em 3 copos (uma delas representada uma só vez e a outra representada duas vezes).

As amostras devem ser servidas a uma temperatura uniforme, preferencialmente a 12°C para que a perceção do aroma e gosto (“flavour”) seja completa. A quantidade a colocar em cada copo é de 30 a 50 ml. Os copos têm que ser isentos de qualquer aroma ou gosto.

Os resultados apresentam-se como não há diferença significativas entre as amostras, com um nível de significância de: $\geq 95\%$ ou $\geq 99\%$ ou $\geq 99,9\%$, apresentando a preferência de igual modo.

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização da situação atual

Para a caracterização da situação atual foram realizados, no período entre outubro de 2014 a novembro de 2014, 29 acompanhamentos detalhados à etapa da brassagem do mosto X.

O adjunto utilizado no empaste das Caldas – *gritz* – não contém enzimas, sendo composto maioritariamente por amido. Uma vez que a temperatura de gelatinização do amido do *gritz* é superior à do malte, este tem de ser submetido a temperaturas mais elevadas para garantir a degradação do amido. Durante a hidratação do adjunto são adicionadas quantidades de cloreto de cálcio e de um auxiliar enzimático que na sua constituição contém a enzima termoestável α -amilase. A adição de cloreto de cálcio tem como objetivo reduzir o pH do mosto por interferência do sistema tampão fosfato (malte), auxiliar no controlo do pH do empaste (cofator das enzimas), auxiliar na filtração diminuindo a viscosidade e contribuir para a floculação da levedura. Para além disto promove a formação de precipitados insolúveis durante a ebulição, tendo impacto na estabilidade coloidal (O'Rourke, 2011). O auxiliar enzimático é adicionado no início da liquefação. A sua utilização constitui a base para uma sacarificação eficaz do amido, sem risco de retrogradação ou de sacarificação insuficiente, preservando todo o potencial enzimático do malte (Novozymes, 2013).

Após sofrer a decocção, o empaste é bombeado para a caldeira de empastagem, que contém água e malte, onde vai provocar o aumento de temperatura da mistura. Durante a hidratação do malte na caldeira de empastagem e, antes do envio da empastagem das caldas, são adicionados os aditivos cloreto de cálcio e o ácido fosfórico e de um auxiliar enzimático que na sua solução contém β -glucanase. O ácido fosfórico tem como função o ajuste do pH. O auxiliar enzimático tem como função hidrolisar as betaglucanas das matérias-primas, diminuindo a viscosidade do mosto e, conseqüentemente, facilitando a filtração do mosto e da cerveja. A mistura na caldeira de empastagem sofre aquecimento e posteriormente é aquecida até 78°C, temperatura de inativação enzimática.

O gráfico 1 mostra o diagrama de brassagem do mosto X.

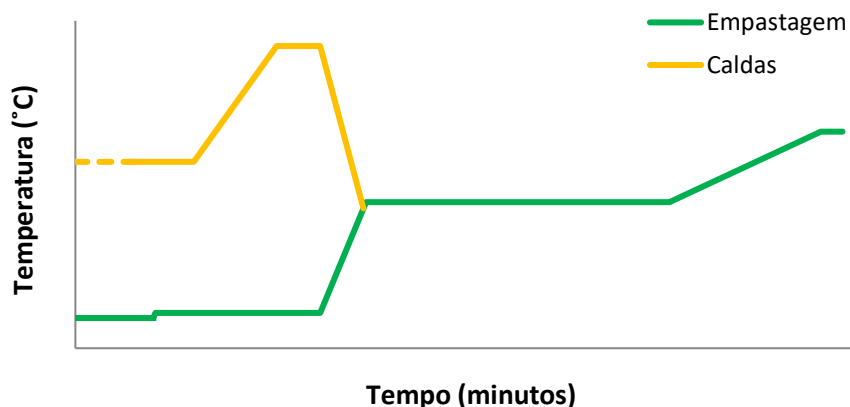


Gráfico 1 - Gráfico do processo de brassagem por decocção do mosto X.

Os parâmetros com maior relevância da fase de produção do mosto X e respectivos valores estão apresentados nas tabelas 2 e 3. Estes resultados dizem respeito à média e desvio padrão dos 29 acompanhamentos efetuados. Para além destes parâmetros também foi verificado e acompanhado o rácio água/cereais.

Tabela 2 - Situação atual dos parâmetros de controlo do mosto X, na Caldeira de Caldas.

Caldeira de Caldas	
Parâmetros	Situação Atual
Quantidade de solução de cloreto de cálcio	25 L
Quantidade de enzima termoestável α -amilase	X kg
pH empastagem <i>gritz</i>	5,42 \pm 0,08

Tabela 3 - Situação atual dos parâmetros de controlo do mosto X, na Caldeira de Empastagem.

Caldeira de Empastagem	
Parâmetros	Situação Atual
Quantidade de solução de cloreto de cálcio	25 L
Quantidade de ácido fosfórico alimentar	45 L
Quantidade de enzima β -glucanase	Y Kg
pH empastagem malte	5,24 \pm 0,12
Temperatura da atividade da β -amilase (2º estacionamento)	e°C
pH atividade da β -amilase (2º estacionamento)	5,30 \pm 0,09
Tempo no 2º estacionamento	H Minutos
Temperatura de inativação enzimática	78°C

5.2. Análise da situação atual vs histórico

Para além dos resultados recolhidos durante o acompanhamento, considerou-se importante analisar e comparar com o histórico para perceber se os resultados recolhidos estavam concordantes com o histórico e qual o desvio face aos limites definidos na bibliografia. Analisando os gráficos 2 e 3, referentes aos dados de autocontrolo efetuados pelos técnicos de produção desde janeiro de 2013 a novembro de 2014, é possível concluir que os resultados recolhidos durante o acompanhamento estão de acordo com o histórico e que correspondem, efetivamente, à situação atual do mosto X.

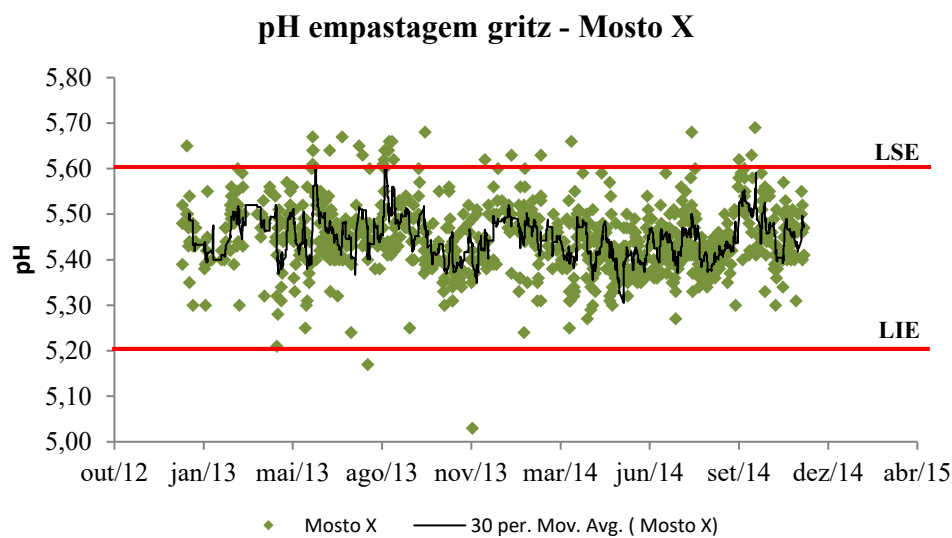


Gráfico 2 - pH empastagem *gritz* do mosto X.

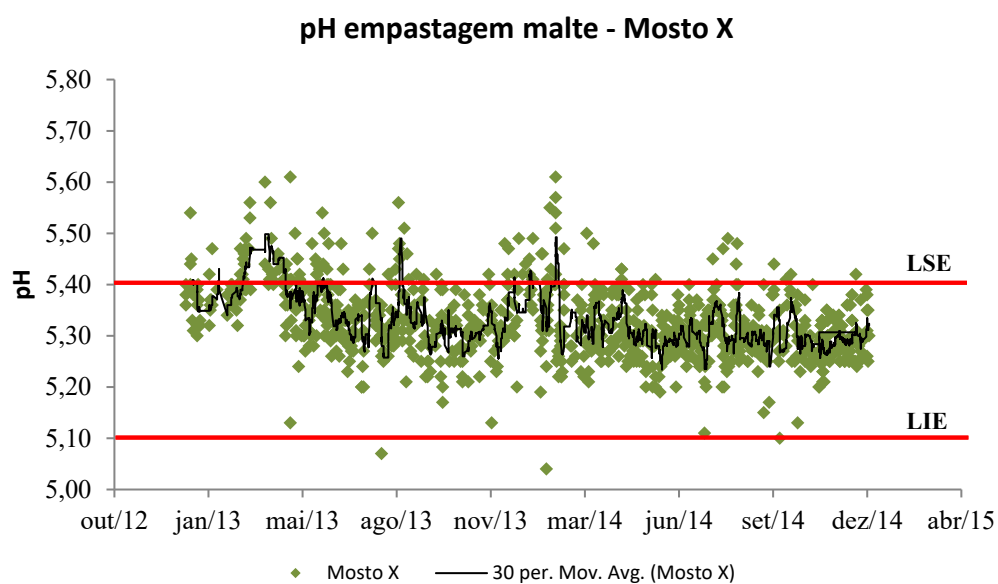


Gráfico 3 - pH empastagem malte do mosto X.

Também se considerou fundamental analisar o histórico dos resultados de atenuação limite do mosto X. Como referido anteriormente, a atenuação limite é a percentagem de açúcares fermentescíveis presentes no extrato final do mosto. O gráfico 4 apresenta os valores de atenuação limite do mosto X, desde janeiro de 2014 a dezembro de 2014, com os limites de especificação definidos pela empresa.

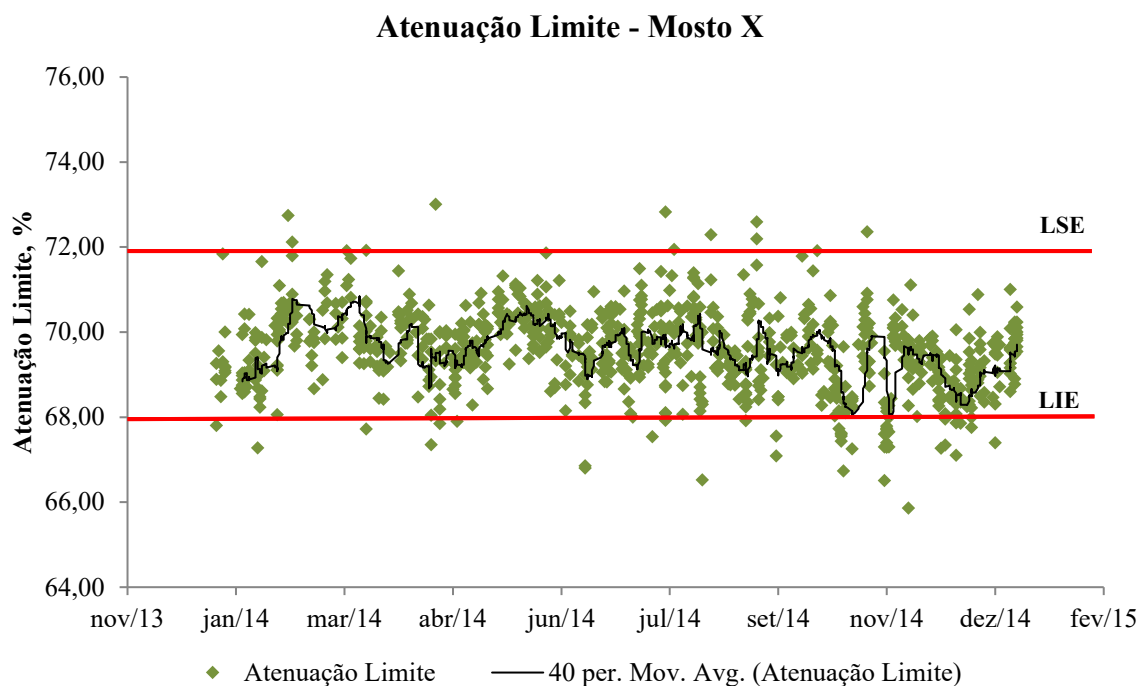


Gráfico 4 - Atenuação Limite do Mosto X.

Analisando o gráfico 4 é possível verificar que existe uma dispersão dos resultados de atenuação limite, sofrendo variações mais acentuadas a partir de setembro de 2014. Os dados apresentados são referentes a um total de 847 análises realizadas entre janeiro 2014 a dezembro 2014. A média da atenuação limite é de $69,1\% \pm 1,07$. Quando o valor de atenuação limite está abaixo do limite inferior significa uma menor percentagem de açúcares fermentescíveis no mosto e, conseqüentemente, numa menor quantidade de álcool convertido na fermentação. Esta situação origina uma perda de rendimento no processo de fabrico da cerveja.

5.3. Definição de propostas de ação e parte experimental

A apresentação dos resultados é realizada separadamente para cada proposta de ação. Para ser possível concluir se as ações definidas tinham efeito nos resultados, foi necessário analisar fabricos controlo (sem nenhuma alteração fase à receita do mosto X) e fabricos ensaio. Os resultados obtidos são referentes à média do total de amostras e respetivos desvios padrão.

- **Proposta de ação nº1: Otimização dos valores de pH na empastagem**

Após análise da situação atual e da análise bibliográfica, verificou-se que os valores de pH registados nas caldeiras estão abaixo dos limites bibliográficos, salvo algumas exceções expectáveis numa produção industrial. Desta forma o objetivo e a proposta de ação foi aumentar e colocar o pH das empastagens no alvo teórico. Assim e, com base na bibliografia, determinou-se o valor alvo teórico para a otimização da atividade enzimática. Os valores das especificações atuais e respetivos alvos teóricos pretendidos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Valores das especificações atuais e alvo teórico do pH nas caldeiras.

		pH Empastagem Atual		pH Empastagem Alvo Teórico		
		Caldeira Caldas	Caldeira Empastagem	Caldeira Caldas	Caldeira Empastagem	Mistura
Mosto X	LIE	5,20	5,10	-	-	-
	Alvo	5,40	5,30	5,60	5,40	5,50
	LSE	5,60	5,40	-	-	-

O que influencia o pH do mosto não é exatamente o pH da água, mas a concentração de certos iões, particularmente o cálcio, o magnésio e o bicarbonato, sendo que desses o cálcio e o bicarbonato são os mais importantes (O'Rourke, 2011).

Como referido anteriormente, no processo de fabricação do mosto são adicionados dois aditivos alimentares, a solução de cloreto de cálcio e o ácido fosfórico. É importante referir que uma diminuição das quantidades dos aditivos está relacionada com uma diminuição do pH na empastagem. Assim, para concretizar esta ação, foram realizados inúmeros ensaios onde se aumentava e diminuía as quantidades dos aditivos acima descritos. A variação da dosagem dos aditivos foi de acordo com a análise dos resultados das amostras dos ensaios anteriores.

Na receita do mosto X adiciona-se na caldeira de empastagem a solução de cloreto de cálcio e o ácido fosfórico e na caldeira de caldas apenas se adiciona o cloreto de cálcio. Para aumentar o valor de pH na caldeira de caldas diminui-se a quantidade de cloreto de cálcio. Como referido anteriormente este aditivo é fundamental para o processo de fabrico do mosto e da fermentação e a sua quantidade não deve ser sofrer alterações significativas, de forma a não ter impacto negativo no processo. Desta forma, a quantidade retirada da caldeira de caldas foi adicionada na caldeira de empastagem. Por sua vez, foi necessário diminuir a quantidade de ácido fosfórico na caldeira de empastagem de forma a aumentar o pH do empaste.

As amostras de pH da empastagem do *gritz*, na caldeira de caldas, e do malte, na caldeira de empastagem, foram retiradas após 10 minutos do início da hidratação. Uma vez que a análise do pH da mistura não está definida no Plano de Inspeção de Ensaio (PIE) esta amostra não é medida em autocontrolo, não existindo especificação para este parâmetro. Contudo, para o decorrente ensaio, decidiu-se ser relevante a validação deste valor pois este patamar de temperatura é o mais importante na formação de açúcares fermentescíveis do mosto.

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos dos fabricos controlo e dos fabricos ensaios realizados.

Tabela 5 - Resultados do pH empastagem *gritz*, malte, mistura e % de atenuação limite, dos fabricos controlo e ensaio.

Ensaio	Nº amostras	Parâmetros em análise			
		pH empastagem <i>gritz</i>	pH empastagem malte	pH empastagem mistura	Atenuação limite mosto (%)
Controlo	14	5,49±0,04	5,22±0,03	5,31±0,05	69,8±0,67
Ensaio	18	5,61±0,05	5,39±0,04	5,47±0,03	70,7±0,56

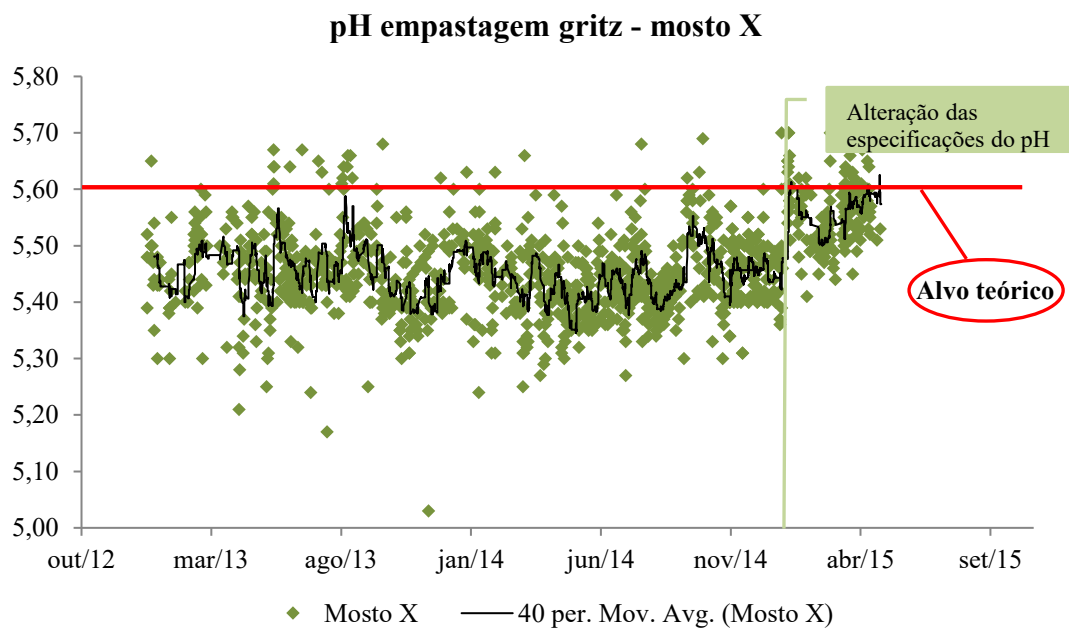
Da análise dos resultados pode-se observar que os valores de pH das empastagens nos ensaios estão próximos do alvo teórico pretendido e verificou-se um acréscimo do grau de atenuação limite de 0,9%. Este valor representa que, com a otimização dos valores de pH para valores mais próximos da atividade ótima enzimática e, com igual quantidade de matérias-primas, é possível aumentar a percentagem de açúcares fermentescíveis presentes no mosto.

Com a diminuição da quantidade adicionada de ácido fosfórico na caldeira de empastagem foi necessário fazer a correção na fase de ebulição. Assim, foi aumentada a quantidade do aditivo nesta fase para que os valores de pH se mantivessem no alvo esperado (pH≈5,00). Esta correção é essencial pois, um pH baixo tem efeitos positivos no mosto e no carácter da cerveja, tais como (Kunze, 2014):

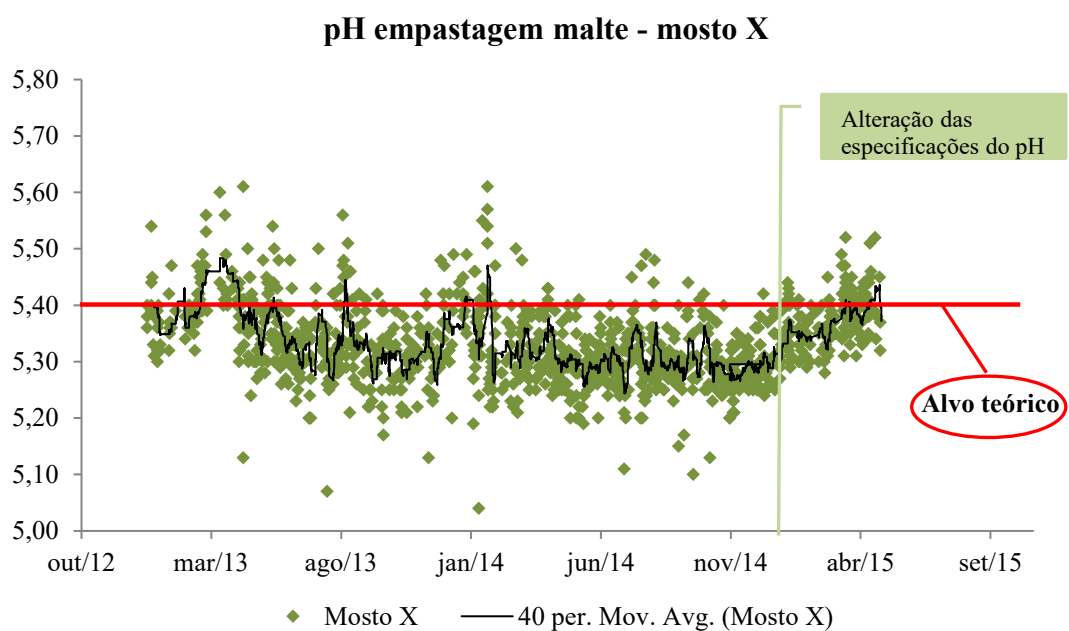
- Promove a coagulação de proteínas
- Promove o crescimento da levedura;
- Inibe o crescimento de microrganismos contaminantes;
- Intensifica os sabores da cerveja, em particular pela redução de diacetilo.

A análise destes resultados permitiu validar a ação para implementação. Foi necessário a alteração das especificações dos valores de pH de autocontrolo. Nos gráficos seguintes são

apresentados os valores de pH da empastagem do *gritz* e da empastagem do malte, gráficos 5 e 6, respetivamente, antes e após a alteração das especificações de pH.



Gr fico 5 – ph empastagem gritz, antes e ap s otimiza o, do mosto X.



Gr fico 6 - pH empastagem malte, antes e ap s otimiza o, do mosto X.

- **Proposta de a o n 2: Introdu o de patamar de sacarifica o a 72 C**

O patamar de temperatura  tima de atividade da β -amilase (e C) j  est  a ser efetuado e durante o tempo suficiente para a enzima atuar. De acordo com a bibliografia estudada verificou-se que

a enzima α -amilase possui alguma atividade a 62-63°C, mas a temperatura ótima é 72°C. Desta forma, para alcançar um aumento da percentagem de açúcares no mosto, a proposta de ação foi a introdução do patamar a 72°C com objetivo de aumentar o tempo da atividade enzimática da α -amilase.

Relativamente à temperatura de gelatinização do amido no milho, segundo Kunze, 2014, a temperatura ótima para atuação da enzima referida é de 70-75°C, pelo que a temperatura do 1º estacionamento na situação atual está concordante com estes limites.

Para esta ação foram realizados ensaios com introdução do patamar a 72°C manualmente. Após terminado o tempo no patamar a e°C e, no aumento de temperatura do empaste para 78°C, colocou-se o programa em manual para 72°C. Inicialmente foi testado um tempo de repouso de 5 minutos. Todavia, determinou-se que este tempo não seria o suficiente pois tendo em conta as dimensões da caldeira e da quantidade de mosto, o tempo era diminuto para a estabilização da temperatura. Desta forma, aumentou-se o tempo no patamar para 10 minutos.

Com a introdução deste patamar e, conseqüentemente, com a otimização da atividade enzimática, um dos objetivos também foi avaliar o impacto no extrato solúvel da dreche. O extrato solúvel da dreche corresponde ao extrato que foi convertido durante a empastagem, mas que não foi para o mosto (Kunze, 2014). O extrato contido na dreche pode ser analisado medindo a concentração de extrato que está na parte líquida da dreche e que pode ser espremida desta. A análise do extrato da dreche permite verificar quanto extrato ainda está presente nesta. Com o seu conhecimento é possível averiguar se existe alguma alteração em termos de perda ou ganho de extrato no mosto, o que pode contribuir para a quebra ou ganho de extrato na brassagem (Briggs, 2004).

Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados do extrato solúvel da dreche e % atenuação limite do mosto, dos fabricos controlo e ensaio.

Ensaio	Nº amostras	Parâmetros em análise		
		Extrato solúvel dreche (Filtro 1) (p/p)	Extrato solúvel dreche (Filtro 2) (p/p)	Atenuação limite mosto (%)
Controlo	14	1,48±0,16	1,74±0,25	69,60±1,06
Ensaio	16	1,28±0,17	1,40±0,22	69,92±1,04

Os resultados obtidos mostram que com a introdução do patamar a 72°C durante 10 minutos obteve-se um aumento de 0,3% de atenuação limite. Relativamente ao extrato solúvel da dreche,

verifica-se uma redução do extrato no filtro 1 de 0,14% e no filtro 2 de 0,19%. Esta diminuição significa que houve alteração em termos de ganho de extrato no mosto, uma vez que permaneceu menor quantidade de extrato na dreche. Verifica-se que o filtro 2 tem pior comportamento em comparação com o filtro 1. Esta situação já está sinalizada por parte do responsável de produção e não tem ligação com os ensaios.

A partir da análise destes resultados esta ação foi aprovada e validada para implementação. Uma vez que a introdução deste patamar foi realizada manualmente (no autómato apenas é possível a introdução de dois patamares de temperatura – e°C e 78°C) esta ação não foi implementada logo após a sua validação. Foi necessário recorrer ao técnico de programação, sendo que esta alteração apenas foi implementada em fevereiro de 2015.

- **Proposta de ação nº3: Diminuição do tempo no patamar de ação da β -amilase**

O patamar a esta temperatura é determinante para a formação de açúcares fermentescíveis. O tempo de repouso para atuação da β -amilase não está definido na bibliografia. Contudo, segundo Kunze, 2014, a atividade enzimática da enzima é máxima nos primeiros 10-20 minutos à temperatura de 63°C, descendo progressivamente a sua atividade. Uma duração prolongada da etapa de brassagem pode não ser benéfico para o mosto, podendo advir precursões na estabilidade de espuma da cerveja, para além do aumento do tempo nesta etapa de fabrico do mosto.

Analisando a situação atual e a bibliografia, conclui-se que o tempo neste patamar é longo. Desta forma, a proposta de ação nº3 incidiu na diminuição de 10 minutos no patamar a e°C, na caldeira de empastagem. A tabela 7 apresenta os resultados obtidos da atenuação limite com a redução do tempo.

Tabela 7 - Resultados da % atenuação limite do mosto, dos fabricos controlo e ensaio.

Ensaio	Nº amostras	Tempo no patamar a e°C (min)	Parâmetro em análise
			Atenuação limite mosto (%)
Controlo	9	H min	69,80±0,22
Ensaio	9	H-10 min	69,75±0,31

Nos ensaios realizados verifica-se uma diminuição no grau de atenuação limite, de cerca de 0,1%, com uma diminuição de 10 minutos no repouso no patamar a e°C. Comparando com os ensaios realizados nas propostas de ação anteriores, o número de ensaios realizado nesta ação

é reduzido. Contudo, esta redução tem impacto imediato no tempo de empastagem. Pelo que, após a análise dos resultados, conclui-se que essa diminuição da atenuação limite não era significativa face à redução do tempo de empastagem. Assim, a ação foi validada para implementação.

Uma vez que o patamar a e°C é o mais importante para a formação de açúcares fermentescíveis foi necessário um acompanhamento diário após esta alteração de modo a controlar uma possível diminuição da atenuação limite.

Após a validação de cada uma das propostas de ação acima referidas procedeu-se à alteração da receita do fabrico do mosto X no autómato da Sala de Fabrico Nordon. Os resultados dessas alterações serão demonstrados na seção seguinte.

- **Validação de um novo auxiliar enzimático**

Como mencionado anteriormente, o malte não é o único agente sacarificante permitido na fabricação da cerveja em Portugal. Devido à imprevisibilidade decorrente de uma produção industrial pode haver a necessidade da adição de enzimas de sacarificação para atingir o grau de atenuação pretendido.

Desta forma, esta proposta surgiu tendo como principais objetivos:

- Validação de possível solução como recurso para as épocas em que ocorrem desvios no grau de atenuação limite;
- Validação de possível solução para aumento da atenuação para 70-71%;
- Conhecer o funcionamento da enzima (dosagem e tempo de sacarificação);
- Sem impacto nas características do produto acabado.

O auxiliar enzimático testado contém a enzima glucoamilase (glucan 1,4-alpha-glucosidase), do fornecedor *Novozymes*, e está inserida no grupo do Controlo de Atenuação. Este grupo tem como principais benefícios a produção de cervejas atenuadas de forma rentável, o controlo consistente da atenuação independente da variabilidade das matérias-primas e potenciar tempos de brassagem mais curtos e menor dosagem enzimática (Novozymes, 2013). Esta enzima já constava da lista de auxiliares tecnológicos aprovados pelo Departamento da Qualidade da empresa.

O auxiliar foi adicionado ao mosto, durante a hidratação do malte na caldeira de empastagem e a dosagem foi calculada com base na quantidade de *gritz* utilizada e o grau de atenuação

desejado, 70% a 71%. A atividade enzimática desta enzima é completamente inativada na etapa de ebulição do mosto (Novozymes, 2013).

Segundo a descrição técnica da enzima, a introdução desta enzima no fabrico predispõe uma diminuição do tempo de brassagem, nomeadamente no patamar a e°C. Foi ainda aconselhado o uso de 5kg de enzima com diminuição de 40 minutos no tempo total de sacarificação. Como referido anteriormente, este patamar é crucial para a formação de açúcares fermentescíveis do mosto pela ação da β -amilase e uma diminuição tão drástica neste patamar poderia advir de certos problemas, como o caso da sacarificação incompleta no amido.

Os resultados abaixo apresentados são referentes ao ensaio efetuado com 5 Kg de enzima e redução de 40 minutos ao tempo no patamar a e°C. O gráfico 7 ilustra o processo de brassagem com a introdução da enzima e a redução do tempo. Uma vez que existe a introdução de um novo aditivo na receita, para a realização destes ensaios, foi necessário um acompanhamento mais detalhado do processo, nomeadamente da etapa da fermentação, maturação e produto acabado.

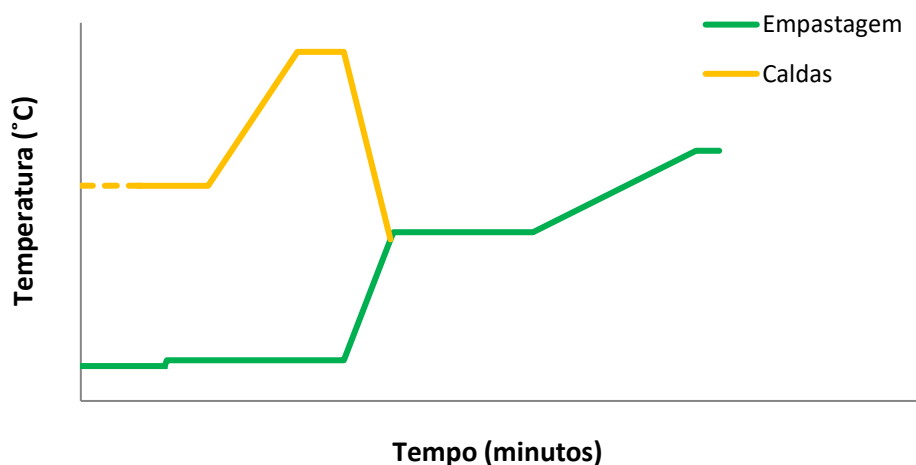


Gráfico 7 - Gráfico do processo de brassagem com a introdução da enzima.

Na tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos da sacarificação do empaste e do grau de atenuação limite.

Tabela 8 - Resultados da sacarificação do empaste e % atenuação limite do mosto, dos fabricos controlo e ensaio.

Ensaio	N° amostras	Parâmetro em análise	
		Sacarificação do empaste	Atenuação limite mosto (%)
Controlo	5	Sim	70,32±0,46
Ensaio	5	Sim	70,50±0,50

Analisando os resultados da tabela 8, verifica-se que o grau de atenuação limite do mosto manteve-se dentro do alvo pretendido e sem desvio significativo face ao controlo. Foram igualmente analisados os restantes parâmetros do mosto, tal como o extrato primitivo, coloração e amargor e não foram detetadas diferenças significativas entre o controlo e o ensaio, estando todos os resultados dentro das especificações definidas pela empresa.

Em todos os fabricos ensaio foram também retiradas amostras a 78°C para analisar a sacarificação do empaste. Em todas as amostras o mosto encontrava-se totalmente sacarificado (cor amarela). Para uma melhor perceção do resultado do teste do iodo foram também retiradas amostras a 72°C. A figura 12 evidencia estas duas situações.



Figura 12 - Resultado do teste do iodo a 72°C, foto da esquerda. Resultado do teste a 78°C, foto da direita.

Com o intuito de perceber a existência de algum impacto, na fermentação e na levedura, a levedura semeada nas cubas foi a mesma (ou seja, foi proveniente da mesma cuba “mãe”). As análises da levedura em *stockagem*, ou seja, da levedura que posteriormente é semeada estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9 - Resultados das análises à levedura em *stockagem* utilizada nos fabricos controlo e ensaio.

Parâmetro em análise – Levedura em <i>stockagem</i>			
Células mortas (%)	Contagem de Células (mlh/ml)	Batérias do Mosto (col/ml)	Batérias Lácticas (col/ml)
7,0	2619	0	0

Daqui observa-se que a % de células mortas e a contagem de células estão dentro dos parâmetros definidos pela empresa. Os resultados microbiológicos da levedura indicam que não existe contaminação.

Na tabela 10 apresentam-se os resultados de parâmetros relevantes da etapa de fermentação. Uma vez que apenas foi realizada uma cuba ensaio (uma fermentação) não existem valores de desvio padrão.

Tabela 10 - Resultados das análises físico-químicas em fermentação e tempo de redução do extrato durante a fermentação.

Ensaio	Parâmetros em análise – fermentação		
	Extrato aparente (°P)	Atenuação real (%)	Tempo redução extrato (dias)
Controlo	2,62	70,2	6,03
Ensaio	2,59	70,4	9,33

Um dos parâmetros mais importantes na etapa da fermentação é a duração da mesma. A fermentação termina quando a diminuição do extrato aparente não ultrapassa os 0,1 mg/l durante dois dias consecutivos. O gráfico 8 correspondente à diminuição do extrato aparente ao longo da fermentação. Observa-se que a duração da fermentação do ensaio foi mais demorada.

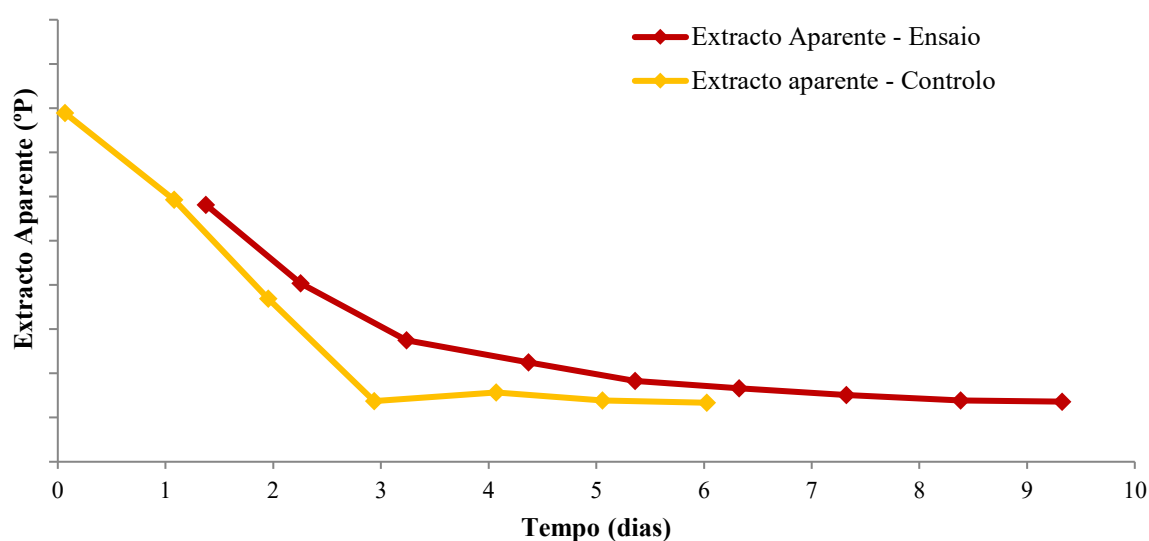


Gráfico 8 - Diminuição do extrato aparente ao longo da fermentação.

Após o término da fermentação, a temperatura da cuba é reduzida e inicia-se a etapa de maturação. Nesta etapa os parâmetros principais de análise são a concentração de diacetilo e o tempo de redução do mesmo e a concentração de dióxido de enxofre (SO₂). O diacetilo é produzido durante a fermentação e, nos casos em que não é metabolizado pelas células da levedura ao longo da fermentação, pode acumular-se e contribuir para um aroma e sabor amanteigado (Kunze, 2014). O SO₂ é produzido pela levedura durante a fermentação e/ou

adicionado posteriormente através de agentes antioxidantes (Kunze, 2014). O resultado de SO₂ apresentado na tabela 11 é o produzido durante a fermentação.

Os resultados destes parâmetros encontram-se na tabela seguinte.

Tabela 11 - Resultados das análises em maturação.

Ensaio	Parâmetros em análise - maturação		
	SO ₂ (mg/L)	Diacetilo (mg/L)	Tempo redução diacetilo (dias)
Controlo	8	0,06	7,2
Ensaio	10	0,05	8,4

A concentração de diacetilo corresponde ao parâmetro essencial da fermentação pois é o que indica quando a cerveja pode passar para a etapa seguinte, a filtração. Desta forma a sua taxa de redução é um parâmetro fundamental neste ensaio. De forma a evitar as características sensoriais indesejadas e garantir a qualidade do produto, a concentração de diacetilo na cerveja não deve ser superior a 0,10 mg/L (Kunze, 2004). Analisando a tabela 21 observa-se que o ensaio tem maior taxa de redução do diacetilo, cerca de 1,3 dias. Relativamente à concentração de SO₂ não existem diferenças significativas entre os resultados da fermentação controlo e ensaio e os resultados estão dentro do expetável.

Após a recolha da levedura foram realizadas análises à mesma, apresentadas na tabela 12. Os resultados estão dentro dos limites especificados pela empresa. Comparando os resultados com as análises efetuadas à levedura em *stockagem* (tabela 9) observa-se que a introdução da referida enzima no fabrico do mosto não teve impacto na levedura.

Tabela 12 - Resultados das análises à levedura recolhida.

Ensaio	Parâmetros em análise – levedura em <i>stockagem</i>			
	Células Mortas (%)	Contagem de Células (milhões/ml)	Bactérias do Mosto (col/ml)	Bactérias lácticas (col/ml)
Controlo	14	2350	0	0
Ensaio	13	2372	0	0

Relativamente ao impacto na qualidade da cerveja, os resultados das análises de qualidade efetuadas ao produto acabado encontram-se nas tabelas que se seguem.

Tabela 13 - Resultados das análises de atenuação real, álcool, estabilidade de espuma e polifenóis totais do produto acabado.

Ensaio	Parâmetros em análise – produto acabado			
	Atenuação Real (%)	Álcool (v/v)	Estabilidade de espuma (seg)	Polifenóis totais (mg/l)
Controlo	71	4,93	244	108
Ensaio	71	4,90	249	109

Tabela 14 - Resultados das análises de diacetilo, SO₂ e turvação do produto acabado.

Ensaio	Parâmetros em análise – produto acabado				
	Diacetilo (mg/l)	SO ₂ total (mg/l)	Turvação 20°C, EBC	Turvação 0°C, EBC	Turvação Total, EBC
Controlo	0,02	9	0,5	0,6	0,7
Ensaio	0,02	10	0,6	0,6	0,9

Tabela 15 - Resultados das análises de acetaldeído e DMS do produto acabado.

Ensaio	Parâmetros em análise – produto acabado	
	Acetaldeído (mg/l)	DMS (µg/l)
Controlo	3,1	9
Ensaio	3,4	11

Todos os resultados dos parâmetros apresentados na tabela 13, 14 e 15 estão dentro das especificações, à exceção da estabilidade de espuma. Neste parâmetro ambos os ensaios deram valor inferior à especificação mínima, de 250 segundos. Comparando os dois resultados verifica-se que a diferença de 5 segundos não é significativa, pelo que neste ensaio a introdução da enzima não teve impacto na estabilidade de espuma do produto acabado.

Segundo o Regulamento (EU) N.º 1129/2011, a concentração máxima permitida de SO₂ total na cerveja, quando adicionado, é 10 mg/L. Concentrações superiores a 10 mg/L devem ser indicadas pelo rótulo “Contém sulfitos”. Analisando a tabela 14 conclui-se que os resultados de SO₂ estão concordantes com o limite legal.

Um parâmetro muito importante a analisar é a turvação da cerveja. A turvação na cerveja representa a quantidade de partículas que estão em suspensão. A turvação a 20°C indica a turvação imediatamente após o enchimento da cerveja. A turvação a 0°C permite determinar se um produto, que aparente ser límpido e brilhante a 20°C, fica turvo quando submetido a temperaturas mais baixas. Resultados de turvação abaixo de 1 EBC indicam que a turvação não

é detetável a “olho nu” (Hyttinen, 2011) (Kunze, 2014). A turvação total representa o grau de estabilização da cerveja e o comportamento desta durante o seu armazenamento no mercado até ser consumida (Hyttinen, 2011). Analisando a tabela 14, verifica-se que não há diferenças significativas nas análises de turvação entre o controlo e o ensaio.

Outro dos parâmetros fundamentais a ser examinado neste ensaio é a análise sensorial, nomeadamente, o perfil aromático e o teste triangular.

Em relação à avaliação do perfil aromático esta foi satisfatória para o ensaio, -0,8, e não suficientemente satisfatória para o controlo, -1,4. Os defeitos detetados pelos provadores na amostra controlo foram carbonatação insuficiente e oxidada. Tanto no produto acabado do ensaio como no controlo não foram detetados defeitos relacionados com o processo de fabricação. No caso do teste triangular este demonstrou que não existem diferenças significativas entre as amostras. Ambas as análises sensoriais contaram com 10 provadores.

Como referido anteriormente, o objetivo deste ensaio é o conhecimento de como utilizar esta enzima, nomeadamente, quantidades e tempo de empastagem, para o aumento da atenuação, sem impacto no produto acabado. Este objetivo foi cumprido. Contudo, é importante referir que existem alguns parâmetros que necessitam de ser alvo de realização de mais ensaios e de um estudo mais detalhado, nomeadamente, a taxa de redução de extrato (TRE), taxa de redução de diacetilo (TRD) e razão A/E diferentes entre controlo e ensaio.

6. Conclusões gerais

Este projeto teve como objetivo principal melhorar o controlo da atenuação limite: obter valores superiores e menor tempo de brassagem pela otimização da atividade enzimática. Outro objetivo proposto foi a validação de utilização de um novo auxiliar enzimático.

A atenuação limite final estabelece o conteúdo de álcool potencial da cerveja, sendo por isso um fator determinante no processo cervejeiro.

Na caracterização da situação atual verificou-se que existiam diferenças nos valores de pH e patamares de temperatura face à bibliografia. Com a alteração das quantidades de ácido fosfórico e cloreto de cálcio e consequentemente a alteração das especificações de pH, juntamente com a introdução do patamar a 72°C, observou-se um aumento da atenuação limite no mosto. Foi também possível a redução em 10 minutos no patamar de temperatura da atividade da β -amilase sem impacto significativo no processo. Através dos resultados obtidos foi possível concluir que o valor de pH das empastagens possui bastante importância no processo de conversão dos açúcares do mosto. Após a otimização deste valor foi possível a diminuição do tempo de brassagem sem alterações significativas do grau de atenuação limite, ou seja, tornou o processo mais eficiente. De igual forma a introdução do novo patamar de temperatura permitiu a otimização enzimática da α -amilase, o que reflete numa menor perda de extrato e num possível impacto nas quebras do processo de fabrico do mosto, que será alvo de avaliação.

Por outro lado, não se verificaram mais ocorrências de valores de atenuação limite abaixo da especificação e verificou-se uma melhoria na estabilidade dos resultados, como se verifica no gráfico 10. Analisando o gráfico 11, conclui-se que a atenuação real (que corresponde à quantidade de açúcares ainda presentes no mosto após fermentação) consegue alcançar a atenuação limite, o que significa que a quantidade de açúcares fermentescíveis presentes no mosto (atenuação limite) foram consumidos pela levedura, durante o processo de fermentação. Uma diferença significativa entre a atenuação real e a atenuação limite indica que a fermentação não está completa, havendo risco de contaminação por leveduras e bactérias (Kunze, 2014).

Com o acompanhamento após estas alterações verificou-se que não houve impacto negativo no perfil do mosto e do produto acabado.

O gráfico 9 apresenta o gráfico de brassagem atual com as alterações efetuadas: o tempo de repouso a e°C foi reduzido em 10 minutos e introduziu-se o patamar a 72°C com repouso de 10 minutos.

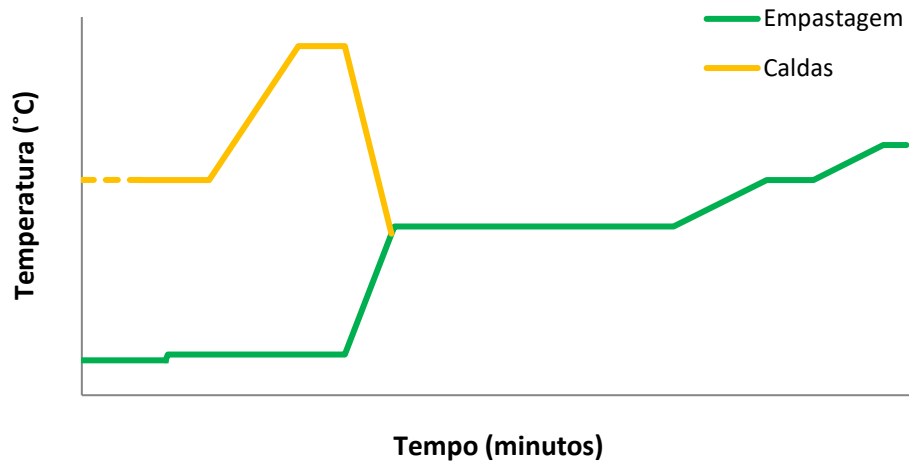


Gráfico 9 - Gráfico atual do processo de brassagem por decoção do mosto X.

A tabela 18 apresenta as alterações da especificação dos valores de pH no Manual Técnico do mosto X.

Tabela 16 - Especificações após alteração da receita do mosto X.

Cerveja / Característica		pH Empastagem gritz	pH Empastagem malte
Mosto X	LIE	5,40	5,20
	Alvo	5,60	5,40
	LSE	5,80	5,50

Os gráficos 10 e 11 apresentam os resultados obtidos nomeadamente da atenuação limite e atenuação real:

- A ação 1 corresponde à otimização do pH na empastagem;
- A ação 2 corresponde à diminuição do tempo de sacarificação;
- A ação 3 diz respeito à introdução do patamar a 72°C com repouso de 10 minutos.

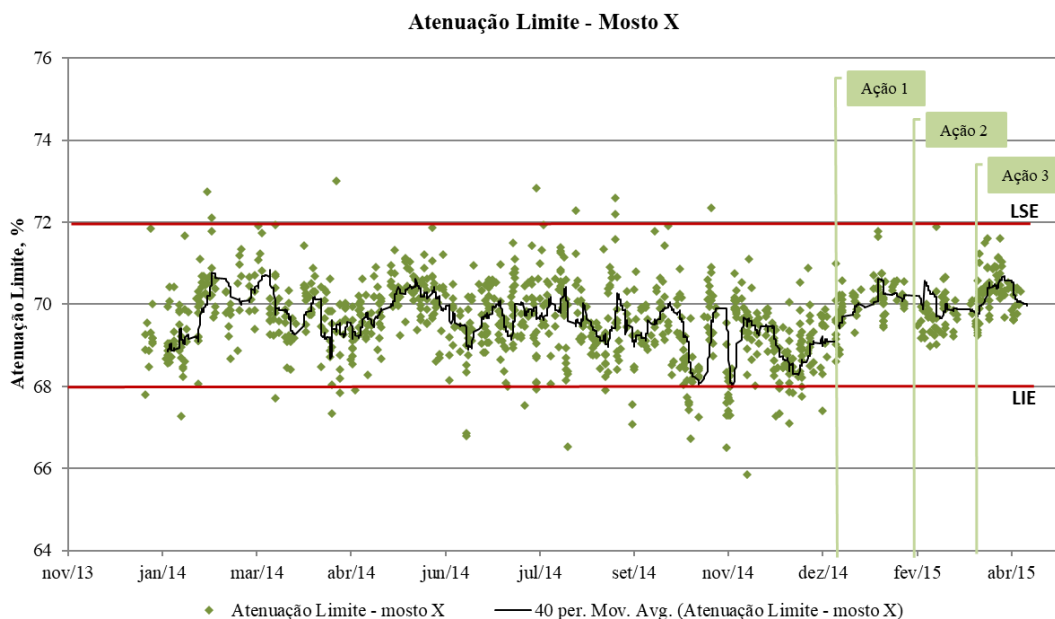


Gráfico 10 - Resultados Atenuação Limite do mosto X, antes e após otimização do fabrico do mosto.

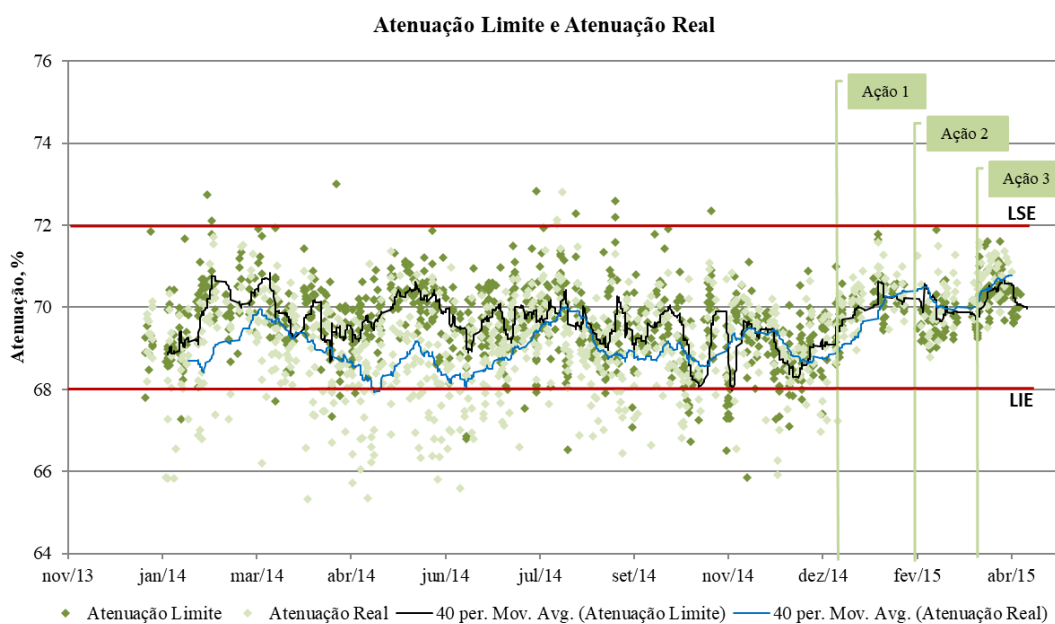


Gráfico 11 - Resultados da atenuação limite e atenuação real, antes e após otimização do fabrico do mosto.

Relativamente à validação de um novo auxiliar enzimático conclui-se que, para se atingir a atenuação limite pretendida (70-71%) a dosagem recomendada é de 5Kg e redução de 40 minutos do patamar de ação da β -amilase. O critério de sucesso deste objetivo, para além da obtenção da atenuação limite pretendida, incidia-se na manutenção da estabilidade coloidal, características físico-químicas e sensoriais da cerveja. Desta forma, foram analisados os parâmetros de controlo de qualidade do produto acabado de modo a validar a utilização da referida enzima. Os ensaios realizados mostram que as restrições impostas à qualidade do

produto final são respeitadas. A sua utilização foi aprovada para utilização em condições específicas de dificuldade em atingir o alvo do grau de atenuação.

O gráfico 10 apresenta o diagrama de brassagem com a utilização deste auxiliar enzimático.

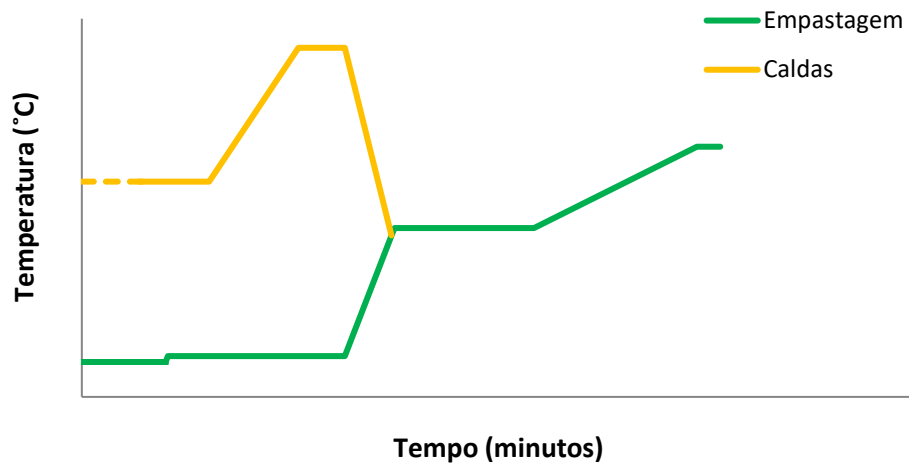


Gráfico 10 - Diagrama de brassagem com a utilização de um novo auxiliar enzimático.

7. Trabalho futuro

Relativamente à introdução do patamar a 72°C é necessária uma avaliação mais pormenorizada do rendimento dos fabricos ao longo do tempo para confirmar se existe um aumento do rendimento.

Relativamente à utilização da nova enzima é relevante a realização de um estudo mais detalhado do impacto na fermentação e na razão Álcoois/Esteres. De igual modo considero pertinente novos ensaios de forma a otimizar a quantidade de enzima e o tempo de empastagem.

8. Bibliografia

- A Henham. (2002). *European Brewery Conention Manual of Good Practises - Wort Boiling and Clarification*.
- Briggs. (2004). *Brewing Science and practice*. Woodhead Publishing Limited.
- Eßlinger, H. M. (2009). *Handbook of Brewing - Processes, Technology, Markets*. Weinheim: ILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Flickinger, Michael C.; Drew, Stephen W. (1999). *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation (VOLUMES 1 - 5)*. John Wiley & Sons, Inc.
- Goldammer, T. (2008). *The Brewer`s Handbook Second Edition*. U.S.A: Apex Publishers.
- Hyttinen, I. (2011). *Brewing 1: Beer Haze (Faculty of Life Sciences - University of Copenhagen)*.
- Jespersen, B. M. (2008). *Brewing 1: Barley and Malt Chemistry (Faculty of Life Sciences - University of Copenhagen)*.
- Kristiansen, A. G. (2011). *Adjunts in Brewing - Diploma Master Brewer Course The Scandinavian School of Brewing*.
- Kunze, W. (2014). *Technology brewing and malting, 5th revised English edition*. Berlin: VLB.
- Novozymes. (2013). *Brewing Handbook - A handbook of Novozymes' solutions*.
- O'Rourke, T. (2011). *Wort production: Mashing Theory - Diploma Master Brewer Course The Scandinavian School of Brewing*. .
- Paludan-Müller, T. (2009). *Spent Grains - Diploma Master Brewer Course The Scandinavian School of Brewing*. .
- Reichelt, T. G. (1983). *Industrial enzymology: The application of enzymes in industry*.
- Tom A. Bringhurst. (2003). *Whisky - Technology, Production and Marketing (Chapter 2 - Malt whiskies: raw materials and processing)*. Elsevier.
- Tom A. Bringhurst. (2003). *Whisky - Technology, Production and Marketing (Chapter 3 - Grain whisky: Raw materials and processing)*. Elsevier.
- Willaert, R. (2004). "Beer", in *Alcoholic Beverages Manual*.
- Young, T. W. (2009). Obtido de Encyclopedia Britannica: <https://www.britannica.com/topic/beer>
- Zobel, H. F. (1984). *Starch: Chemistry and Technology*. R. L. Whistler, J. N.