

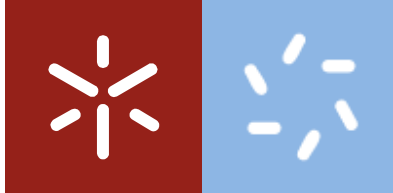


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Marta Filipa Rodrigues Marques

**Aumento da Capacidade de Produção  
na Indústria Cervejeira**





**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Marta Filipa Rodrigues Marques

**Aumento da Capacidade de Produção  
na Indústria Cervejeira**

Tese de Mestrado  
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação do  
**Professora Doutora Sílvia Pereira Lima**  
e  
**Verónica Coelho Guimarães Rodrigues**

## DECLARAÇÃO

Nome: Marta Filipa Rodrigues Marques

Endereço eletrónico: marta.fm12@live.com.pt

Número do Cartão de Cidadão: 14892113

Título dissertação:

Aumento da Capacidade de Produção na Indústria Cervejeira

Orientador(es):

Professora Doutora Sílvia Pereira Lima

Verónica Coelho Guimarães Rodrigues

Ano de conclusão: 2018

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, 30/10/2018

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à empresa *Super Bock Group* pela oportunidade de realizar o estágio curricular que dá origem a este trabalho nas suas instalações.

Um agradecimento especial a todas as pessoas do Laboratório Central pelo acolhimento e pelos bons momentos passados, por todo o apoio e ensinamentos, mas sobretudo pela disponibilidade ao longo de todo o estágio.

A todas as equipas do fabrico e da adega quero prestar o meu sincero agradecimento pela disponibilidade e pela ajuda prestada neste trabalho.

Agradeço em especial às minhas colegas de estágio, Glória, Ana Rita e Inês.

Quero agradecer principalmente à Marta, ao Jorge e à Benedita, por ao longo destes meses me tratarem como se fosse da família.

Aos meus amigos o meu obrigada por todo o apoio ao longo destes anos, particularmente à Verónica, à Daniela e à Mariana.

Agradeço à minha orientadora da empresa Verónica Rodrigues pelo apoio e pelo conhecimento transmitido ao longo de todo o estágio.

Agradeço à minha orientadora académica a Professora Doutora Sílvia Pereira Lima pela paciência e pelo apoio ao longo de todo este percurso.

Por fim e não menos importante agradeço à minha família, especialmente aos meus pais e à minha irmã, eles sem dúvida são o meu pilar.

A todos o meu Obrigada.



## Resumo

A cerveja é uma bebida alcoólica vastamente consumida em todo o mundo. O processo cervejeiro é conhecido há vários milhares de anos e consiste de vários passos passíveis de controlo por parte dos cervejeiros de modo a obter cerveja com a maior qualidade possível.

A vasta comercialização da cerveja leva a que sejam pensadas estratégias para aumentar a capacidade de produção. Uma das etapas do processo é a maturação, na qual a redução da concentração de diacetilo a valores desejáveis e não detetáveis aos consumidores constitui o passo limitante. Na empresa *Super Bock Group* foram levados a cabo ensaios para aumentar a celeridade da redução da concentração de diacetilo no processo de maturação. Um dos ensaios foi um ensaio de pH, a pH 4,94 e 5,09, com o objetivo de verificar se um pH mais baixo influencia a redução da concentração de diacetilo. Num segundo ensaio, testou-se a adição da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase, em várias cervejas diferentes fabricadas no *Super Bock Group*, tendo-se verificado uma diminuição do tempo de maturação.

Foi também realizado um ensaio para aumentar a capacidade de produção na adega, otimizando a receita de uma cerveja. Este ensaio teve duas fases, uma primeira de testes em laboratório: teste da base de cerveja, do açúcar e do fornecedor do concentrado. Após os resultados obtidos decidiu-se avançar para a segunda fase, com a produção da cerveja com a nova base de cerveja, a nível industrial. Com base nos resultados físico-químicos e da análise sensorial verificou-se que não haviam diferenças significativas entre a cerveja ensaio e controlo.

O aumento da capacidade de produção também pode ser conseguido aumentando o volume de mosto em cada cuba cilindro cónica. Nesse sentido, foi realizado um ensaio com adição de um antiespumante, de forma a evitar a formação de um grande volume de espuma e aumentar assim a capacidade da cuba. A utilização do antiespumante mostrou-se eficaz e um maior volume de mosto pode ser utilizado.





## Abstract

Beer is an alcoholic beverage widely consumed all over the world. The brewing process has been known for thousands of years and consists of several brewers controllable steps in order to obtain the highest quality beer possible.

The vast commercialization of beer leads to strategies for increasing production capacity. One of the process steps is maturation, in which the reduction of the concentration of diacetyl to desirable and undetectable values to consumers is the limiting step. In the company *Super Bock Group* tests were carried out to increase the celerity of the reduction of the concentration of diacetyl during the maturation. One of the assays performed was a pH assay, at pH 4.94 and 5.09, in order to check whether a lower pH influences the reduction of the diacetyl concentration. In a second assay, the addition of the  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase enzyme was tested in several different beers manufactured in the *Super Bock Group*, and a decrease in the maturation time was observed.

An experiment was also carried out to increase the production capacity in the cellar, optimizing the recipe of a beer. This trial had two phases, a first laboratory phase with beer base, the sugar and the supplier of the concentrate tests. After the results obtained it was decided to advance to the second phase, with the production of the optimized beer at industrial level. Based on the physical-chemical results and the sensory analysis it was found that there were no significant differences between the beer assayed and the control.

The increase in production capacity can also be achieved by increasing the volume of wort in each cylindroconical vessel. In this sense, an assay was carried out with the addition of an antifoam agent so as to avoid the formation of a large volume of foam and thus increase the capacity of the vessel. The use of the antifoam agent proved to be effective and a larger volume of wort could be used.



# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract.....	vii
Índice .....	ix
Índice de figuras .....	xi
Índice de tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas e acrónimos .....	xvi
1 Introdução .....	1
1.1 Apresentação da empresa.....	3
1.2 Breve história da cerveja.....	4
1.3 A cerveja .....	5
1.4 Processo cervejeiro .....	6
1.4.1 Matérias primas .....	6
1.4.2 Produção do mosto .....	10
1.4.3 Fermentação.....	16
1.4.4 Filtração.....	23
1.5 Objetivos do trabalho desenvolvido .....	23
2 Métodos.....	25
2.1 Análises de controlo de qualidade .....	27
2.1.1 Determinação das características físico-químicas .....	27
2.1.2 Determinação do amargor .....	28
2.1.3 Determinação da estabilidade de espuma.....	28
2.1.4 Determinação da concentração de diacetilo .....	28
2.1.5 Determinação da concentração de CO <sub>2</sub> .....	29
2.1.6 Determinação da concentração de álcoois, ésteres, acetaldeído e DMS.....	30
2.1.7 Determinação da concentração de polifenóis totais .....	30
2.1.8 Determinação da concentração do nitrogénio aminado livre .....	31
2.1.9 Determinação da Turvação a 20 °C e 0 °C .....	31
2.1.10 Determinação da estabilidade coloidal .....	32
2.1.11 Determinação da concentração de SO <sub>2</sub> total.....	32

2.1.12	Determinação da contagem de células da levedura.....	33
2.1.13	Análise Sensorial.....	33
2.2	Ensaio para o aumento da capacidade de produção .....	33
2.2.1	Procedimentos gerais nos ensaios industriais .....	34
2.2.2	Ensaio de pH .....	34
2.2.3	Ensaio de otimização da receita de uma cerveja .....	35
2.2.4	Ensaio com a enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase.....	36
2.2.5	Ensaio com a utilização de um antiespumante .....	39
3	Resultados e Discussão.....	41
3.1	Ensaio de pH.....	43
3.1.1	Resultados físico-químicos da preparação dos fabricos .....	43
3.1.2	Resultados físico-químicos durante a fermentação .....	44
3.1.3	Resultados físico-químicos em maturação.....	48
3.2	Ensaio otimização da receita da Cerveja A.....	48
3.2.1	Preparação do produto acabado em laboratório.....	48
3.2.2	Ensaio industrial com alteração apenas da Base de Cerveja.....	50
3.3	Ensaio com a solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase.....	52
3.3.1	Ensaio da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B.....	52
3.3.2	Ensaio da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C.....	59
3.3.3	Ensaio da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja D.....	63
3.4	Ensaio com a utilização de um antiespumante.....	66
3.4.1	Resultados físico-químicos médios do mosto .....	66
3.4.2	Resultados de extrato aparente, contagem de células e diacetilo para o Controlo IV e Ensaio IV.....	67
3.4.3	Resultados físico-químicos das cubas em maturação dos ensaios .....	70
3.4.4	Resultados dos produtos acabados dos ensaios.....	71
4	Conclusão.....	73
5	Referências Bibliográficas.....	77

## Índice de figuras

Figura 1: A fabricação de pão e cerveja no túmulo de Ti. ....	4
Figura 2: Malte de cevada. ....	6
Figura 3: Inflorescências da planta fêmea do lúpulo ....	8
Figura 4: Estruturas químicas dos $\alpha$ -ácidos: a) humulona, b) cohumulona, c) adhumulona. ....	9
Figura 5: Levedura por microscopia eletrônica. ....	10
Figura 6: Tanque de empastagem. ....	12
Figura 7: Exemplo de uma cuba filtro. ....	13
Figura 8: Filtros de placas Meura 2001 presentes na <i>Super Bock Group</i> . ....	14
Figura 9: Isomerização do $\alpha$ -ácido Humulona. ....	15
Figura 10: Via metabólica da fermentação alcoólica em <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> . ....	18
Figura 11: Vias biossintéticas para a formação de compostos voláteis em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	19
Figura 12: Vias de formação e redução do diacetilo e 2,3-pentanodiona, bem como de síntese da valina e isoleucina na levedura <i>Saccharomyces spp.</i> ....	21
Figura 13: <i>Alkolyzer Plus Beer Analysis System</i> da <i>Anton Paar</i> presente no laboratório central. ....	27
Figura 14: Equipamento utilizado na determinação da estabilidade de espuma pelo método <i>NIBEM</i> . ....	28
Figura 15: Equipamento utilizado na determinação da concentração de diacetilo por Cromatografia Gasosa. ....	29
Figura 16: <i>Carbo QC</i> , equipamento utilizado para medição da concentração de $\text{CO}_2$ . ....	30
Figura 17: Aparelho <i>LabScat</i> da <i>Sigris</i> utilizado para medição das turvações e da estabilidade coloidal. ....	32
Figura 18: Contador de células eletrônico <i>Z2</i> da <i>Beckman Coulter</i> utilizado para a contagem de células de levedura. ....	33
Figura 19: Reação catalisada pela $\alpha$ -acetolactato descarboxilase. ....	37
Figura 20: Imagem fotográfica da colocação da enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na linha de arrefecimento do mosto. ....	37
Figura 21: Representação dos valores de extrato aparente em função do tempo de fermentação nos ensaios realizados a diferente pH. ....	45
Figura 22: Contagens de células de levedura em função do tempo de fermentação, no ensaio de pH. ....	46

<b>Figura 23:</b> Representação gráfica das determinações das concentrações de diacetilo (mg/L) em função do tempo de fermentação, para o ensaio de pH.....	46
<b>Figura 24:</b> Representação gráfica do efeito da ação da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase nos resultados de extrato aparente ao longo do tempo de fermentação, para a Cerveja B. ....	53
<b>Figura 25:</b> Representação gráfica do efeito da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase nos resultados de contagens de células de levedura durante o tempo de fermentação, para a Cerveja B.....	54
<b>Figura 26:</b> Representação gráfica do efeito da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na concentração de diacetilo ao longo do tempo de fermentação para a Cerveja B.....	54
<b>Figura 27:</b> Representação gráfica do efeito da ação da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase nos resultados de extrato aparente ao longo do tempo de fermentação para a Cerveja C. ....	60
<b>Figura 28:</b> Representação gráfica do efeito da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase nos resultados de contagens de células de levedura durante o tempo de fermentação, para a Cerveja C.....	60
<b>Figura 29:</b> Representação gráfica do efeito da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase nos resultados das concentrações de diacetilo ao longo do tempo de fermentação para a Cerveja C.....	61
<b>Figura 30:</b> Representação gráfica dos resultados de extrato aparente ( $^{\circ}$ P) para as cubas cilindro cónicas ensaio ao longo da fermentação da Cerveja D com adição da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase. ....	64
<b>Figura 31:</b> Representação gráfica dos resultados das contagens de células para as cubas cilindro cónicas ensaio ao longo da fermentação da Cerveja D com adição da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase. ....	65
<b>Figura 32:</b> Representação das determinações das concentrações de diacetilo ao longo da fermentação da Cerveja D com adição da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase. ...	65
<b>Figura 33:</b> Representação gráfica do efeito da ação do antiespumante na Cerveja B nos resultados de extrato aparente ao longo do tempo de fermentação, no controlo e ensaio IV. ....	68
<b>Figura 34:</b> Representação gráfica da contagem de células de levedura no estudo da utilização do antiespumante na Cerveja B ao longo da fermentação para a cuba controlo e ensaio IV.....	68

**Figura 35:** Representação gráfica das concentrações de diacetilo para a cuba controlo e ensaio IV no ensaio da utilização do antiespumante na Cerveja B..... 69

**Figura 36:** Representação gráfica da estabilidade de espuma da Cerveja B ao longo do tempo. 72

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Efeitos dos iões presentes na água usada no processo cervejeiro .....	7
<b>Tabela 2:</b> Diferentes combinações dos ensaios de otimização da receita de Cerveja A realizados em laboratório. ....	36
<b>Tabela 3:</b> Valores de pH no início e fim de ebulição dos fabricos do ensaio de pH.....	43
<b>Tabela 4:</b> Resultados dos parâmetros físico-químicos analisados nos mostos frios e respetivos desvios padrão no ensaio de pH. ....	44
<b>Tabela 5:</b> Resultados microbiológicos da levedura semeada e recolhida para ambas as cubas cilindro cónicas do ensaio de pH.....	47
<b>Tabela 6:</b> Valores dos resultados físico-químicos das amostras das cubas cilindro-cónicas em maturação no ensaio de pH.....	48
<b>Tabela 7:</b> Resultados físico-químicos da Cerveja A preparada em laboratório com diferentes bases de cerveja, açúcares e concentrados de diferentes fornecedores. ....	49
<b>Tabela 8:</b> Resultados da análise sensorial realizada aos diferentes produtos acabados produzidos em laboratório para a Cerveja A com diferentes bases, açúcares e concentrados de diferentes fornecedores por sete provadores. ....	50
<b>Tabela 9:</b> Resultados físico-químicos da Cerveja A produzida industrialmente com as bases de cerveja X e W.....	51
<b>Tabela 10:</b> Resultados físico-químicos do Produto Acabado do ensaio industrial Cerveja A com as bases de cerveja X e W. ....	51
<b>Tabela 11:</b> Resultados da análise sensorial realizada aos produtos acabados Cerveja A com Base X e Base W.....	52
<b>Tabela 12:</b> Resultados físico-químicos médios do mosto frio usado para encher as cubas controlo e ensaio, no ensaio com a solução da enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B. ....	52
<b>Tabela 13:</b> Valores das características físico-químicas das cubas em maturação no ensaio da ação da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B.....	55
<b>Tabela 14:</b> Resultados das análises realizadas ao produto acabado, controlo e ensaio, no estudo da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B. ....	56
<b>Tabela 15:</b> Concentração dos álcoois e ésteres presentes no produto acabado, controlo e ensaio, no estudo da utilização da enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B. ....	57
<b>Tabela 16:</b> Resultados da análise sensorial realizada ao produto acabado do controlo e do ensaio no estudo da ação da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B.....	58



<b>Tabela 17:</b> Resultados físico-químicos médios dos fabricos no teste de utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C e respetivo desvio padrão. ....	59
<b>Tabela 18:</b> Resultados físico-químicos das cubas ensaio e controlo na fase de maturação, no estudo da utilização da enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C. ....	61
<b>Tabela 19:</b> Resultados das análises do produto acabado do controlo e do ensaio, do estudo da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C. ....	62
<b>Tabela 20:</b> Resultados da análise sensorial realizada ao produto acabado, o controlo e ensaio, no estudo da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C. ....	63
<b>Tabela 21:</b> Resultados físico-químicos médios do mosto e respetivo desvio padrão para os dois ensaios de utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja D. ....	63
<b>Tabela 22:</b> Resultados das análises realizadas às cubas cilindro cónicas em maturação para a Cerveja D no estudo da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase. ....	66
<b>Tabela 23:</b> Resultados físico-químicos médios do mosto e respetivo desvio padrão para os ensaios da utilização do antiespumante na Cerveja B, e volume de mosto na cuba cilindro cónica. ....	67
<b>Tabela 24:</b> Resultados das análises realizadas às cubas cilindro cónicas em maturação para a Cerveja B no ensaio da utilização do antiespumante, nos diferentes controlos e ensaios. ....	70
<b>Tabela 25:</b> Valores das características analisadas no produto final dos diferentes ensaios e controlos no estudo da utilização do antiespumante na Cerveja B. ....	71
<b>Tabela 26:</b> Resultados da análise sensorial realizada aos produtos acabados da Cerveja B no estudo da utilização do antiespumante. ....	72

## Lista de abreviaturas e acrónimos

Abs - Absorvância

ALDC -  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase

COPEJA - Companhia Portuguesa de Cerveja

CUFP - Companhia União Fabril Portuense das Fábricas de Cerveja e Bebidas Refrigerantes

DMS - dimetilsulfureto

EBC - Convenção Europeia de Cervejaria- do inglês *European Brewery Convention*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FAN - Nitrogénio aminado livre - do inglês *Free Amino Nitrogen*

LED - Diodo emissor de Luz- do inglês *Light Emitting Diode*

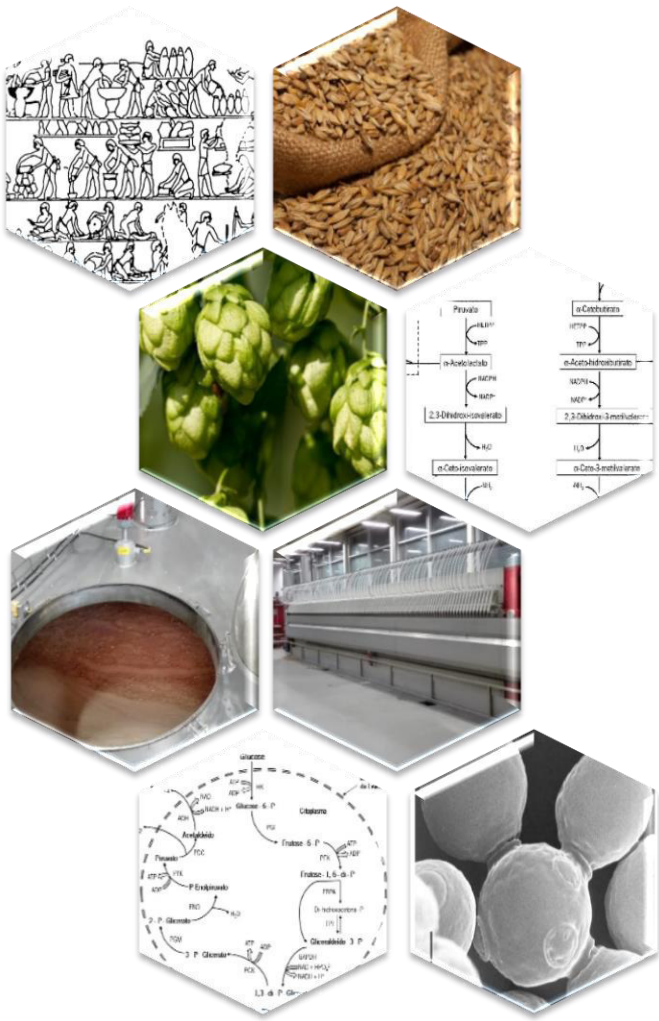
RICAL- Empresa Produtora de Refrigerantes e Água, Lda

TCF - Tanque de Cerveja Filtrada

TCFs - Tanques de Cerveja Filtrada

UA - Unidades de Amargo

# 1 Introdução





### 1.1 Apresentação da empresa

O *Super Bock Group* é a maior empresa de bebidas refrescantes, atualmente em Portugal. A sua origem remonta a 7 de março de 1890 com a constituição da *Companhia União Fabril Portuguesa das Fábricas de Cerveja e Bebidas Refrigerantes (CUFP)*, no início da industrialização dos setores de bebidas no nosso país.<sup>1</sup>

Ao longo da sua existência imensas alterações foram verificadas, passando a empresa por nacionalização, na década de 70 na sequência do 25 de abril, ocorrendo a transformação da *CUFP* em *Unicer - União Cervejeira E.P.*, que resultou da fusão da *CUFP* com a *COPEJA*, com a *Imperial* e ainda com a *RICAL*. Na década de 80, a empresa sofre privatização convertendo-se em *Unicer S.A.* A 1 de janeiro de 2001 a *Unicer* sofre mais uma alteração e começa a designar-se *Unicer - Bebidas de Portugal, S.A* ao adquirir o Grupo *Vidago, Melgaço, Pedras Salgadas* e a *Caféeira*. Em novembro de 2017 é anunciada uma nova mudança de identidade, inicia assim uma nova era a intitular-se *Super Bock Group*.<sup>1</sup>

A atividade do grupo, de capital maioritariamente português (56% pelo grupo *Viacer* e 44% pelo grupo *Carlsberg*), foca-se no negócio das cervejas, águas engarrafadas, vinhos e refrigerantes, mas também na produção e comercialização de malte e ainda no turismo, através da gestão dos *Parques Lúdico-Termais de Vidago e Pedras Salgadas*.<sup>1</sup>

## 1.2 Breve história da cerveja

A tentativa deliberada de produção de cerveja pelo homem desaparece na penumbra do passado distante, estando provavelmente ligada com a fixação dos caçadores - coletores e o despontar da agricultura.<sup>2</sup>

A menção presumivelmente mais antiga da cerveja encontra-se na escrita cuneiforme da Mesopotâmia do ano 2800 antes de Cristo, que descreve a distribuição diária da cerveja e do pão.<sup>2</sup> Noutra civilização primitiva, - a Egípcia, é apresentado um melhor conhecimento sobre a produção de cerveja. Os egípcios, nas paredes dos túmulos exibiram o processo de fabricação. No antigo Egito tal como na Mesopotâmia, a cerveja era um item essencial e desempenhava um papel fundamental no culto e na medicina.<sup>3</sup>



**Figura 1:** A fabricação de pão e cerveja no túmulo de Ti. (Reproduzido da referência 4)

Na Europa, a cerveja, era uma bebida amada pelas tribos germânicas, pelos citas e celtas. Em todas as culturas primitivas o processo de fabricação de cerveja era desenvolvido pelas mulheres.<sup>2</sup>

Nas cervejarias das fundações religiosas cristãs, como mosteiros e conventos, onde a cerveja era produzida não só para consumo próprio, mas também como forma de pagamento, ocorreram as mudanças que transformaram a produção de cerveja num processo industrial. Simultaneamente, deixou de ser um trabalho exclusivamente de mulheres e passou a ser um trabalho de homens.<sup>2</sup>

No século XIX, para tentar explicar as alterações que ocorrem durante a fermentação foram desenvolvidas várias teorias. Grande parte do debate centrou-se na questão de saber se a fermentação era um processo puramente químico ou um processo biológico.<sup>5</sup>

O francês Louis Pasteur demonstrou que os processos de fermentação se devem à atividade de microrganismos. As suas intuições sobre a fermentação e os requisitos essenciais para tornar a cerveja estável ainda são válidos atualmente.<sup>2</sup> Em 1883, Emil Christian Hansen estabeleceu o método de utilização de culturas puras de levedura para produzir cerveja na cervejaria *Carlsberg*, na Dinamarca.<sup>5</sup>

Em meados do século XIX, foram fundadas na Europa e na América um grande número de cervejarias operadas industrialmente e algumas já existentes foram modernizadas, no entanto, durante este período o trabalho manual ainda representava uma grande parte do trabalho.<sup>2</sup>

Por fim, a introdução de sistemas de monitorização e controlo permitiu supervisionar todo o processo de produção de cerveja e incorporar a automação. Tornou-se possível a realização das operações necessárias de forma totalmente automática.<sup>2</sup>

### 1.3 A cerveja

A cerveja é definida como uma bebida, geralmente alcoólica, obtida por fermentação de um meio aquoso que contém açúcares derivados principalmente de cereais e que é normalmente aromatizada com lúpulo, podendo ser utilizados outros agentes aromatizantes. Apesar do álcool ser um produto da fermentação, a sua concentração pode ser muito variada e nem todas as cervejas possuem álcool. Por isso, muitos países tem definições legais que estipulam a concentração mínima de álcool que uma bebida deve conter para que possa ser rotulada como cerveja.<sup>6</sup>

A produção de cerveja encontra-se intimamente relacionada com três processos bioquímicos: a formação de enzimas na germinação dos grãos, a conversão do amido em açúcar por essas enzimas e a consequente fermentação do açúcar em álcool e dióxido de carbono.<sup>2</sup>

O sabor da cerveja e a sua perceção pelo consumidor é previsivelmente complexo e difícil de analisar e quantificar de maneira satisfatória, sendo importantes a combinação do sabor, aroma e aparência.<sup>6</sup>

As características específicas de qualquer cerveja são definidas pelo cervejeiro e o modo de operação implica controlar todo o processo de forma a garantir que não haja diferenças significativas entre as produções. Isso depende do estabelecimento de especificações físicas e químicas e organolépticas que descrevam parâmetros passíveis de análise. O sistema de qualidade fornece a estrutura necessária para alcançar essas especificações.<sup>6</sup>

### 1.4 Processo cervejeiro

O Processo cervejeiro envolve a extração e quebra dos hidratos de carbono do malte de cevada, de modo a obter-se o mosto que é constituído também pelos nutrientes necessários para o crescimento da levedura. Durante a fermentação, os açúcares são consumidos pela levedura, que produz etanol e outros subprodutos metabólicos.<sup>7</sup>

#### 1.4.1 Matérias primas

A produção de cerveja implica quatro matérias primas essenciais, o malte de cevada, a água, o lúpulo e a levedura. É indispensável garantir a sua qualidade, pois exercem um papel decisivo na qualidade do produto final, logo é necessário o conhecimento das suas propriedades intrínsecas de forma a assegurar uma manipulação e processamento corretos.<sup>8</sup>

##### 1.4.1.1 Malte de cevada

O malte de cevada é vastamente utilizado para produzir a maioria das cervejas em todo mundo, sendo a principal fonte de amido.<sup>9</sup> O malte de cevada é obtido a partir do processo de maltagem da cevada.



**Figura 2:** Malte de cevada. (Fonte: referência 10)



A cevada, *Hordeum vulgare*, pode ser classificada em dois tipos, cevada de Inverno cujas sementes são semeadas em setembro, e cevada de Primavera, semeada em março e abril. Ambos os tipos podem ser divididos em várias variedades.<sup>8</sup>

A sua composição química baseia-se maioritariamente em hidratos de carbono (70,0-85,0%), mas também contém proteínas (10,5-11,5%), matéria inorgânica (2,0-4,0%), gorduras (1,5-2,0%) entre outras substâncias (1,0-2,0%).<sup>8</sup>

**Tabela 1:** Efeitos dos iões presentes na água usada no processo cervejeiro. (Adaptado da referência 11)

<b>lão</b>	<b>Efeito</b>
Amónio	Indicativo de contaminação por material orgânico decomposto.
Cálcio	Interage com o fosfato e com proteínas para reduzir o pH na empastagem. Promove a formação de um mosto brilhante e uma boa filtração. Precipita o oxalato do mosto que pode provocar turvação da cerveja. Ativa a $\alpha$ -amilase e protéases na empastagem. Promove a floculação da levedura no fim da fermentação. A altas concentrações inibe a extração das resinas do lúpulo. Tem um sabor amargo adstringente.
Cobre	Tóxico para a levedura a altas concentrações.
Ferro	Tóxico para a levedura. Pode provocar turvação e alterações adversas na cor da cerveja.
Magnésio	Reduz o pH do mosto pela interação com os fosfatos, mas é menos importante que o cálcio. É um importante co-fator para muitas enzimas.
Manganês	Co-fator de muitas enzimas da levedura e do malte.
Potássio	Transmite sabor salino à cerveja.
Sódio	Pode contribuir para um sabor salgado em concentrações a partir de 150-200 ppm, especialmente na forma de cloreto de sódio. <sup>12</sup> A concentrações até 100 ppm podem produzir um efeito adoçante no palato quando associado com os iões cloreto. <sup>12</sup>
Zinco	Inibidor do crescimento da levedura a altas concentrações (>1 ppm) mas estimula a fermentação a baixas concentrações (0,1- 0,3 ppm).
Bicarbonato	A concentrações elevadas (>100 ppm) causa aumento do pH na empastagem e concomitante redução da formação do extrato.
Cloreto	A altas concentrações inibe a fermentação (>600 ppm).
Fosfatos	Interage com o cálcio e o magnésio para diminuir o pH durante a empastagem. Nutriente essencial para o crescimento da levedura.
Sulfatos	Precursor da síntese de aminoácidos que contêm enxofre pela levedura, quando o mosto possui baixo teor de aminoácidos.

### 1.4.1.2 Água

A água é quantitativamente a matéria prima mais importante no processo cervejeiro. Além disso, também é necessária em processos de limpeza ou em processos de arrefecimento.<sup>8</sup>

A composição iônica da água utilizada para a preparação do mosto exerce uma importância crucial no sucesso do processo cervejeiro. Os iões presentes contribuem para a nutrição da levedura e possuem impacto no sabor da cerveja. Iões considerados chave devem estar presentes em concentrações suficientes de modo a exercerem efeitos positivos. Na tabela 1 apresentam-se alguns desses efeitos.<sup>11</sup>

### 1.4.1.3 Lúpulo

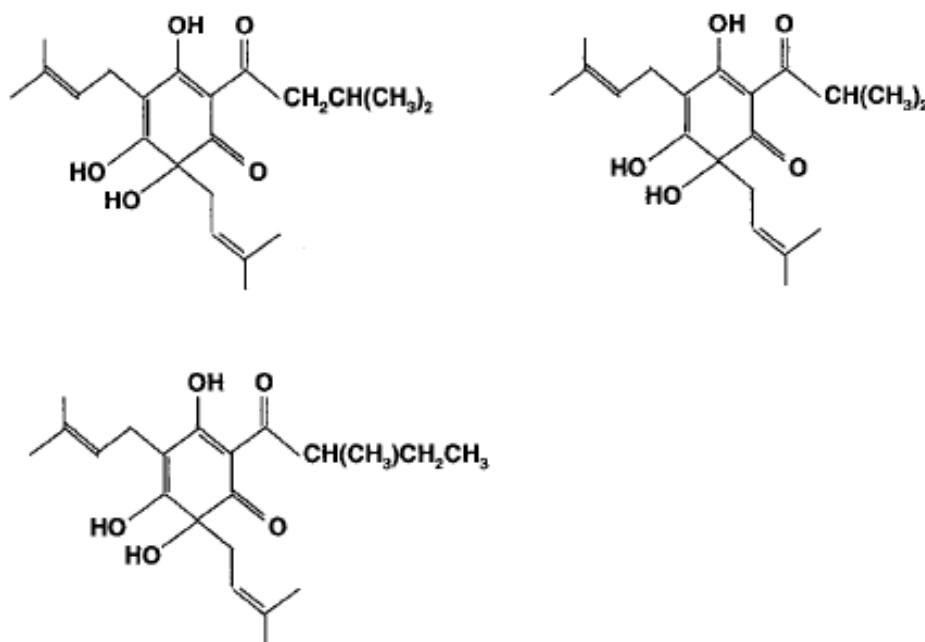
A planta do Lúpulo, *Humulus Lupulus L*, cujas inflorescências da planta fêmea, comumente conhecidas como cones do lúpulo,<sup>13</sup> são utilizadas no processo cervejeiro, contém resinas amargas e óleos essenciais (óleos etéreos) que concedem o amargor e os componentes aromáticos característicos da cerveja.<sup>8</sup> Para a qualidade do produto final, a composição do lúpulo é extremamente importante, sendo constituído em peso seco por proteínas 20,0%, substâncias amargas 18,5%, minerais 8,0%, polifenóis 3,5% e óleo de lúpulo 0,5%, o restante consiste em celulose e outros materiais.<sup>8</sup>



**Figura 3:** Inflorescências da planta fêmea do lúpulo (Fonte: referência14)

As substâncias amargas ou resinas são os componentes de maior valor e mais características do lúpulo, elas dão à cerveja o sabor amargo, melhoram a estabilidade da espuma e possuem atividade antisséptica contra microrganismos indesejados.<sup>8</sup> As resinas são constituídas por compostos designados como  $\alpha$ -ácidos e  $\beta$ -ácidos.<sup>15</sup>

Os  $\alpha$ -ácidos são os constituintes mais importantes das resinas do lúpulo, sendo os mais prevalentes a humulona, a cohumulona e a adhumulona (figura 4).<sup>11</sup> Após a adição do lúpulo, à caldeira do mosto, os  $\alpha$ -ácidos são extraídos e termicamente isomerizados durante a ebulição, em iso- $\alpha$ -ácidos, estes possuem maior solubilidade e maior carácter de amargo.<sup>15</sup>



**Figura 4:** Estruturas químicas dos  $\alpha$ -ácidos: a) humulona, b) cohumulona, c) adhumulona. (Reproduzido da referência 11)

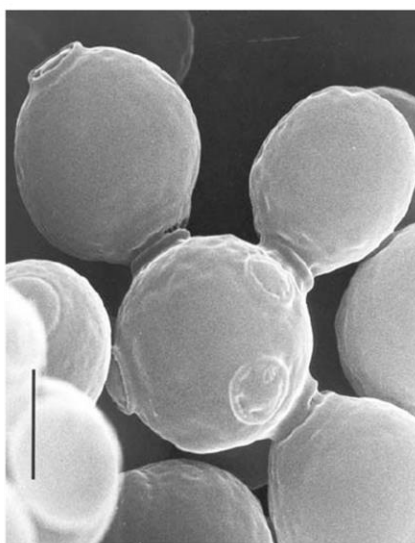
Os óleos essenciais são metabolitos secundários segregados nas glândulas de lupulina localizada no cone do lúpulo. São compostos aromáticos voláteis e são considerados essenciais pois dão ao lúpulo o seu cheiro característico. Enquanto que as resinas concedem à cerveja a sua amargura, os óleos essenciais concedem o aroma e o sabor.<sup>15</sup>

#### 1.4.1.4 Levedura

A cultura de levedura é das matérias primas mais difíceis de manusear na produção de cerveja em termos de monitorização da qualidade. Esta deve principalmente ser livre de bactérias contaminantes e isenta de leveduras selvagens.<sup>16</sup> As principais estirpes de levedura utilizadas no processo cervejeiro são as leveduras *Ale* que incluem a *Saccharomyces cerevisiae* do tipo *Ale*, e as leveduras *Lager* que incluem a *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*), *Saccharomyces cerevisiae* do tipo *Lager* e a *Saccharomyces pastorianus*. A principal diferença

entre as leveduras do tipo *Lager* e *Ale* é a temperatura de fermentação. As leveduras *Lager* fermentam a uma temperatura entre 8-15 °C, enquanto que as leveduras *Ale* fermentam entre 18-22 °C.<sup>17</sup>

A levedura é um microrganismo unicelular que desempenha um papel crucial na produção de cerveja, pois durante a sua atividade ela fermenta os açúcares disponíveis no mosto em etanol e CO<sub>2</sub>.<sup>8</sup> A sua capacidade de fermentar pode ser influenciada por múltiplos fatores que provocam *stress*, como por exemplo, temperatura, etanol, pH e pressão osmótica. Assim, a levedura necessita de apresentar resistência a estes fatores.<sup>16</sup>



**Figura 5:** Levedura por microscopia eletrônica. (Reproduzido da Referência 18)

É indispensável que a estirpe de levedura utilizada desenvolva consistentemente o perfil de sabor desejado na cerveja, tenha capacidade de transformar os açúcares em álcool e ainda que seja facilmente separada no final da fermentação, pela sua capacidade de floculação ou por centrifugação, para a futura reutilização.<sup>16</sup>

A qualidade da cerveja é fortemente influenciada pelo desempenho bioquímico da levedura durante a fermentação.<sup>19</sup>

### 1.4.2 Produção do mosto

A produção do mosto tem como propósito converter os componentes insolúveis provenientes do malte em produtos solúveis, necessários para a fermentação.<sup>20</sup>

A qualidade do mosto é afetada pela qualidade das matérias primas e pelos processos necessários até à sua obtenção: moagem, empastagem, filtração e ebulição. Uma ampla gama de parâmetros deve ser medida para indicar a eficiência do processo de produção do mosto e prever o impacto na fermentação, e em etapas posteriores. Os parâmetros físico-químicos a ter em consideração são: o extrato primitivo (concentração de açúcares do mosto antes da fermentação), pH, coloração, amargor, atenuação limite (indica a quantidade máxima de extrato que a levedura fermentará), nitrogénio aminado livre (FAN) e o dimetilsulfureto (DMS).<sup>21</sup>

### 1.4.2.1 Moagem

A moagem é um processo mecânico, que consiste na fragmentação do malte de forma a facilitar a atividade posterior das enzimas. Antes de se proceder efetivamente ao processo de moagem, o malte, que se encontra armazenado em silos, sofre um pré-tratamento para retirar as impurezas e objetos metálicos que possa conter.<sup>20</sup> A seleção da técnica de moagem dependerá do processo de empastagem e de filtração. A moagem deve ser realizada em condições que preservem a estrutura da casca quando é utilizada a filtração por cuba pois, neste caso, as cascas serão necessárias para a filtração. Por outro lado, quando é utilizado um filtro de placas, a preservação da casca já não é necessária, por isso recorre-se a uma moagem por moinhos de martelos, que permite obter um malte extramente fino.<sup>7</sup>

### 1.4.2.2 Empastagem

A empastagem consiste na mistura do malte com água e é o processo mais importante na produção do mosto.<sup>20</sup> A sua importância reside na solubilização dos componentes do malte por processos enzimáticos, químicos e físicos.<sup>22</sup> Todas as substâncias que passam para a solução constituem o extrato, e o objetivo da empastagem é produzir um extrato o mais rico possível pela ação das enzimas à sua temperatura ótima.<sup>20</sup> A manipulação do perfil de temperatura e a duração dos períodos de empastagem influencia a composição e a eficiência da extração do malte. Além disso, o processo de empastagem afeta também o teor alcoólico da cerveja, a concentração de açúcares não fermentescíveis, o perfil dos péptidos e dos aminoácidos do mosto, a concentração dos nutrientes da levedura, o conteúdo de  $\beta$ -glucanos e ainda algumas propriedades físicas da cerveja como a espuma e a cor.<sup>7</sup>



**Figura 6:** Tanque de empastagem

O tanque de empastagem pode ser considerado como um reator enzimático, onde as enzimas e substratos são extraídos dos grãos do malte. As três principais reações enzimáticas que ocorrem durante a empastagem são a hidrólise do amido gelatinizado em hidratos de carbono fermentescíveis, como a glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, pela ação das amilases, a hidrólise das proteínas em aminoácidos livres, sob a ação das protéases, e a degradação das cadeias de  $\beta$ -glucanos, pela ação das  $\beta$ -glucanases.<sup>23</sup>

Os  $\beta$ -glucanos são o principal constituinte da parede celular do endosperma da cevada e a sua presença em excesso pode reduzir o rendimento do extrato, aumentar a viscosidade do mosto e da cerveja e contribuir para a formação da turvação.<sup>24,25</sup>

O mais importante componente da cerveja é o álcool formado durante a fermentação dos açúcares degradados a partir do amido. Além destes açúcares simples, também são produzidos na empastagem intermediários não fermentescíveis como as dextrinas limite. A degradação do amido ocorre em três etapas sequenciais: gelatinização, liquefação e sacarificação.<sup>20</sup>

A **gelatinização** consiste na incorporação de água nas moléculas de amido, que leva ao aumento do volume. Os grânulos de amido dilatam e conseqüentemente sofrem ruptura formando uma solução viscosa. A **liquefação** compreende a redução da viscosidade do amido gelatinizado devido à ação da  $\alpha$ -amilase que inicia a quebra das longas cadeias de glucose do amido, em cadeias mais pequenas. Por fim a **sacarificação** consiste na completa degradação do amido em açúcares simples e dextrinas pelas amilases.<sup>20</sup>

As amilases,  $\alpha$  e  $\beta$  são importantes na degradação do amido. A  $\alpha$ -amilase quebra a cadeia longa do amido em pequenas dextrinas e possui uma atuação ótima a uma temperatura entre 72 a 75°C, mas é facilmente destruída a 80°C, e a um pH entre 5,6 e 5,8. A  $\beta$ -amilase

separa unidades de maltose a partir das extremidades não redutoras das cadeias do amido, também produz glucose e maltotriose, possui uma atuação ótima a temperaturas entre 60 a 65°C e é rapidamente inativada a 70°C, e a um pH 5,4 a 5,5. A degradação do amido deve ser monitorizada porque resíduos de amido não degradado e dextrinas grandes podem provocar turvação na cerveja.<sup>20</sup>

Após o processo de empastagem é realizado o teste de iodo. A uma pequena amostra da empastagem são adicionadas gotas de tintura de iodo e, através da cor observada, identifica-se o estado da sacarificação. Se a cor for um castanho dourado a sacarificação está completa e pode-se passar para a fase seguinte do processo cervejeiro, em contrapartida se a cor for azul/preto a sacarificação não está completa, e repete-se o último passo da empastagem (sacarificação).<sup>20</sup>

### 1.4.2.3 Filtração

No final do processo de empastagem, o empastado consiste numa mistura aquosa de substâncias dissolvidas e não dissolvidas. A solução aquosa do extrato é chamada de mosto e parte insolúvel é conhecida como *drêche*. A *drêche* consiste essencialmente das cascas e de outras substâncias insolúveis. Apenas o mosto é usado para a produção de cerveja, logo há necessidade de separá-lo das substâncias insolúveis o melhor possível.<sup>20</sup>



**Figura 7:** Exemplo de uma cuba filtro. (Fonte: referência 26)

A **filtração por cuba filtro** é um processo de filtração no qual as cascas do malte desempenham um papel fulcral como material filtrante.<sup>20</sup> Este processo ocorre em duas etapas: a entrada do primeiro mosto (principal empastado) para a remoção das partículas

suspensas e a lavagem das cascas que permite a recuperação de extrato solúvel da matéria sólida.<sup>20,27</sup>

A **filtração por Filtro de Placas** consiste numa série alternada de módulos de câmara de membrana e placas de polipropileno.<sup>20</sup> Um exemplo de um filtro moderno e bem-sucedido é o Meura 2001 da empresa *Meura*, que possui três etapas de operação: enchimento/filtração; pré-compressão/aspersão; compressão. Durante a primeira fase o empastado entra no filtro e é distribuído pelas câmaras, quando o filtro é preenchido e a “cama” começa a se formar nos panos, o mosto começa a ficar claro. Depois de todo o empastado ser transferido, a linha de transferência é lavada e o filtro é pré-comprimido. A pré-compressão possibilita a recuperação da maior parte do extrato. Na fase final, a desidratação é conseguida pela compressão mecânica dos bolos por expansão das membranas elásticas.<sup>7</sup>



**Figura 8:** Filtros de placas Meura 2001 presentes na *Super Bock Group*.

### 1.4.2.4 Ebulição

O mosto obtido da filtração é então levado à ebulição por cerca de 50 a 60 min.<sup>20</sup> A ebulição do mosto é um processo complexo durante o qual ocorre uma ampla gama de processos e reações. A ebulição é uma das etapas que requer maior energia externa no processo cervejeiro.<sup>7</sup>

A importância desta etapa encontra-se relacionada com os inúmeros processos que nela ocorrem: a extração e transformação dos componentes do lúpulo, a formação e precipitação dos complexos proteína-polifenóis, a evaporação da água e consequente concentração do mosto, a esterilização do mosto, a destruição de todas as enzimas e a diminuição do pH do mosto.<sup>20</sup>

O lúpulo é adicionado no início da ebulição. Para se obter um rendimento alto na isomerização dos  $\alpha$ -ácidos (figura 9) é necessário manter uma temperatura elevada durante



um determinado tempo. O rendimento da isomerização depende da natureza da iso-humulona, da duração da ebulição, do pH (um pH mais alto origina um maior rendimento), da concentração da humulona, da precipitação da iso-humulona e do tamanho dos fragmentos do lúpulo.<sup>7</sup>

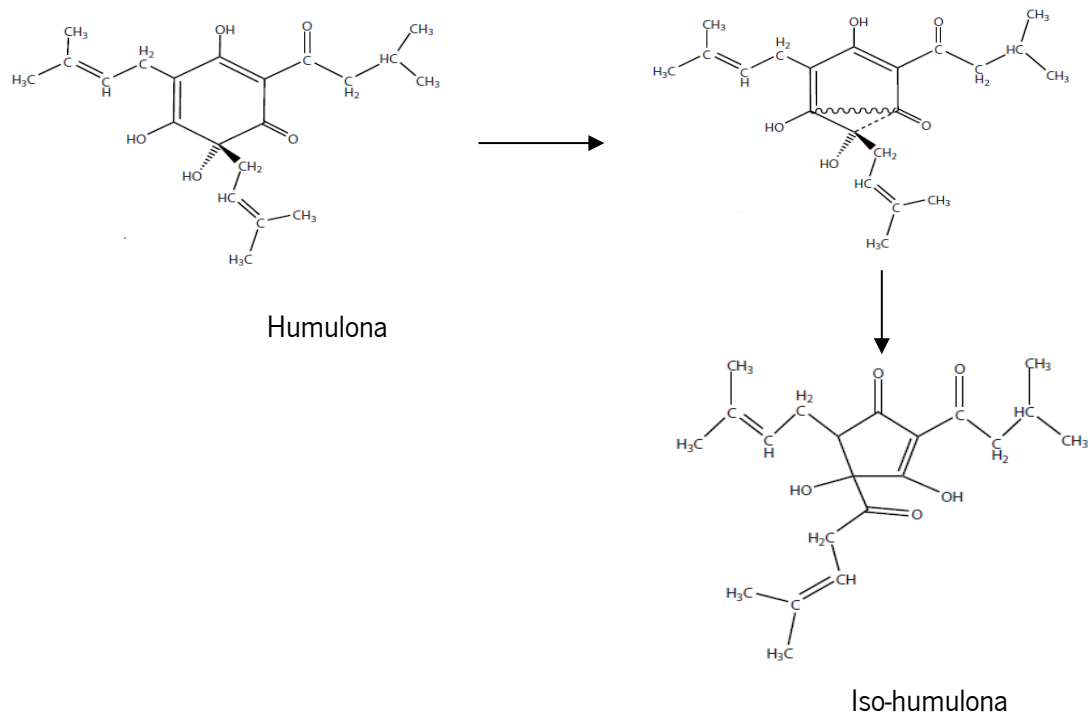


Figura 9: Isomerização do  $\alpha$ -ácido Humulona. (Adaptado da referência 28)

As proteínas são responsáveis pela formação de espuma e turvação na cerveja, mas também pela nutrição da levedura. Como as proteínas têm uma grande afinidade de ligação aos polifenóis, estes devem ser considerados como um complexo. Os polifenóis do lúpulo e do malte dissolvem-se completamente no mosto e ligam-se às proteínas. Como os polifenóis estão presentes parcialmente na forma oxidada e as proteínas possuem diferentes tamanhos moleculares, são formados muitos complexos com propriedades diferentes. Estes complexos são insolúveis no mosto quente e precipitam durante a ebulição.<sup>20</sup>

Atualmente, a quantidade de substâncias proteicas de elevado peso molecular como potencial agente espumante é vista de uma maneira diferente. Há um interesse crescente em não precipitar toda a proteína coagulável, mas retê-la para uma melhor retenção de espuma no produto final.<sup>20</sup>

Durante a preparação do mosto não é necessário tomar medidas específicas para evitar contaminações microbiológicas, além de evitar a contaminação das matérias primas. A ebulição do mosto assegura a sua esterilização, pois todos os microrganismos presentes são mortos. Após a ebulição são necessários cuidados extremos para que a contaminação não ocorra.<sup>29</sup>

O mosto contém uma gama de substâncias aromáticas mais ou menos voláteis que podem ter um efeito negativo no aroma da cerveja, por exemplo o dimetilsulfureto (DMS). A ebulição permite remover essas substâncias aromáticas indesejáveis e assim estabelecer um perfil aromático satisfatório.<sup>20</sup>

### 1.4.2.5 Arrefecimento

No final da ebulição, o mosto encontra-se a elevadas temperaturas, para que o processo continue este tem de ser arrefecido para uma temperatura ótima para a inoculação da levedura. O arrefecimento é alcançado através da utilização de um permutador de calor de placas. O refrigerante principal é a água à temperatura ambiente, que ao arrefecer o mosto quente aumenta a sua temperatura para cerca de 80 °C, e é depois reutilizada no processo cervejeiro, na etapa da empastagem.<sup>30</sup>

### 1.4.2.6 Arejamento do mosto

Um fator que influencia a fermentação e melhora os processos bioquímicos é o arejamento do mosto.<sup>31</sup> O arejamento é a introdução de ar estéril, que contém oxigénio, no mosto. A presença de oxigénio na fase inicial da fermentação é essencial para a rápida reprodução da levedura. A levedura necessita da quantidade adequada de oxigénio para a produção de ácidos gordos insaturados e esteróis, que vão ser depois necessários para a continuação do seu crescimento e divisão celular no meio anaeróbico. Uma quantidade inapropriada de oxigénio pode causar atraso na fermentação e uma produção de grandes quantidades de componentes indesejáveis ao aroma da cerveja como o acetaldeído.<sup>31</sup>

### 1.4.3 Fermentação

Transformar o mosto em cerveja é um dos principais passos no processo cervejeiro. Fermentar significa metabolizar substratos em produtos pela atividade de microrganismos com

consequente ganho de energia. Neste caso a levedura transforma os açúcares em etanol e CO<sub>2</sub>.<sup>32</sup>

A fermentação da cerveja é tradicionalmente dividida em duas partes. A primeira é considerada a fermentação principal, onde os açúcares fermentescíveis do mosto são metabolizados, e uma segunda, maturação, onde são ajustados o perfil organolético, o teor de dióxido de carbono e outras propriedades da cerveja. A duração da fermentação e da maturação varia com o tipo de cerveja.<sup>33</sup>

### 1.4.3.1 Fermentação principal

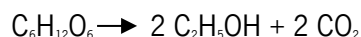
A fermentação inicia-se quando se inocula a levedura no mosto. A levedura pode ser previamente sujeita a uma lavagem ácida, de forma a eliminar possíveis contaminações, visto que, a levedura possui maior tolerância a pH baixo do que as bactérias. A suspensão de levedura é então lavada com ácido, normalmente ácido fosfórico, mas podem ser utilizados ácidos como o nítrico ou o sulfúrico. O pH é ajustado a 2,2-2,5 permanecendo a levedura nestas condições por 1-2 horas.<sup>34</sup>

#### 1.4.3.1.1 Metabolismo dos açúcares e consequente formação de etanol e CO<sub>2</sub>

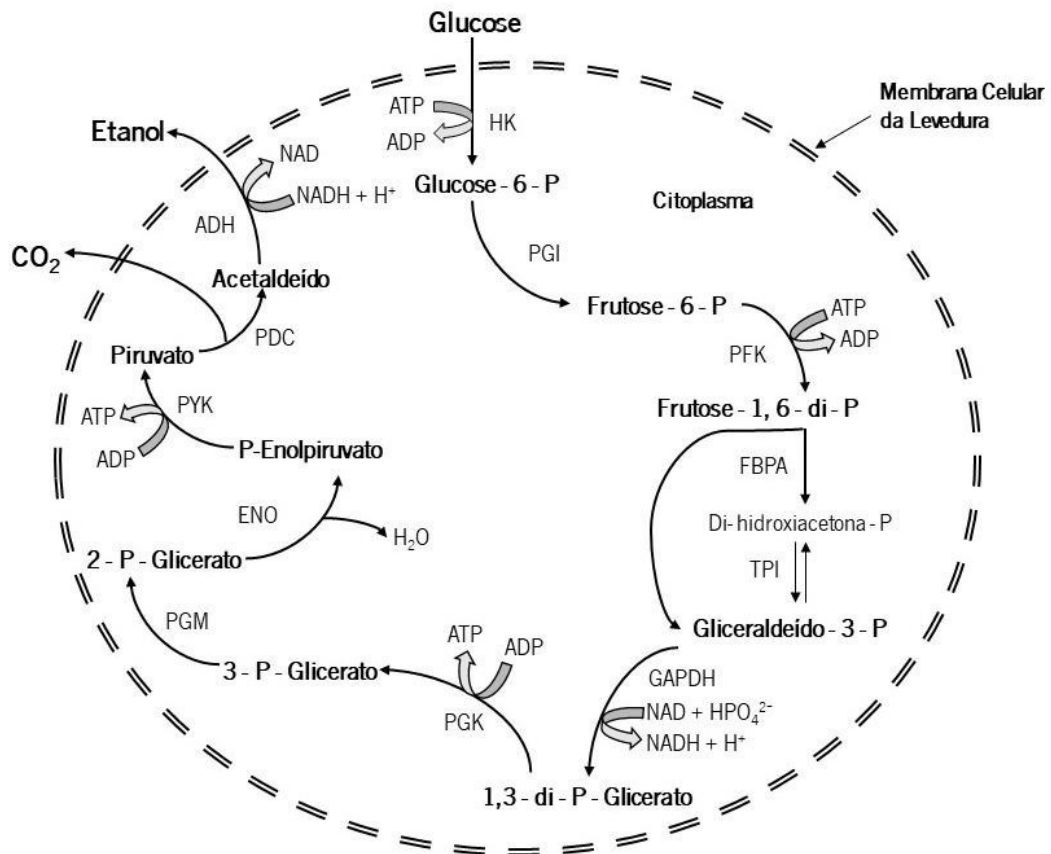
Tal como já foi dito, a principal função da levedura durante a fermentação é a conversão dos açúcares presentes no mosto em álcool, envolvendo vários processos biológicos, como o transporte dos açúcares através da membrana plasmática, o catabolismo dos açúcares, a geração de energia e a produção do etanol.<sup>35</sup>

O mosto é constituído pelos açúcares sacarose (1-2%), glucose (10-15%), frutose (1-2%), maltose (50-60%) e maltotriose (15-20%) juntamente com dextrinas (20-30%). As leveduras cervejeiras, numa situação normal, são capazes de utilizar sacarose, glucose, frutose, maltose e maltotriose aproximadamente por esta sequência.<sup>36</sup>

A fermentação alcoólica pode ser resumida de acordo com a fórmula de Gay-Lussac:<sup>37</sup>



Se os produtos obtidos forem calculados quantitativamente de acordo com a sua massa atômica, a partir de uma mol de moléculas de glucose (180 g), obtêm-se 92 g de etanol e 88 g de dióxido de carbono, o que significa que o açúcar é separado em partes quase iguais de etanol e CO<sub>2</sub>.<sup>37</sup>



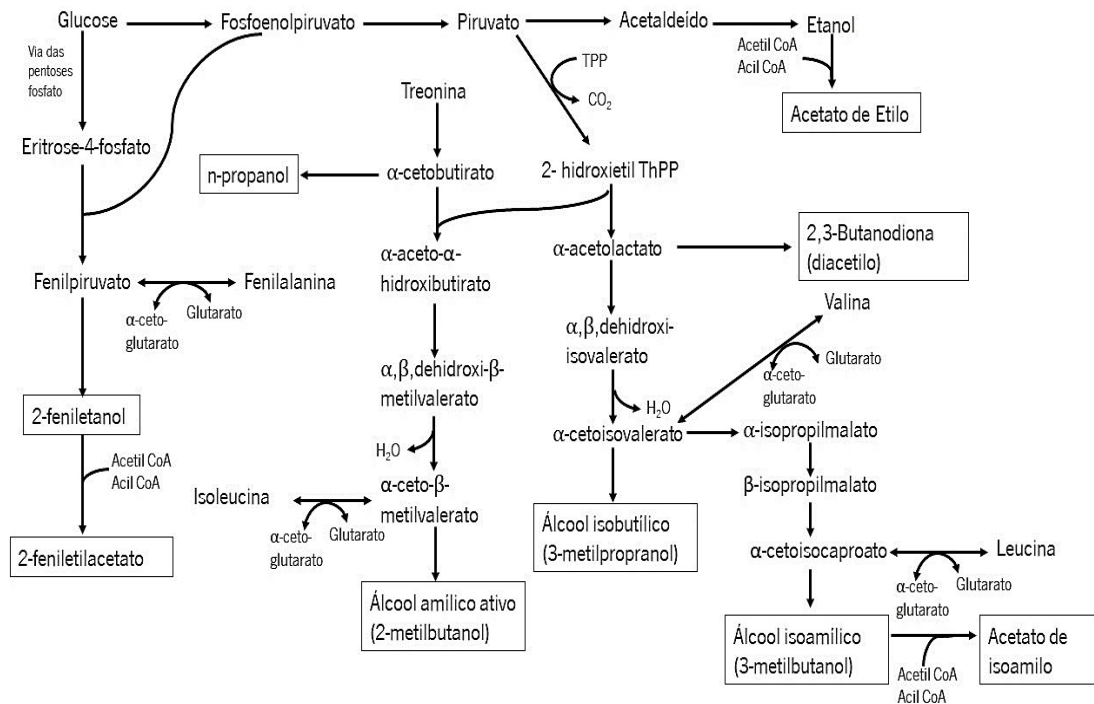
**Figura 10:** Via metabólica da fermentação alcoólica em *Saccharomyces Cerevisiae*. (Adaptado da referência 38). (HK- hexocinase, PGI- fosfoglucoisomerase, PFK- fosfofrutocinase, FBPA- frutose bifosfato aldolase, TPI- triose fosfato isomerase, GAPDH- gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase, PGK- fosfoglicerato cinase, PGM- fosfogliceromutase, ENO- enolase, PYK- piruvato cinase, PDC- piruvato descarboxilase, ADH- álcool dehidrogenase, ADP-Adenosina Difosfato, ATP-Adenosina Trifosfato, NAD- Nicotinamida -adenina dinucleótido, NADH- Nicotinamida -adenina dinucleótido reduzida)

#### 1.4.3.1.2 Metabolismo dos álcoois

Durante a fermentação, são produzidos, como subprodutos, pelas células de levedura álcoois superiores, que constituem a maior percentagem de compostos voláteis. Estes álcoois podem ser classificados em álcoois alifáticos, como o n-propanol, isobutanol, 2-metilbutanol (ou álcool amílico ativo) e 3-metilbutanol (ou álcool isoamílico), e em aromáticos como o 2-feniletanol, tirosol e triptofol. Os álcoois alifáticos contribuem para o aroma alcoólico da cerveja. O 2-feniletanol tem um aroma doce e contribui positivamente para o produto final, enquanto que os álcoois tirosol e triptofol são indesejáveis.<sup>39</sup>

Os álcoois são sintetizados durante a fermentação pela levedura por via catabólica ou anabólica (metabolismo dos aminoácidos). Na via catabólica as células de levedura usam os aminoácidos do mosto para produzir os  $\alpha$ -cetoácidos correspondentes por meio de uma reação

de transaminação. Os  $\alpha$ -cetoácidos são descarboxilados em aldeídos e posteriormente reduzidos pela álcool desidrogenase a álcoois superiores. Na via anabólica os álcoois são sintetizados a partir dos  $\alpha$ -cetoácidos durante a síntese de aminoácidos, a partir de uma fonte de hidratos de carbono.<sup>39</sup>



**Figura 11:** Vias biossintéticas para a formação de compostos voláteis em *Saccharomyces cerevisiae*. (Adaptado da referência 40 e 41) ( TPP- Tiamina pirofosfato, Co A- Coenzima A, ThPP- Tiamina Difosfato)

#### 1.4.3.1.3 Metabolismo dos ésteres

Os ésteres são compostos que possuem grande importância no sabor da cerveja, eles possuem um efeito de aroma frutado/florido nas bebidas alcoólicas fermentadas. Os principais ésteres presentes na cerveja são o acetato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo e acetato de 2-feniletano.<sup>39,42</sup> São compostos desejáveis na cerveja quando se encontram presentes em quantidades adequadas, mas em excesso podem ser desagradáveis.<sup>39</sup>

Os ésteres são formados por uma reação intracelular entre a Acil Coenzima A e um álcool, esta reação é catalisada por uma álcool aciltransferase ou éster sintetase.<sup>39</sup>

#### 1.4.3.1.4 Metabolismo dos compostos sulfurosos

Os principais componentes de enxofre que influenciam o sabor da cerveja são o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), o sulfeto de Hidrogénio (H<sub>2</sub>S), o dimetilsulfureto e os mercaptanos. Contudo, SO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S, são os dois principais compostos originados pelo metabolismo da levedura.<sup>43</sup>

O dióxido de enxofre na cerveja origina-se principalmente do metabolismo dos aminoácidos na levedura. O sulfato é convertido em sulfito que é usado para sintetizar aminoácidos, se mais sulfito for produzido do que o necessário, o excesso é libertado para a cerveja na forma de SO<sub>2</sub>.<sup>44,45</sup>

O dióxido de enxofre possui três papéis na reprodução de cerveja. Reage com compostos carbonílicos para formar  $\alpha$ -hidroxissulfonatos, que não contribuem para o sabor, inibe as reações oxidativas e, em elevadas concentrações, exerce propriedades antimicrobianas.<sup>44,45</sup>

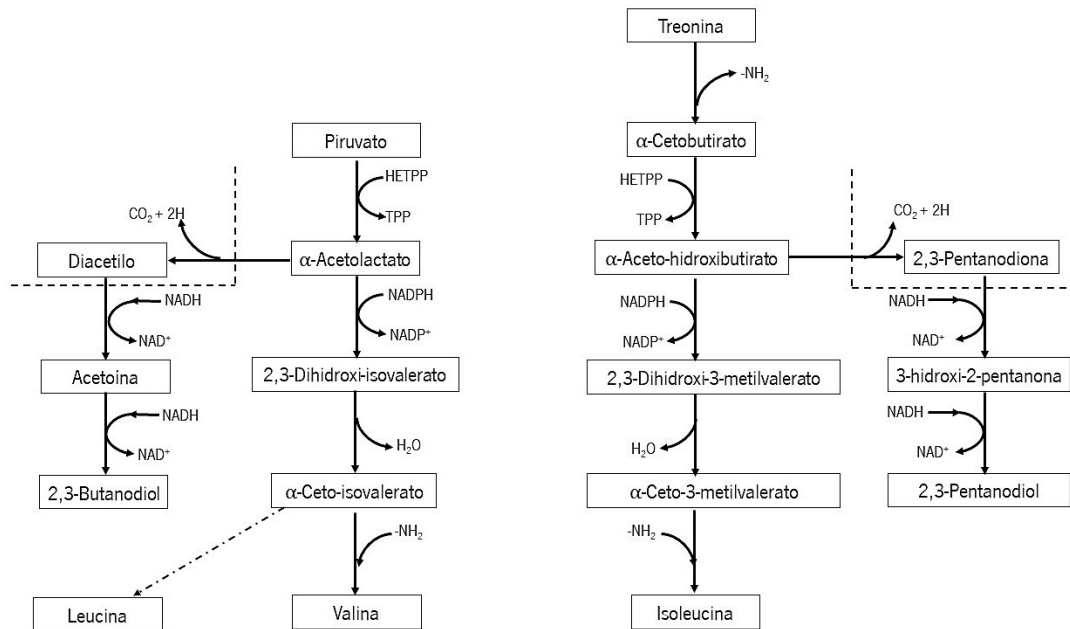
O dimetilsulfureto pode surgir através de dois processos: pela degradação térmica da S-metilmetionina, durante a ebulição do mosto ou pela redução do dimetilsulfóxido pela levedura durante a fermentação.<sup>43,46</sup>

#### 1.4.3.1.5 Formação e remoção das dicetonas vicinais (diacetilo e 2,3-pentanodiona)

O diacetilo (2,3-butanodiona) e a 2,3-pentanodiona são dicetonas vicinais formadas durante a fermentação como subprodutos da síntese dos aminoácidos valina e isoleucina, respetivamente.<sup>47</sup> O diacetilo é conhecido pelo sabor a manteiga e os limites da perceção sensorial encontram-se geralmente entre 0,1-0,2 ppm, para cervejas tipo *Lager* e entre 0,1-0,4 ppm para cervejas do tipo *Ale*.<sup>47,48</sup>

O diacetilo e a 2,3-pentanodiona são formados indiretamente como resultado do anabolismo da valina e da isoleucina, uma vez que resultam de descarboxilação oxidativa espontânea não enzimática de  $\alpha$ -acetohidroxi ácidos, que são intermediários nas vias de biossíntese da valina e da isoleucina. Na biossíntese da valina a reação entre o  $\alpha$ -acetolactato e o 2,3-dihidro-isovalerato é limitante e o  $\alpha$ -acetolactato é secretado através da membrana celular para o mosto durante o crescimento da levedura. As razões e os mecanismos para a secreção do  $\alpha$ -acetolactato não são totalmente compreendidas, mas podem envolver a proteção da levedura do *stress* carbonílico. O  $\alpha$ -acetolactato presente no mosto sofre uma descarboxilação oxidativa espontânea formando o diacetilo, com libertação de dióxido de carbono.<sup>47</sup>

A levedura é capaz de assimilar e reduzir as dicetonas vicinais formando dióis que possuem um limite de sabor mais elevado não afetando o sabor e o aroma da cerveja. O diacetilo é então reduzido a 2,3-butanodiol via acetoína (3-hidroxi-butanona).<sup>47,49</sup>



**Figura 12:** Vias de formação e redução do diacetilo e 2,3-pentanodiona, bem como de síntese da valina e isoleucina na levedura *Saccharomyces spp.* (Adaptado da referência 47) (HETPP- 2- $\alpha$ -Hidroxi-etil tiamina pirofosfato, TPP- Tiamina pirofosfato NAD<sup>-</sup>- Nicotinamida -adenina dinucleótido, NADH- Nicotinamida -adenina dinucleótido reduzida, NADP<sup>-</sup>- Nicotinamida -adenina dinucleótido fosfato, NADPH- Nicotinamida -adenina dinucleótido fosfato reduzida)

A quantidade de diacetilo formado e reduzido é afetada pelo pH do mosto e pela temperatura de fermentação. Estes fatores influenciam o crescimento da levedura e consequentemente a quantidade de aminoácidos de cadeia ramificada biossintetizados. Possuem também influência na taxa da reação de descarboxilação espontânea do  $\alpha$ -acetolactato em diacetilo e nas atividades das enzimas responsáveis pela redução do diacetilo a acetoína e 2,3-butanodiol.<sup>47,50</sup>

Taxas de produção de diacetilo maiores são obtidas com temperaturas de fermentação mais elevadas, como consequência do aumento do crescimento das leveduras, contudo também produzem mais levedura para reduzir o diacetilo a 2,3-butanodiol. O aumento da temperatura leva ainda ao aumento da taxa da reação de descarboxilação oxidativa do  $\alpha$ -acetolactato a diacetilo, o que sugere que a conversão limitante do  $\alpha$ -acetolactato a diacetilo é acelerada a temperaturas mais elevadas, conduzindo a picos de concentração de diacetilo

mais pronunciados durante a fermentação e a uma taxa de redução de diacetilo mais rápida.<sup>47,48,50,51</sup>

A valores de pH mais baixos, diversas fontes, relatam um aumento da taxa de reação de descarboxilação oxidativa do  $\alpha$ -acetolactato a diacetilo, sugerindo que a conversão do  $\alpha$ -acetolactato a diacetilo é mais rápida em condições mais ácidas do mosto. Podendo assim, conseguir-se uma diminuição do tempo de maturação necessário para a redução do diacetilo usando valores de pH mais baixos.<sup>47,50,52,53</sup>

Uma outra abordagem de modo a minimizar a formação de diacetilo é a conversão de  $\alpha$ -acetolactato diretamente em acetoina, que possuem maiores limites de sabor. A enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (ALDC), que catalisa a descarboxilação não oxidativa do  $\alpha$ -acetolactato em acetoina, é expressa por uma variedade de bactérias. Várias tentativas foram realizadas para reduzir as concentrações do diacetilo na cerveja, adicionando a enzima na fermentação. Estudos concretizados mostraram que as concentrações de diacetilo durante a fermentação são reduzidas na presença da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase e o período de maturação é significativamente menor.<sup>33,47,54,55</sup>

### 1.4.3.2 Maturação

A maturação da cerveja é um passo importante, pois nesta etapa, são aperfeiçoados parâmetros como o sabor (diacetilo,  $\text{SO}_2$  e DMS), a sedimentação da levedura, a carbonatação e a estabilidade coloidal. Assim a maturação pode ser dividida em duas partes, uma primeira a quente para reduzir os agentes aromatizantes como o diacetilo, sendo esta remoção o passo limitante da maturação da cerveja. Segue-se o processo de maturação a frio ( $-2\text{ }^\circ\text{C}$ ) que visa melhorar a estabilidade coloidal da cerveja, de modo a que não se desenvolva turvação ao longo do tempo. A esta temperatura os complexos proteína-taninos insolúveis precipitam e são depois removidos por processos de filtração.<sup>43</sup>

### 1.4.3.3 Utilização de cubas cilindro-cónicas

As cubas cilindro-cónicas, atualmente, são os fermentadores de eleição na indústria cervejeira de grande escala.<sup>56</sup>

As cubas cilindro-cónicas são normalmente enchidas apenas com 80-85% da sua capacidade total, de modo a deixar espaço suficiente para a espuma formada durante a



fermentação. Isto representa uma redução na produtividade de cada cuba cilindro-cônica. Além da redução da capacidade de produção, a formação da espuma também leva à perda dos componentes do amargor e, portanto, a uma redução na eficiência da utilização do lúpulo.<sup>56</sup>

O excesso de formação de espuma durante a fermentação pode ser evitado utilizando antiespumantes. A inibição da espuma permite a maximização da capacidade da cuba cilindro-cônica e do uso do lúpulo. Assim uma variedade de antiespumantes, de origem natural ou sintética, podem ser utilizados durante o processo e são projetados para serem removidos por filtração da cerveja ou por aderência às superfícies dos tanques antes de se obter o produto final.<sup>57</sup>

### 1.4.4 Filtração

A filtração final é um passo muito importante durante a produção de cerveja. Dependendo do tipo de cerveja, a turvação pode ser um fator considerado negativo pelo consumidor. As partículas responsáveis pela turvação podem ser divididas em três grupos. Partículas de tamanho superior a 1  $\mu\text{m}$ , por exemplo, leveduras, proteínas coaguladas e microrganismos, que geram uma turvação visível macroscópica. Partículas coloidais inferiores a 1  $\mu\text{m}$ , que consistem em proteínas, complexos taninos-proteínas, taninos,  $\beta$ -glucanos ou resinas de lúpulo, estas são visíveis apenas através de luz refratada. E por fim, partículas de tamanho inferior a 0,001  $\mu\text{m}$ , encontram-se em solução e não são visíveis.<sup>58</sup>

No processo de filtração é bastante utilizado o kieselguhr (terras diatomáceas). É uma substância em pó que é depositada no filtro e atua como um auxiliar adsorvendo as partículas em suspensão.<sup>37</sup>

O objetivo final da filtração é garantir uma cerveja tão estável, que nenhuma alteração visível ocorra ao longo do tempo.<sup>37</sup>

## 1.5 Objetivos do trabalho desenvolvido

Os objetivos do trabalho desenvolvido na empresa *Super Bock Group*, num período de 9 meses foram tomar conhecimento das diversas análises ali realizadas e acompanhar ensaios com o intuito de aumentar a capacidade de produção na empresa. Os ensaios levados a cabo foram:

- Ensaio de pH e ensaio da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase, com o objetivo de diminuir o tempo de maturação.
- Ensaio de otimização da receita de uma cerveja, com o objetivo de disponibilizar cubas na adega.
- Ensaio de utilização de antiespumante, com o objetivo de aumentar o volume de mosto utilizado por cuba.

# 2 Métodos





## 2.1 Análises de controlo de qualidade

### 2.1.1 Determinação das características físico-químicas

A determinação das características físico-químicas densidade, álcool, extrato primitivo, extrato aparente, extrato real, atenuação real limite, atenuação real, cor e pH foram levadas a cabo no aparelho *Alkolyzer Plus Beer Analysis System* da *Anton Paar*. Este aparelho integra um densitómetro (tubo em U oscilante), um analisador de álcool (espectroscopia de infravermelho próximo), um colorímetro (espectroscopia de ultravioleta-visível - comprimento de onda de 430 nm) e um elétrodo de pH.

Para uma determinação correta e eficaz as amostras necessitaram de tratamento prévio. Foi necessário proceder à filtração das amostras com um filtro de papel ou filtro de papel com kieselguhr. Além disso, amostras que se encontram carbonatas, necessitaram de ser previamente descarbonatadas, pois a presença de gás influencia a leitura.

A atenuação real limite foi determinada após uma simulação de fermentação de uma amostra de mosto com levedura, que permanece em agitação durante 24 horas.



**Figura 13:** *Alkolyzer Plus Beer Analysis System* da *Anton Paar* presente no laboratório central.

### 2.1.2 Determinação do amargor

A determinação do amargor foi realizada segundo o método *European Brewery Convention* (EBC). A 10 mL de uma amostra, previamente filtrada e descarbonatada (se apresentar gás), foram adicionados 1 mL de ácido clorídrico (3 N) e 20 mL de iso-octano. Posteriormente foi colocada sobre agitação durante 15 min. As substâncias amargas foram assim extraídas e a sua concentração lida espectrofotometricamente ao comprimento de onda de 275 nm. O valor de amargor da amostra foi obtido segundo a seguinte equação:<sup>59</sup>

$$\text{UA (Unidades de Amargor)} = \text{absorvância} \times 50$$

Durante a preparação das amostras foi necessário ter cuidado para que estas não formem espuma, pois as substâncias amargas são perdidas através da espuma, originando assim um resultado incorreto e inferior ao real.

### 2.1.3 Determinação da estabilidade de espuma

A estabilidade de espuma foi determinada segundo o método *NIBEM* em que se mede o tempo de colapso da superfície de espuma numa distância de 10, 20 ou 30 mm, utilizando um sistema de elétrodos móveis com agulhas longas. O resultado obtido expressa-se em segundos.



**Figura 14:** Equipamento utilizado na determinação da estabilidade de espuma pelo método *NIBEM*.

### 2.1.4 Determinação da concentração de diacetilo

A determinação da concentração de diacetilo foi conseguida através da utilização de cromatografia gasosa. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo *Varian Modelo 3400*, com um detetor de captura eletrónica, uma temperatura de 155 °C e o <sup>63</sup>Ni como fonte de eletrões (raios beta). Relativamente à coluna, esta foi uma coluna capilar de sílica fundida com 50 m de

comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno, 0,52  $\mu$  de fase estacionária, de silicone com metilfenilo (5%), com uma temperatura de 60 °C. O gás de transporte usado foi o nitrogénio a 1,1 mL/min. Utilizou-se ainda um amostrador automático da *Varian-Genesis* com uma temperatura de amostra de 60 °C.

As amostras de fermentação e maturação foram previamente filtradas, de forma a retirar a levedura que se encontrava em suspensão. As amostras de produto acabado foram descarbonatas para retirar o gás presente.



**Figura 15:** Equipamento utilizado na determinação da concentração de diacetil por Cromatografia Gasosa.

### 2.1.5 Determinação da concentração de CO<sub>2</sub>

A concentração de CO<sub>2</sub> foi determinada utilizando o equipamento *Carbo QC*, cujo funcionamento se baseia no método de múltipla expansão do volume. O dispositivo de enchimento transfere a amostra para uma câmara de medição sem perda de CO<sub>2</sub>. De seguida o volume da câmara de medição é expandido e aguarda-se até que se estabeleça um equilíbrio de pressão e temperatura, cujos valores são registados. Após nova expansão determina-se a concentração de CO<sub>2</sub> usando as duas pressões e temperaturas registadas.<sup>60</sup>

Nesta determinação não há influência de outros gases dissolvidos. A concentração de CO<sub>2</sub> é dada em g/L.



Figura 16: *Carbo QC*, equipamento utilizado para medição da concentração de CO<sub>2</sub>.

### 2.1.6 Determinação da concentração de álcoois, ésteres, acetaldeído e DMS

A determinação da concentração de álcoois, ésteres, acetaldeído e DMS na cerveja foi levada a cabo por cromatografia gasosa, utilizando um detetor de ionização de chama. O gás de transporte pode ser o hidrogénio ou o nitrogénio. As soluções de calibração preparadas contêm álcoois isoamílicos, isobutanol, propanol, acetaldeído, DMS, acetato isoamilo e acetato de etilo. A gama de concentrações das soluções preparadas estava de acordo com a capacidade de deteção do aparelho.<sup>61</sup>

As concentrações dos componentes da amostra foram determinadas recorrendo ao padrão interno, de acordo com a seguinte fórmula:<sup>61</sup>

$$\text{Concentração} = \frac{\text{Razão de área do componente} \times \text{Concentração do Padrão Interno}}{\text{Fator de Calibração}}$$

### 2.1.7 Determinação da concentração de polifenóis totais

A concentração dos polifenóis totais presentes na amostra de produto acabado foi determinada através da espectroscopia ultravioleta-visível ao comprimento de onda de 600 nm de acordo com o método EBC.<sup>62,63</sup>

A amostra de cerveja em estudo foi tratada sucessivamente com os seguintes reagentes: solução de carboximetilcelulose - EDTA, solução férrica e solução de amónia. Nestas condições os polifenóis reagem com os iões férricos, formando uma solução avermelhada. A amostra foi previamente degaseificada.<sup>62,63</sup>

Os polifenóis totais são calculados de acordo com a fórmula:<sup>62,63</sup>

$$\text{Polifenóis totais (mg/L)} = \text{Abs} \times 820$$



### 2.1.8 Determinação da concentração do nitrogénio aminado livre

A determinação da concentração do nitrogénio aminado livre (FAN) foi levada a cabo de acordo com o método EBC com ninidrina.<sup>64</sup>

A ninidrina é um agente oxidante e causa a descarboxilação de aminoácidos produzindo um aldeído. O derivado aminado da ninidrina reage então com a ninidrina não reduzida formando um complexo azul que pode ser quantificado espectrofotometricamente.<sup>64</sup>

A amostra a analisar foi diluída, (100 vezes para uma amostra de mosto e 50 vezes para uma amostra de cerveja). A 2 mL da amostra diluída foi adicionado 1 mL de solução de ninidrina 6 g/L e frutose 3 g/L em tampão fosfato pH 6,7, de seguida foi aquecida durante 16 min num banho de água em ebulição. Posteriormente foi arrefecida durante 20 min num banho de água a 20 °C, e depois foi adicionado 5 mL de solução de KIO<sub>3</sub> em etanol:água (3:2).<sup>64</sup>

A cor produzida foi medida por espectroscopia ultravioleta-visível a um comprimento de onda de 570 nm. Também é determinada a absorvância de solução padrão que contém 2 mg/L, em triplicado.<sup>64</sup>

A concentração do nitrogénio aminado livre é dada pela seguinte equação:<sup>64</sup>

$$\text{FAN (mg/L)} = \frac{\text{Abs da solução teste}}{\text{média Abs da solução padrão}} \times 2 \times \text{diluição}$$

### 2.1.9 Determinação da Turvação a 20 °C e 0 °C

A determinação da turvação foi realizada no *LabScat* da *Sigris*, que se baseia no método da luz dispersa a ângulos de 90° e 25°. A luz é emitida por um LED de comprimento de onda de 650 nm. O aparelho possui uma câmara que deve ser enchida com água ultrapura.

Para determinar a turvação a 20 °C a amostra foi sujeita a um banho de água à temperatura de 20 °C e a câmara do aparelho foi enchida com água ultrapura também a 20 °C. A amostra foi transvasada para a cuvete e colocada no centro da câmara de medição. Durante a medição a cuvete rodou no banho de água. O valor registado foi obtido a 90°.

Para a determinação da turvação a 0 °C, o princípio foi o mesmo, com a exceção da temperatura do banho, que foi 0 °C durante 24 horas, e da câmara de medição que foi 0 °C.



**Figura 17:** Aparelho *LabScat* da *Sigrist* utilizado para medição das turvações e da estabilidade coloidal.

#### 2.1.10 Determinação da estabilidade coloidal

A estabilidade coloidal foi determinada através da medição da turvação da amostra após vários tratamentos. A amostra foi sujeita a uma temperatura de 60 °C durante 5 dias e posteriormente sujeita a uma temperatura de 0 °C durante 24 horas. Após 24 h a amostra foi transvasada para a cuvete e colocada no centro da câmara de medição que continha água ultrapura a 0 °C. O valor registado foi obtido a 90°.

#### 2.1.11 Determinação da concentração de SO<sub>2</sub> total

A determinação do SO<sub>2</sub> total baseia-se no sistema de análise em fluxo segmentado através do equipamento *Skalar San+*. O processo consiste na acidificação da amostra com ácido sulfúrico e posterior aquecimento a uma temperatura de 90 °C para libertar o SO<sub>2</sub> na forma complexada (grupos carbonilo de cetonas e aldeídos). O SO<sub>2</sub> gasoso formado é então separado por uma membrana de diálise e recolhido numa solução de formaldeído, formando-se o aduto ácido hidroximetanosulfónico. Convertido, posteriormente, por reação com o reagente *p*-rosanilina, num complexo corado que apresenta um máximo de absorção a 560 nm e cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de SO<sub>2</sub> total na amostra.<sup>65</sup>

As amostras de produto final foram descarbonatadas o mais rápido possível através de agitação e as amostras de maturação foram centrifugadas antes de colocar no amostrador do equipamento.<sup>65</sup>

A concentração de SO<sub>2</sub> total foi calculada a partir da fórmula:<sup>65</sup>

$$\text{SO}_2 \text{ total (mg/L)} = F \times A$$

Onde: **F** é o declive da reta de calibração, e **A** é a absorvância da amostra.

### 2.1.12 Determinação da contagem de células da levedura

A contagem de células de levedura foi efetuada através de um contador de células eletrónico Z2 da *Beckman Coulter*, após diluição da amostra com uma solução salina adquirida comercialmente - Isoton.

O contador eletrónico determina a contagem de células de acordo com o Princípio de Coulter. Este método baseia-se na deteção e medição de alterações na resistência elétrica produzida por uma partícula ou célula, que se encontra suspensa num líquido condutor, quando atravessa uma pequena abertura entre dois elétrodos.<sup>66</sup>



**Figura 18:** Contador de células eletrónico Z2 da *Beckman Coulter* utilizado para a contagem de células de levedura. (Fonte: referência 67)

### 2.1.13 Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada recorrendo a um painel de provadores (homens e mulheres), funcionários da empresa, previamente formados para reconhecer e detetar componentes indesejáveis no aroma ou gosto, às mais variadas concentrações que são por vezes impercetíveis ao consumidor comum. Além disso, possuem a sensibilidade de analisar de maneira satisfatória a combinação do sabor, aroma e aparência, visando estabelecer se o produto está ou não de qualidade satisfatória.

## 2.2 Ensaio para o aumento da capacidade de produção

Ensaio para o aumento da capacidade de produção foram realizados, tendo como principais critérios de sucesso, não se verificar impacto significativo na performance da fermentação, na viabilidade da levedura e na qualidade do produto ao longo de todo o processo (mosto, cerveja em maturação, cerveja filtrada e produto final).

### 2.2.1 Procedimentos gerais nos ensaios industriais

Foram utilizadas duas cubas cilindro cónicas, uma controlo e outra ensaio. De forma a poder comparar os possíveis impactos.

As condições de fermentação foram as mesmas para as duas cubas: a mesma levedura e a utilização de cubas com 3 camisas para regulação de temperatura.

O acompanhamento dos ensaios foi efetuado todos os dias com a medição do extrato aparente ( $^{\circ}\text{P}$ ), da contagem de células de levedura ( $\times 10^6$  células/mL) e da determinação da concentração de diacetilo (mg/L) até se verificar a paragem da fermentação. Considera-se que a fermentação termina quando a variação do extrato aparente entre medições é de  $0,1^{\circ}\text{P}$  ou inferior.

A contagem de células de levedura foi levada a cabo de 12 em 12 horas. Sempre que se inicia uma fermentação é procedida à determinação da contagem de células de levedura duas horas após o enchimento da cuba cilindro cónica, logo o primeiro resultado obtido diz respeito a estas 2 horas.

Dependendo do tipo de ensaio foram realizadas análises ao longo de todo o processo, inclusive ao produto final quando necessário.

### 2.2.2 Ensaio de pH

O aumento da capacidade na adega pode ser conseguido reduzindo o tempo de ocupação das cubas, através da diminuição do tempo necessário para a redução da concentração de diacetilo. Um ensaio realizado nesse sentido foi diminuir o pH do mosto no fim da ebulição. Vários estudos na literatura referem que um pH de mosto mais baixo no início de fermentação leva a uma redução de diacetilo mais rápida.<sup>47,50,52,53</sup>

O pressuposto do ensaio é utilizar duas cubas cilindro-cónicas com a capacidade de 3000 hL, contendo mosto com diferentes resultados de pH. Considerando a capacidade da cuba cilindro-cónica são necessários 3 fabricos (ciclos industriais de produção do mosto). Assim, foram realizados 3 fabricos com pH 4,90 para uma cuba e 3 fabricos com pH 5,20 para outra cuba.

O acerto do pH foi feito por adição de ácido fosfórico durante o passo de ebulição do fabrico do mosto. Procedeu-se à amostragem e determinação do pH antes e depois da ebulição de forma a poder ajustar a quantidade de ácido fosfórico a adicionar para obter os valores de pH desejados.

### 2.2.3 Ensaio de otimização da receita de uma cerveja

O processo de produção da cerveja, aqui designada por Cerveja A, é atualmente realizado recorrendo a uma base de cerveja produzida em menor quantidade no *Super Bock Group*, designada Base X. Utiliza ainda como açúcar o Açúcar 1 e um concentrado do Fornecedor 1.

O ensaio da otimização da receita da Cerveja A encontra-se interligado com o aumento da capacidade, na medida em que caso seja validada a utilização de outra base de cerveja disponibilizar-se-ão cubas cilindro cónicas na adega, o que permite uma maior capacidade de produção, e além disso, não há necessidade de se fabricar Base X de propósito para produzir Cerveja A.

Este ensaio teve duas fases, a primeira com Cerveja A em laboratório e uma segunda fase industrial.

#### 2.2.3.1 Produção da Cerveja A em laboratório

O objetivo na primeira fase era testar em laboratório várias alterações:

- Alteração da cerveja base:

Atual - Base X

Testadas - Base Y e Base Z

A alteração para a base de cerveja Base Y e Base Z prende-se pelo facto destas se encontrarem geralmente disponíveis na adega em maior quantidade.

- Alteração do açúcar:

Atual- Açúcar 1

Testado- Açúcar 2

A possibilidade de alteração do Açúcar 1, geralmente utilizado, para Açúcar 2 prende-se com dois fatores: poder usar uma solução de Açúcar 2 produzida como subproduto de outro processo da fábrica e diminuir o tempo do processo, uma vez que o processo de adição manual de Açúcar 1, adquirido em contentores, é demorado.

- Alteração do concentrado:

Atual- Fornecedor 1

Testado- Fornecedor 2

A nível laboratorial foram testados produtos com diferentes combinações.

**Tabela 2:** Diferentes combinações dos ensaios de otimização da receita de Cerveja A realizados em laboratório.

Ensaio	Base Y	Base Z
1	Açúcar 1 + Fornecedor 1	Açúcar 1 + Fornecedor 1
2	Açúcar 2 + Fornecedor 1	Açúcar 2 + Fornecedor 1
3	Açúcar 1 + Fornecedor 2	Açúcar 1 + Fornecedor 2
4	Açúcar 2 + Fornecedor 2	Açúcar 2 + Fornecedor 2

Os produtos obtidos nos ensaios realizados foram analisados fazendo a determinação das características físico-químicas e do amargor. Para além disso, foi também realizada uma análise sensorial com prova dos produtos obtidos.

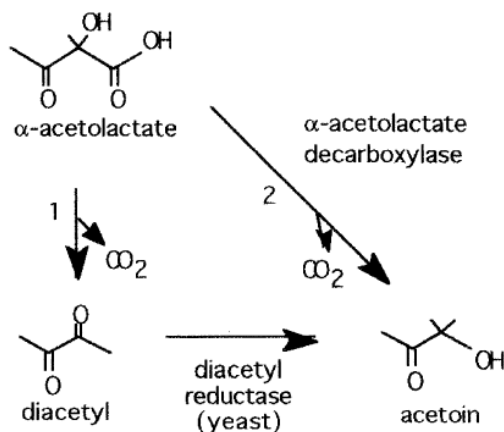
#### 2.2.3.2 Produção da Cerveja A industrialmente

Após os ensaios laboratoriais decidiu-se avançar para um ensaio de produção industrial com Base W, esta decisão deve-se ao facto de as características físico-químicas da Base W serem muito semelhantes às da Base Y (que deu resultados satisfatórios nos ensaios laboratoriais).

O ensaio industrial consistiu em ter dois TCFs (Tanques de Cerveja Filtrada), um controlo com a Cerveja A realizado com Base X e outro ensaio com a Base W. Neste ensaio a diferença que ocorreu foi apenas na base de cerveja, as restantes matérias primas e respetivas quantidades mantiveram-se.

#### 2.2.4 Ensaios com a enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase

O ensaio consistiu na utilização de uma solução de enzima, a  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase, com o fim de acelerar a redução da concentração de diacetilo (figura 19). Foram realizados vários ensaios, que abrangeram a utilização da solução de enzima em vários tipos de cerveja e em diferentes quantidades à escala industrial.



**Figura 19:** Reação catalisada pela  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase. 1- Descarboxilação oxidativa, 2- Descarboxilação enzimática não oxidativa. (Reproduzido da referência 68).

As recomendações de utilização da solução de enzima pelo fornecedor descrevem a importância de a  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase estar presente no mosto ao mesmo tempo que a levedura, a fim de maximizar a prevenção de formação de diacetilo. A solução de enzima foi adicionada à linha de arrefecimento do mosto através de uma pequena bomba, antes de se proceder à inoculação da levedura no mosto.



**Figura 20:** Imagem fotográfica da colocação da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na linha de arrefecimento do mosto.

#### 2.2.4.1 Teste da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B

O primeiro ensaio com a enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase foi levado a cabo na Cerveja B. Neste optou-se por utilizar a quantidade máxima recomendada pelo fornecedor, de forma a analisar o impacto da enzima na atividade da levedura. Como a cuba cilindro cónica a

encher tem uma capacidade de 3000 hL corresponde a peso de 6 kg de solução de enzima a adicionar.

A escolha da cerveja para o ensaio prende-se pelo motivo desta ser uma cerveja com volume de produção considerável, permitindo assim uma análise absolutamente criteriosa do impacto da utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase no processo de fermentação, maturação e ainda no produto final.

### 2.2.4.2 Teste da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C

O segundo ensaio foi efetuado na Cerveja C, a escolha desta cerveja deve-se a esta apresentar características diferentes da Cerveja B, inclusive um maior tempo de redução de diacetilo.

Novamente, optou-se por utilizar a dosagem máxima recomendada, ou seja, foi adicionada uma quantidade de 6 kg de solução da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase.

Apesar de ser da mesma estirpe, a cultura de levedura utilizada não foi a mesma, por impossibilidades alheias ao ensaio.

### 2.2.4.3 Teste da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja D

Um terceiro ensaio foi realizado noutro tipo de cerveja, Cerveja D. Esta apresenta características diferentes das cervejas enunciadas anteriormente, até no tempo necessário para reduzir a concentração de diacetilo. A Cerveja D necessita de um maior tempo de maturação até alcançar a concentração de diacetilo desejável.

Neste optou-se por utilizar apenas a dosagem mínima recomendada, assim foi adicionada a quantidade de 3 kg da solução da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase. Um quarto ensaio decorreu na Cerveja D e a quantidade adicionada foi de 3,5 kg da solução da enzima.

Os ensaios com a Cerveja D decorreram apenas com a cuba cilindro cónica ensaio com 4 fabricos, ou seja, não foram preparadas as cubas controlo, pois como são ensaios industriais e com grandes volumes vão depender sempre da quantidade de cerveja que se pretende produzir e neste caso uma cuba era o pretendido.



### 2.2.5 Ensaio com a utilização de um antiespumante

O ensaio consistiu na utilização de uma solução de antiespumante na Cerveja B com o objetivo de diminuir a quantidade de espuma formada durante a fermentação e assim aumentar o volume de mosto a encher na cuba cilindro cónica.

O antiespumante é uma emulsão a 20% de dimetilpolissiloxano em água. O dimetilpolissiloxano é um polímero inerte eficaz na supressão de espuma. O colapso das bolhas ocorre devido à redução da tensão superficial do líquido.

De acordo com o fornecedor, a quantidade ideal de antiespumante a utilizar, depende do tipo de cerveja, da dimensão da cuba e do ponto de aplicação, mas encontra-se normalmente compreendida entre 2 a 10 mL, por hectolitro.

O antiespumante é imiscível e para permitir a sua dispersão ao longo da cuba, ele é adicionado na linha de arrefecimento do mosto antes de este entrar para a cuba cilindro cónica.

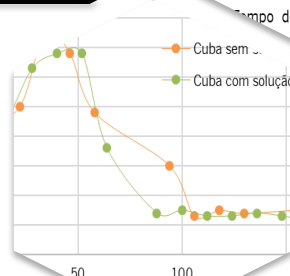
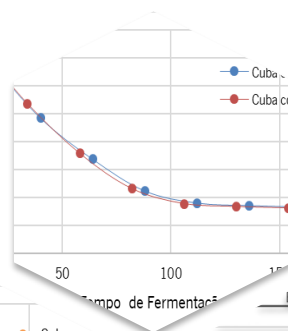
Um aspeto importante a ter em consideração é que a presença do antiespumante no produto final é indesejável. A levedura remove grande parte do antiespumante por absorção na parede celular, e o restante é removido durante a filtração. Contudo pode causar problemas na limpeza das cubas devido à aderência às paredes.

Vários ensaios foram realizados para perceber o impacto da utilização do antiespumante na quantidade de espuma formada durante a fermentação, e assim permitir aumentar o volume de mosto a adicionar a cada cuba. O acompanhamento destes ensaios consistiu sobretudo na determinação da estabilidade de espuma do produto final.



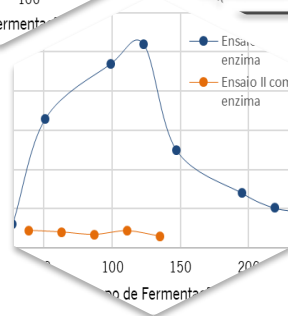
# 3 Resultados e Discussão

Ensaio	Rebulição
1	5,30
2	5,29
3	5,29
1	5,27
2	5,31
3	5,24



Base Y			
1	2	3	
Açúcar 1	Açúcar 2	Açúcar 1	
Fornecedor 1	Fornecedor 1	Fornecedor 1	
PI	11,27	13,68	11,57
	3,19	3,19	3,23
	8,00	7,60	4,50
Base Z			
1	2	3	
Açúcar 1	Açúcar 2	Açúcar 1	
Fornecedor 1	Fornecedor 1	Fornecedor 1	
PI	11,19	13,94	11,35
	3,28	3,22	3,27
	8,70		

Acidez (g/L)	1,70	1,70
Acidez (%)	69,00	69,00
Coloração (EBC)	4,25	4,31
Coloração a 20°C (EBC)	7,30	8,50
Coloração a 0°C (EBC)	0,37	0,42
Coloração Total 5 dias (EBC)	0,40	0,41
Clorato (mg/L)	0,30	0,30
Clorato (mg/L)	0,01	0,01
Estabilidade de Espuma (seg)	271	261
Índice de Açúcar (g/L)	4,90	5,20
Índice de Açúcar Total (mg/L)	8,00	6,00
Índice de Açúcar (U.A)	16,00	17,00
Índice de Açúcar (mg/L)	5,49	5,70
Índice de Açúcar (µg/L)	18,00	22,00
Índice de Açúcar Livre (mg/L)	69,00	69,00
Índice de Açúcar (mg/L)	97,00	97,00





Atendendo aos objetivos do trabalho foram realizados diferentes ensaios para melhorar a capacidade de produção na fábrica.

### 3.1 Ensaio de pH

#### 3.1.1 Resultados físico-químicos da preparação dos fabricos

O ensaio foi realizado de acordo com as condições definidas no capítulo 2. Durante a execução do ensaio procedeu-se à determinação do pH do mosto no início da ebulição para avaliar qual seria a quantidade de ácido fosfórico a adicionar durante a ebulição. Na tabela a seguir encontram-se apresentados os valores de pH no início e no fim da ebulição.

**Tabela 3:** Valores de pH no início e fim de ebulição dos fabricos do ensaio de pH.

pH Pretendido	Ensaio Industrial	pH início de ebulição	pH fim de ebulição
4,90	1	5,30	4,92
	2	5,29	4,97
	3	5,29	4,96
5,20	1	5,27	5,11
	2	5,31	5,17
	3	5,24	5,15

Analisando a tabela 3, verifica-se que os valores de pH no fim da ebulição não foram exatamente os pretendidos, uma vez que o ensaio é realizado à escala industrial. Os fabricos (ciclos de produção do mosto) foram produzidos segundo a mesma receita, mas são todos independentes e por isso pode haver diferenças físico-químicas derivadas da variabilidade do processo.

Confirma-se que os valores médios do pH em mosto frio dos 6 fabricos, não atingiram os valores esperados, 4,90 e 5,20, obtendo-se os valores médios de 4,94 e 5,09 respetivamente (tabela 4). Estes valores de pH são ligeiramente diferentes dos valores médios

de pH dos mostos em fim de ebulição (4,95 e 5,14), sendo o segundo valor aquele que apresenta maior diferença e aquele que possui um maior desvio padrão.

**Tabela 4:** Resultados dos parâmetros físico-químicos analisados nos mostos frios e respectivos desvios padrão no ensaio de pH.

		pH	Coloração (EBC)	Amargor (U.A)
pH 4,90	Média	4,94	14,90	35,33
	Desvio Padrão	0,01	0,26	0,58
pH 5,20	Média	5,09	15,47	38,67
	Desvio Padrão	0,07	1,93	2,31

O pH no início e no fim de ebulição foi determinado através de um potenciômetro localizado na sala de produção do mosto, e a amostra do mosto foi retirada da caldeira de ebulição, nessa mesma sala. O mosto foi arrefecido à temperatura ambiente e só depois se procedeu à determinação do pH.

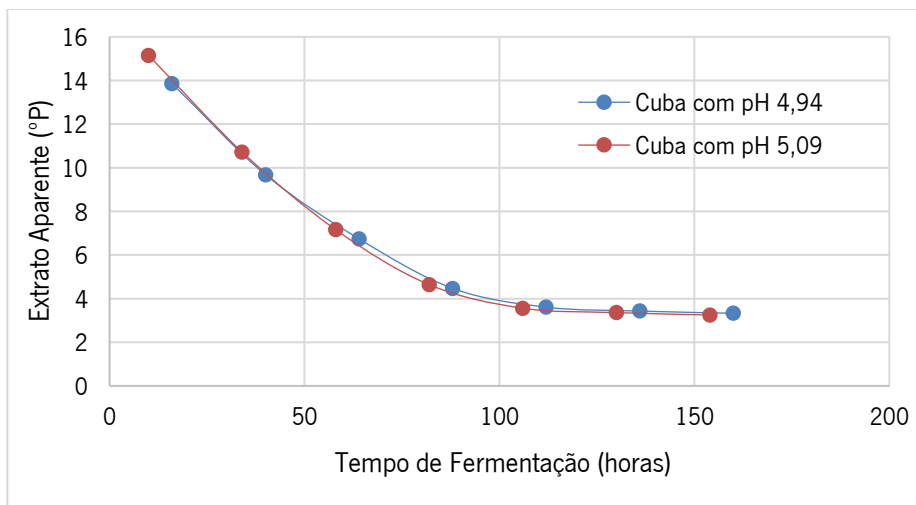
As amostras de mosto frio foram retiradas após o processo de arrefecimento do mosto, já na adega, antes de este entrar para a cuba cilindro cônica de fermentação. Os parâmetros físico-químicos das amostras de mosto frio foram depois determinados no laboratório de análises físico-químicas.

Os ensaios a diferente pH apresentaram diferenças significativas no amargor, sendo os fabricos com pH mais baixo aqueles que possuíam menor amargor, confirmando que o pH influencia a isomerização dos  $\alpha$ -ácidos do lúpulo. Ensaio anteriores mostraram que um pH mais alto na ebulição do mosto permite um maior rendimento na isomerização dos  $\alpha$ -ácidos, em contrapartida um pH mais baixo permite obter um amargor mais equilibrado.<sup>20</sup>

### 3.1.2 Resultados físico-químicos durante a fermentação

O resultado das determinações do extrato aparente ao longo da fermentação, observados na figura 21, mostram que a redução é similar nas duas cubas, o que sugere que ou não houve influência do pH do mosto na redução do extrato aparente pela levedura durante a fermentação, ou a diferença de pHs conseguida não foi suficiente para se detetarem diferenças significativas na variação do extrato aparente. Apesar de tudo, este resultado foi de

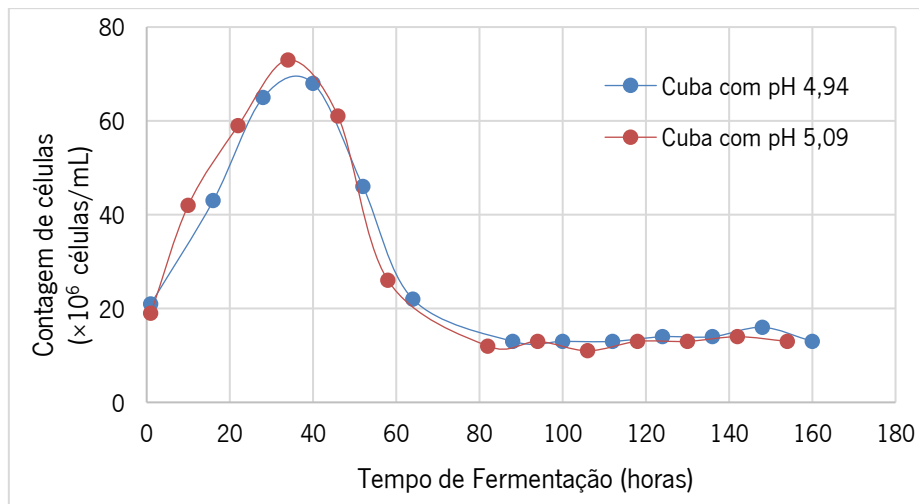
encontro ao esperado pois foi anteriormente relatado que as taxas de fermentação dos açúcares pela levedura são insensíveis a valores de pH entre 3,5 e 6.<sup>69,70</sup>



**Figura 21:** Representação dos valores de extrato aparente em função do tempo de fermentação nos ensaios realizados a diferente pH.

A figura 22 representa os valores de contagens de células de levedura de amostras de ambas as cubas cilindro-cônicas ao longo do tempo de fermentação, denota-se um crescimento equiparado até atingir o pico, que para a cuba com pH 4,94, representada com a cor azul, corresponde às 40 horas de fermentação e a uma contagem de células de  $68 \times 10^6$  células/mL, enquanto que para a cuba com pH 5,09, cor vermelha, se encontra às 34 horas de fermentação com uma contagem de células de  $73 \times 10^6$  células/mL. Verifica-se ainda que no início da fermentação as contagens de células de ambas as cubas eram aproximadas, sendo para a cuba com pH 4,94 de  $21 \times 10^6$  células/mL e para a cuba com pH de 5,09 de  $19 \times 10^6$  células/mL, confirmando assim que a quantidade de levedura inoculada no mosto foi aproximadamente igual.

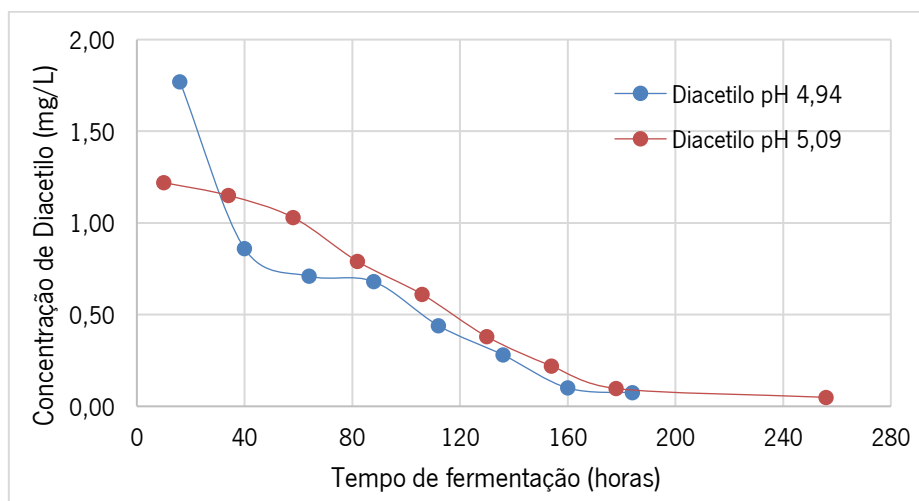
Atendendo a que a levedura utilizada era a mesma em ambas as cubas cilindro-cônicas e que as condições de fermentação, como por exemplo a temperatura, se manteve constante ao longo de toda a fermentação, os resultados apresentados na figura 22 permitem concluir que não houve influência do pH do mosto no crescimento celular da levedura utilizada. Também neste caso a diferença de pH observada poderá não ser suficiente para verificar alterações de crescimento da levedura.



**Figura 22:** Contagens de células de levedura em função do tempo de fermentação, no ensaio de pH.

A insensibilidade da levedura perante a diferença de pH conseguida, pode estar relacionada com o facto de que o pH interno da *S. cerevisiae* não depender do pH do mosto quando este apresenta valores que variem entre 3 e 7.<sup>69,71</sup>

Relativamente ao perfil da produção e remoção de diacetilo, verifica-se que no início da fermentação, ou seja, nas primeiras 20 horas, a produção de diacetilo foi maior para a cuba com pH 4,94 (figura 23). No entanto, observa-se também que a remoção de diacetilo pela levedura foi mais rápida a este pH, uma vez que apresenta concentrações mais baixas de diacetilo ao longo da restante fermentação.



**Figura 23:** Representação gráfica das determinações das concentrações de diacetilo (mg/L) em função do tempo de fermentação, para o ensaio de pH.



Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que o pH inicial do mosto não exerce uma influência na produção de diacetilo tão grande como outros parâmetros (temperatura). Contudo o pH inicial do mosto possui efeito na taxa de remoção do diacetilo, pois foram verificadas taxas de remoção maiores quando o pH inicial do mosto era menor.<sup>72</sup> Isto acontece devido ao pH do mosto afetar a velocidade da reação da descarboxilação espontânea do  $\alpha$ -acetolactato em diacetilo e às atividades das enzimas responsáveis por reduzir o diacetilo em acetoina e 2,3-butanodiol.<sup>53,72,73</sup>

A levedura, a semear que é introduzida nas cubas cilindro cónicas, é designada de levedura semeada enquanto que a levedura obtida no final da fermentação é designada de levedura recolhida. Os parâmetros microbiológicos analisados encontram-se apresentados na próxima tabela.

**Tabela 5:** Resultados microbiológicos da levedura semeada e recolhida para ambas as cubas cilindro cónicas do ensaio de pH.

		pH 4,94	pH 5,09
<b>Levedura semeada</b>	% Células Mortas	11	11
	Contagem de células ( $\times 10^6$ células/mL)	2,339	2,339
	Bactérias do mosto	0	0
	Bactérias lácticas	0	0
<b>Levedura recolhida</b>	% Células Mortas	8	6
	Contagem de células ( $\times 10^6$ células /mL)	1,844	1,932
	Bactérias do mosto	0	0
	Bactérias lácticas	0	0
Diferença nas células mortas (recolhida-semeada)		-3	-5

Após ocorrer a fermentação, a levedura foi recolhida para posterior reutilização. Na tabela 5 verifica-se que existiu uma diminuição no número de contagem de células entre a levedura semeada e a levedura recolhida para ambas as cubas, e que a diferença entre as duas cubas não é significativa. Relativamente aos resultados microbiológicos tanto a levedura semeada como a levedura recolhida estão isentas de contaminação microbiológica por bactérias do mosto e por bactérias lácticas.

### 3.1.3 Resultados físico-químicos em maturação

Terminada a fermentação, a cerveja entra na fase de maturação. Os resultados físico-químicos da cerveja no final da etapa de maturação encontram-se expostos na tabela seguinte.

**Tabela 6:** Valores dos resultados físico-químicos das amostras das cubas cilindro-cônicas em maturação no ensaio de pH.

	pH 4,94	pH 5,09
Extrato Aparente (°P)	3,05	2,87
pH	4,40	4,40
Coloração (EBC)	13,60	14,00
Amargor (U.A)	25,00	26,00

Analisando os resultados verifica-se que não existe diferença significativa entre os resultados a diferentes pH. Observa-se ainda que apesar do pH inicial ser ligeiramente diferente, o pH em maturação de ambas as cubas é igual, 4,40.

O amargor é um parâmetro importante de qualidade na cerveja. Tal como já foi dito, é causado pela isomerização dos  $\alpha$ -ácidos do lúpulo adicionados durante a ebulição do mosto. O processo de fermentação tem influência na concentração final destes iso- $\alpha$ -ácidos, porque se ligam à parede celular da levedura,<sup>74,75</sup> e ainda pela perda durante a formação de espuma.<sup>56</sup> Na tabela 6, encontram-se apresentados os valores de amargor para as duas cubas cilindro cônicas após o processo de maturação, verifica-se que comparativamente à concentração do amargor no mosto frio, no início de fermentação (tabela 4) existe uma perda de 29,2% para a cuba com pH 4,94 e 32,8% para a cuba com pH 5,09.

## 3.2 Ensaio otimização da receita da Cerveja A

### 3.2.1 Preparação do produto acabado em laboratório

O produto final da Cerveja A, preparado em laboratório de acordo com o indicado no capítulo 2, foi sujeito à determinação das respetivas características físico-químicas. Estes resultados encontram-se na tabela a seguir.

**Tabela 7:** Resultados físico-químicos da Cerveja A preparada em laboratório com diferentes bases de cerveja, açúcares e concentrados de diferentes fornecedores.

<b>Base Y</b>				
<b>Ensaio</b>	1	2	3	4
<b>Açúcar</b>	Açúcar 1	Açúcar 2	Açúcar 1	Açúcar 2
<b>Concentrado</b>	Fornecedor 1	Fornecedor 1	Fornecedor 2	Fornecedor 2
Extrato primitivo (°P)	11,27	13,68	11,57	14,16
pH	3,19	3,19	3,23	3,09
Coloração (EBC)	8,00	7,60	4,50	4,10
<b>Base Z</b>				
<b>Ensaio</b>	1	2	3	4
<b>Açúcar</b>	Açúcar 1	Açúcar 2	Açúcar 1	Açúcar 2
<b>Concentrado</b>	Fornecedor 1	Fornecedor 1	Fornecedor 2	Fornecedor 2
Extrato primitivo (°P)	11,19	13,94	11,35	14,19
pH	3,28	3,22	3,27	3,23
Coloração (EBC)	8,80	8,70	4,70	4,50

Analisando a tabela 7, observa-se que nos produtos acabados em que o açúcar adicionado é o Açúcar 2 o extrato primitivo (°P) é superior ao extrato obtido com o açúcar 1, o que era esperado visto que se adicionou uma maior quantidade de Açúcar 2, de modo a contrabalançar a maior doçura a nível sensorial do Açúcar 1. Relativamente à coloração, verificaram-se diferenças significativas nos valores entre os diferentes fornecedores do concentrado, sendo o Fornecedor 1 aquele que apresenta coloração mais forte, enquanto que o Fornecedor 2 apresenta coloração mais ténue. Esta diferença de coloração pode estar relacionada com a cor original dos concentrados, uma vez que o concentrado do Fornecedor 1 apresentava uma cor mais escura.

O produto Cerveja A preparado em laboratório foi também submetido a análise sensorial. Esta foi executada por sete provadores que classificaram o produto de acordo com a sua perceção sobre a qualidade do produto apresentado.

Na análise sensorial (tabela 8) observa-se uma melhor aceitação e prova favorável dos produtos com base de cerveja Base Y, Açúcar 1 e concentrado do Fornecedor 1 e Fornecedor 2, já que a média das avaliações foi de -0,4 e -0,3, respetivamente, logo estes produtos encontravam-se entre o produto sem diferenças e o produto sem diferenças significativas face ao controlo, de acordo com a opinião dos provadores.

**Tabela 8:** Resultados da análise sensorial realizada aos diferentes produtos acabados produzidos em laboratório para a Cerveja A com diferentes bases, açúcares e concentrados de diferentes fornecedores por sete provadores.

<b>Base Y</b>				
<b>Ensaio</b>	1	2	3	4
<b>Açúcar</b>	Açúcar 1	Açúcar 2	Açúcar 1	Açúcar 2
<b>Concentrado</b>	Fornecedor 1	Fornecedor 1	Fornecedor 2	Fornecedor 2
<b>Avaliação Global *</b>	0	-2	0	-2
	-1	0	0	-1
	0	-1	0	0
	0	-1	0	0
	-1	0	-1	0
	0	0	-1	-1
	0	-1	0	0
<b>Média</b>	-0,4	-0,7	-0,3	-0,8
<b>Desvio Padrão</b>	0,5	0,8	0,5	0,8
<b>Base Z</b>				
<b>Ensaio</b>	1	2	3	4
<b>Açúcar</b>	Açúcar 1	Açúcar 2	Açúcar 1	Açúcar 2
<b>Concentrado</b>	Fornecedor 1	Fornecedor 1	Fornecedor 2	Fornecedor 2
<b>Avaliação Global *</b>	0	-1	-1	-2
	-1	0	0	0
	-1	-1		-1
	-1	-1	-1	-1
	-1	0	-1	-1
	0	-1	-2	0
	-1	0	0	0
<b>Média</b>	-0,7	-0,7	-1,0	-0,8
<b>Desvio Padrão</b>	0,5	0,5	0,7	0,8

\*0 Produto sem diferenças face ao controlo; -1 Produto sem diferenças significativas face ao controlo; -2 Produto com diferenças significativas face ao controlo.

### 3.2.2 Ensaio industrial com alteração apenas da Base de Cerveja

O ensaio industrial foi realizado de acordo com o descrito no capítulo 2 usando dois Tanques de Cerveja Filtrada (TCFs). O TCF controlo foi produzido com base de cerveja Base X, enquanto que o TCF ensaio foi produzido com base de cerveja Base W (a Base W foi escolhida devido às semelhanças das suas características com a Base Y testada em laboratório e por se encontrar em maior disponibilidade na adega). Para ambos os TCFs foram utilizados o Açúcar 1 e o concentrado do Fornecedor 1. Os resultados dos parâmetros físico-químicos analisados encontram-se expostos na tabela seguinte.

**Tabela 9:** Resultados físico-químicos da Cerveja A produzida industrialmente com as bases de cerveja X e W.

Base de cerveja	CONTROLO	ENSAIO
	Base X	Base W
Densidade	1,02885	1,02745
Extrato Primitivo (°P)	10,95	10,93
pH	3,20	3,20
Amargor (U.A)	9	11

Analisando a tabela 9, não se verificaram diferenças significativas dos resultados físico-químicos entre o TCF controlo e o TCF ensaio. Os TCFs produzidos com a Cerveja A, com Base X ou Base W, foram para enchimento, para se obter o produto acabado. Os resultados das análises realizadas aos produtos acabados estão na tabela 10.

**Tabela 10:** Resultados físico-químicos do Produto Acabado do ensaio industrial Cerveja A com as bases de cerveja X e W.

Base de cerveja	CONTROLO	ENSAIO
	Base X	Base W
Extrato Primitivo (°P)	10,92	10,81
pH	3,25	3,25
Coloração (EBC)	5,30	5,70
Estabilidade de Espuma (s)	146	147
CO <sub>2</sub> (g/L)	5,00	5,10
SO <sub>2</sub> Total (mg/L)	7,00	7,00
Amargor (U.A)	9,00	10,00

Analisando a tabela 10, verificou-se que não havia diferença significativa entre os resultados físico-químicos do controlo (Cerveja A com Base X) e o ensaio (Cerveja A com Base W). Assim, pelos resultados físico-químicos a alteração para Base W, não alterava significativamente as características da Cerveja A.

Aos produtos acabados Cerveja A com Base X e Base W, foi realizada uma análise sensorial e um teste triangular. Concluiu-se que o perfil aromático de ambas era satisfatório e que a estabilidade organolética era também satisfatória (tabela 11).

Além das análises sensoriais expressas na tabela 11 foi efetuado aos dois produtos, um teste triangular realizado pelo painel de provadores da *Super Bock Group*, de modo a averiguar se há diferença sensorial entre eles. Este teste consiste em ter três copos com as amostras, em que dois copos contêm a mesma amostra e um terceiro copo contém uma amostra

diferente. O número total de provadores foi 8, em que apenas 1 identificou corretamente a amostra diferente, logo conclui-se que não há diferença significativa entre a Cerveja A produzida com Base X e a Cerveja A produzida com Base W. Para haver diferença significativa entre as amostras, num total de 8 provadores, pelo menos 6 provadores teriam que identificar a amostra diferente para um grau de significância de 95%; 7 provadores para um grau de significância de 99% e 8 provadores para um grau de significância de 99,9%.

**Tabela 11:** Resultados da análise sensorial realizada aos produtos acabados Cerveja A com Base X e Base W.

Base de Cerveja	CONTROLO	ENSAIO
	Base X	Base W
Perfil Aromático	- 0,6	- 0,4
Avaliação- Perfil Aromático	Satisfatório	Satisfatório
Estabilidade Organolética	- 0,3	0,0
Avaliação- Estabilidade organolética	Satisfatório	Satisfatório

### 3.3 Ensaio com a solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase

#### 3.3.1 Ensaio da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B

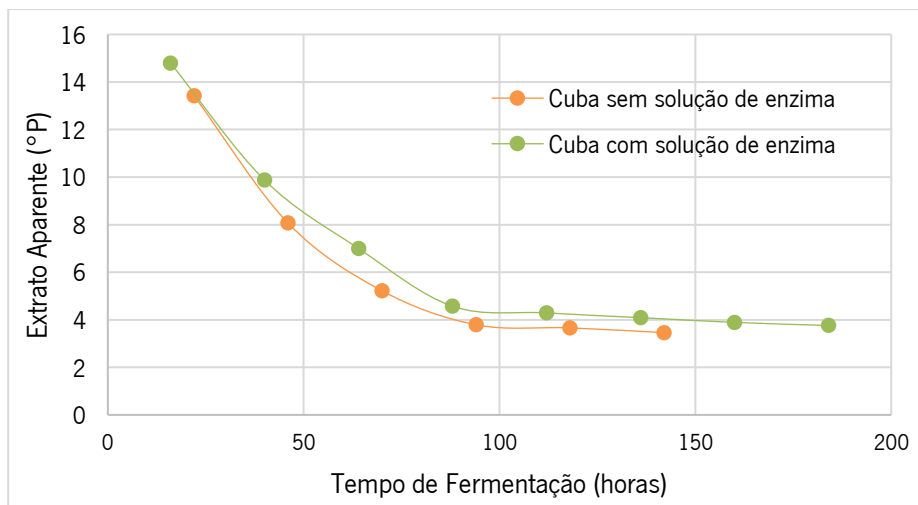
Os ensaios foram realizados de acordo com o descrito no capítulo 2, ou seja, a enzima foi adicionada após o arrefecimento do mosto e antes da inoculação da levedura.

Os testes físico-químicos do mosto frio (tabela 12) foram efetuados antes da adição da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase. Analisando os resultados, conclui-se que não há diferenças significativas e com impacto direto no ensaio.

**Tabela 12:** Resultados físico-químicos médios do mosto frio usado para encher as cubas controlo e ensaio, no ensaio com a solução da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B.

		pH	Coloração (EBC)	Amargor (U.A)	Atenuação Real Limite (%)
Controlo	Média	4,91	16,07	36,00	69,33
	Desvio Padrão	0,02	0,65	2,08	0,58
Ensaio	Média	5,01	17,50	37,00	69,00
	Desvio Padrão	0,16	0,97	2,50	0,00

Ao longo da fermentação foi acompanhado o decréscimo do extrato aparente em ambas as cubas, controlo e ensaio. O resultado encontra-se representado na figura seguinte.



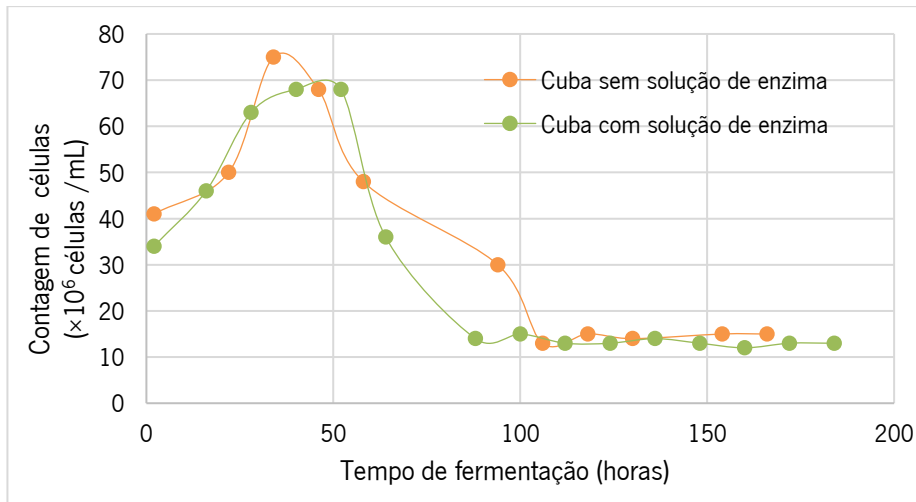
**Figura 24:** Representação gráfica do efeito da ação da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase nos resultados de extrato aparente ao longo do tempo de fermentação, para a Cerveja B.

Analisando a figura denota-se que a cuba que possui a solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (curva a verde) demorou cerca de 42 horas a mais a reduzir o extrato aparente do que a cuba sem solução de enzima (curva a laranja).

Relativamente à contagem de células de levedura durante a fermentação (figura 25), detetou-se que no início, às duas horas, existe diferença na contagem de células, sendo esta de  $41 \times 10^6$  células/mL para a cuba controlo e de  $34 \times 10^6$  células/mL para a cuba ensaio. A diferença pode dever-se ao efeito da utilização da solução da enzima na levedura no início da fermentação, uma vez que a quantidade de levedura inoculada no mosto foi igual para ambas as cubas.

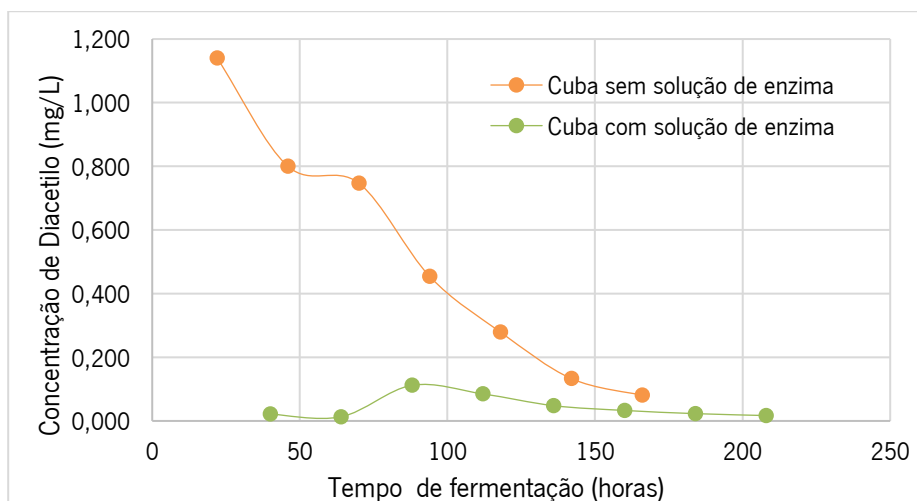
Estudos anteriores mostraram que a contagem máxima de células de levedura aumenta com o aumento da quantidade de levedura inoculada no mosto.<sup>74</sup>

No nosso caso observou-se um pico do crescimento celular da levedura da cuba controlo às 34 horas, com um total de células de  $75 \times 10^6$  células/mL, e um pico na a cuba ensaio às 40 horas, com uma contagem de  $68 \times 10^6$  células/mL, o que faz uma diferença de  $7 \times 10^6$  células/mL e vai de encontro à diferença detetada no início da fermentação. No fim da fermentação a contagem de células era semelhante.



**Figura 25:** Representação gráfica do efeito da utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase nos resultados de contagens de células de levedura durante o tempo de fermentação, para a Cerveja B.

A concentração de diacetilo foi determinada por cromatografia gasosa nas cubas cilindro cónicas controlo e ensaio a intervalos de tempo regulares (figura 26). Observa-se uma diferença bastante significativa nas curvas apresentadas. A curva a laranja, correspondente à cuba controlo, inicia com um valor de diacetilo de 1,140 mg/L, já a curva a verde, cuba ensaio, inicia com um resultado de 0,022 mg/L. Enquanto que os valores da cuba controlo encontram-se sempre a diminuir, a cuba ensaio possui um pequeno pico de 0,112 mg/L às 88 horas.



**Figura 26:** Representação gráfica do efeito da utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na concentração de diacetilo ao longo do tempo de fermentação para a Cerveja B.



A cuba controlo necessitou de mais tempo, cerca de 30 h, para reduzir o diacetilo para o valor máximo de especificação (0,080 mg/L) do que a cuba ensaio, existindo assim diferenças significativas na redução da concentração de diacetilo, sendo a solução de enzima eficaz na diminuição do tempo de redução da concentração de diacetilo.

Após a finalização do processo de fermentação e maturação, em que no final os resultados de diacetilo foram inferiores ao limite estabelecido, foi realizada uma amostragem para determinação das características físico-químicas das cubas em estudo. Os valores obtidos encontram-se na tabela 13.

**Tabela 13:** Valores das características físico-químicas das cubas em maturação no ensaio da ação da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B.

	Controlo	Ensaio
Extrato Aparente ( $^{\circ}$ P)	3,28	3,66
Atenuação Real (%)	68	66
pH	4,22	4,24
Coloração (EBC)	16,50	15,40
Amargor (U.A)	26	24

Constata-se através da tabela 13 que existiram diferenças na atenuação real, sendo a cuba ensaio a que apresentou um valor inferior. A cuba controlo apresentou uma atenuação real de 68%, enquanto que a cuba ensaio possuía uma atenuação real de 66%. Além disso, analisando a atenuação real limite dos mostos utilizados no ensaio verificou-se que ambas as cubas possuíam uma atenuação real limite de 69% (tabela12). Demonstrando que a levedura em ambas as cubas não conseguiu ter a capacidade máxima de fermentação, contudo, na cuba ensaio, a diferença, foi mais acentuada, possuindo uma diferença entre atenuações de 3%, o que demonstra uma maior dificuldade de fermentação.

Os resultados da comparação final entre o controlo e o ensaio da Cerveja B, obtidos através da cerveja em produto acabado encontram-se presentes na tabela 14. Verificou-se que os parâmetros estabilidade de espuma, concentração de CO<sub>2</sub>, concentração de SO<sub>2</sub>, acetaldeído, DMS e polifenóis totais, foram aqueles que apresentaram maiores diferenças. Contudo, a concentração de CO<sub>2</sub> não se encontra relacionada com a fermentação, já que foi corrigida na etapa de filtração da cerveja.

O produto acabado ensaio, apresentou uma menor estabilidade de espuma, 10 s comparativamente ao produto acabado controlo, contudo pensa-se que a diferença não se deve

à utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase, uma vez que existem vários outros fatores que podem influenciar a estabilidade de espuma (como por exemplo vários subprodutos da fermentação e uma elevada concentração de aminoácidos).<sup>76</sup>

**Tabela 14:** Resultados das análises realizadas ao produto acabado, controlo e ensaio, no estudo da utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B.

	Controlo	Ensaio
Extrato Aparente (°P)	1,70	1,80
Atenuação Real (%)	69	69
pH	4,25	4,31
Coloração (EBC)	7,30	8,50
Turvação a 20°C (EBC)	0,37	0,42
Turvação a 0°C (EBC)	0,40	0,41
Turvação Total 5 dias (EBC)	0,30	0,30
Diacetilo (mg/L)	0,01	0,01
Estabilidade de Espuma (s)	271	261
CO <sub>2</sub> (g/L)	4,90	5,20
SO <sub>2</sub> Total (mg/L)	8,00	6,00
Amargor (U.A)	16	17
Acetaldeído (mg/L)	5,49	5,70
DMS ( $\mu$ g/L)	18,00	22,00
Nitrogénio Aminado Livre (mg/L)	69,00	68,00
Polifenóis Totais (mg/L)	97,00	109,00

Na tabela 14 encontram-se também as concentrações de acetaldeído determinadas para a Cerveja B controlo e ensaio. O acetaldeído deriva do metabolismo da levedura, como intermediário da produção de etanol a partir de uma molécula de glucose e origina um sabor de maçã não amadurecida. O acetaldeído possui um limite de deteção sensorial de 10-20 mg/L, e a sua presença na cerveja acima deste limite resulta em sabores desagradáveis.<sup>43,77</sup> Posto isto, verificou-se que as concentrações de acetaldeído para a Cerveja B controlo e ensaio foram inferiores aos limiares de perceção sensorial, com valores de 5,49 mg/L e 5,70 mg/L, respetivamente. A diferença entre os resultados não é significativa, pois deriva da própria variabilidade do processo.

A quantidade de DMS presente na cerveja corresponde maioritariamente à quantidade presente no mosto, podendo ser formado também algum pelo metabolismo da levedura. O limite de sabor para o DMS é diferente de cerveja para cerveja e depende da sua

complexidade, no entanto é geralmente citado como sendo em torno de 30 µg/L.<sup>78</sup> A concentração de DMS foi determinada para ambas as Cervejas B controlo e ensaio com resultados inferiores ao limite de perceção sensorial.

Os compostos aromáticos da cerveja são muito importantes, pois contribuem de forma significativa para a qualidade do produto final.<sup>79</sup> A presença de álcoois na cerveja pode ter impactos positivos e negativos no aroma e no sabor. Em grandes quantidades (>300 mg/L) podem levar a um cheiro e sabor forte, enquanto que em quantidades adequadas conferem características desejáveis.<sup>77</sup> Na tabela 15 encontram-se as concentrações dos álcoois totais na Cerveja B controlo e ensaio, com as concentrações de 127,74 mg/L e 119,37 mg/L, respetivamente. Estes valores encontram-se em concentrações que não provocam aroma nem sabor desagradável.

**Tabela 15:** Concentração dos álcoois e ésteres presentes no produto acabado, controlo e ensaio, no estudo da utilização da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B.

	Controlo	Ensaio	Limites de perceção de sabor <sup>80</sup>
n-Propanol (mg/L)	18,69	18,68	600
Isobutanol (mg/L)	15,45	15,29	100
Álcoois Amílicos (mg/L)	93,60	85,40	50-70
Total Álcoois (mg/L)	127,74	119,37	
Acetato de Etilo (mg/L)	18,82	18,60	25-30
Acetato Amílico (mg/L)	1,53	1,47	1,2-2,0
Total Ésteres (mg/L)	20,35	20,07	
A/E	6,28	5,95	

\*A/E- Total de Álcoois/Total de Ésteres

Os álcoois amílicos são um grupo de álcoois constituído pelos álcoois 2-metilbutanol e 3-metilbutanol (álcool isoamílico) entre outros, que fazem parte dos álcoois alifáticos encontrados na cerveja tal como o n-propanol e o isobutanol.<sup>39,40</sup> As concentrações destes álcoois na Cerveja B, controlo e ensaio, encontram-se também na tabela 15, bem como os limites de sabor. Observa-se que as concentrações de n-propanol (18,69 e 18,68 mg/L) e isobutanol (15,45 e 15,29 mg/L) foram semelhantes, para Cerveja B, controlo e ensaio, e encontravam-se abaixo dos limiares de deteção sensorial. O n-propanol pode dar a impressão de aroma a álcool e doce, e o isobutanol de solvente.<sup>80</sup> Além disso, os álcoois amílicos apresentam-se em concentrações ligeiramente diferentes para a Cerveja B controlo e ensaio, 93,6 e 85,4 mg/L, respetivamente, e acima do limite sensorial.

Os ésteres são os elementos aromáticos mais importantes produzidos pela levedura, isso talvez por possuírem um limiar de odor muito baixo na cerveja.<sup>80,81,82</sup> Quando produzidos em excesso podem afetar negativamente a cerveja com um sabor amargo e frutado, assim, torna-se crucial que o cervejeiro mantenha as condições ótimas para obter uma cerveja equilibrada em termos do seu perfil de ésteres.<sup>80</sup>

As concentrações dos ésteres acetato de etilo e acetato amílico para a Cerveja B, controlo e ensaio, encontram-se também na tabela 15. O acetato de etilo possuiu uma concentração de 18,82 e 18,60 mg/L respetivamente, enquanto que o acetato amílico se encontrou com concentrações de 1,53 e 1,47 mg/L. Tanto o acetato de etilo como o acetato amílico estavam presentes em concentrações inferiores ao limite de perceção sensorial. Comparando o total da concentração de ésteres entre a Cerveja B controlo e ensaio, verificou-se que não havia diferenças significativas.

A utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B, aparentemente não teve impacto significativo no metabolismo de produção dos álcoois e ésteres na levedura. Apresentando a Cerveja B controlo e ensaio perfis aromáticos semelhantes (tabela 15).

A análise sensorial é umas das análises mais importantes a ser efetuada. Esta é realizada por um painel de provadores que classificam de acordo com a sua opinião sensorial. Os resultados da avaliação sensorial à Cerveja B controlo e ensaio encontram-se na tabela a seguir apresentada.

**Tabela 16:** Resultados da análise sensorial realizada ao produto acabado do controlo e do ensaio no estudo da ação da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja B.

Análise sensorial	Controlo	Ensaio
Perfil Aromático	- 0,5	- 0,5
Avaliação – Perfil Aromático	Satisfatório	Satisfatório
Estabilidade Organolética	- 0,5	- 1
Avaliação- Estabilidade Organolética	Satisfatório	Não suficientemente satisfatório

Na avaliação do perfil aromático entre o produto acabado controlo e ensaio verificou-se que não existiam desigualdades, ou seja, não existiam diferenças entre a Cerveja B que não levou a solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase e a Cerveja B à qual foi adicionada a enzima, possuindo ambas uma avaliação satisfatória (tabela 16). Em contrapartida na

avaliação da estabilidade organolética, o produto acabado ensaio não foi suficientemente satisfatório. A estabilidade organolética é determinada após a cerveja ter estado 7 dias a uma temperatura de 37 °C, e de seguida 24 h a 0 °C.

### 3.3.2 Ensaio da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C

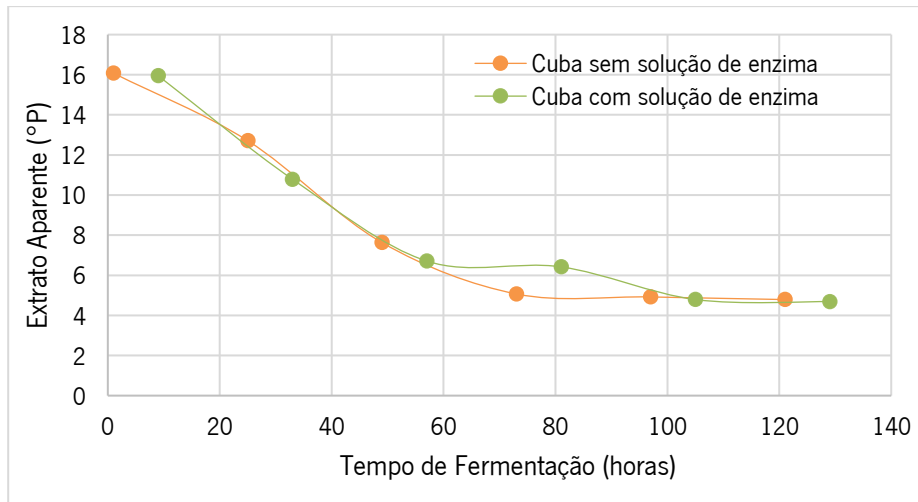
Os ensaios foram realizados de acordo com o descrito no capítulo 2, com uma cuba controlo, sem enzima, e uma ensaio, com a solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase.

**Tabela 17:** Resultados físico-químicos médios dos fabricos no teste de utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C e respetivo desvio padrão.

		pH	Coloração (EBC)	Amargor (U.A)	Atenuação Real Limite (%)
Controlo	Média	4,95	324,00	29,67	64,00
	Desvio Padrão	0,03	13,89	2,52	0,00
Ensaio	Média	4,95	312,33	29,33	65,00
	Desvio Padrão	0,04	0,58	2,08	1,00

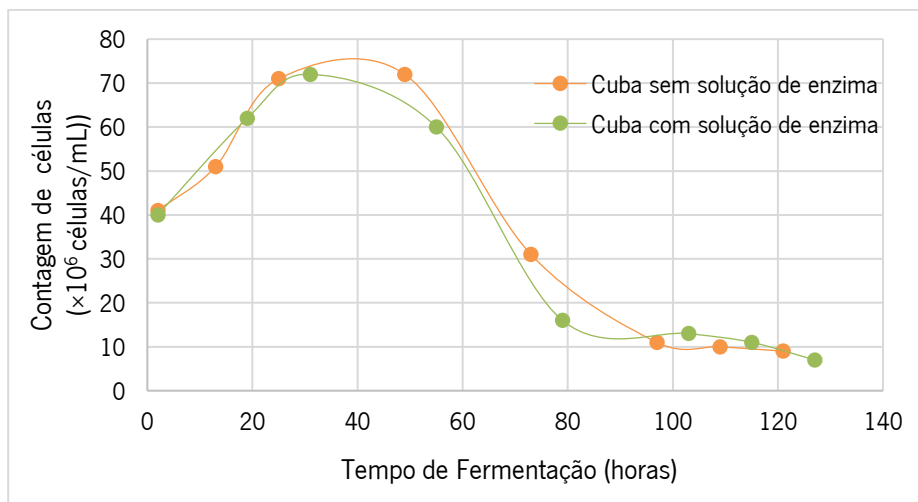
Observando a tabela 17, verifica-se que os valores médios dos parâmetros analisados nos mostos das duas cubas de Cerveja C, controlo e ensaio, foram muito semelhantes, tal como era esperado, visto que não se efetuou qualquer tipo de alteração no processo de produção do mosto, sendo este produzido de acordo com a mesma receita.

A redução do extrato aparente na cuba controlo, sem adição de enzima, e na cuba ensaio, com adição da enzima, foi idêntica (figura 27). Neste ensaio um fator importante a considerar é que não foi utilizada a mesma cultura de levedura em ambas as cubas. Contudo as culturas de leveduras utilizadas eram da mesma estirpe, o que nos permitiu verificar que quando existem mostos com características semelhantes, produzidos através da mesma receita, e condições de fermentação igualmente semelhantes (ambas as cubas fermentaram à mesma temperatura), a redução do extrato aparente é semelhante, ou seja, a velocidade de fermentação é semelhante.



**Figura 27:** Representação gráfica do efeito da ação da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase nos resultados de extrato aparente ao longo do tempo de fermentação para a Cerveja C.

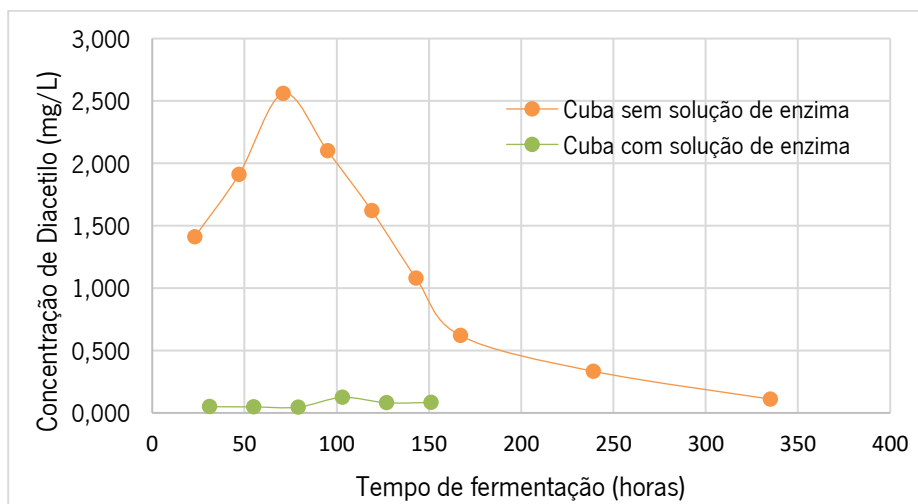
O crescimento da levedura ao longo da fermentação, para ambas as cubas, controlo e ensaio, encontra-se na figura 28. Verificou-se que a quantidade inoculada no mosto foi semelhante, pois após 2 h do início da fermentação as cubas controlo e ensaio possuíam  $41 \times 10^6$  células/mL e  $40 \times 10^6$  células/mL, respetivamente. Além disso, ambas as cubas apresentaram um pico de  $72 \times 10^6$  células/mL.



**Figura 28:** Representação gráfica do efeito da utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase nos resultados de contagens de células de levedura durante o tempo de fermentação, para a Cerveja C.

Este crescimento equiparado para culturas diferentes da levedura, mas da mesma estirpe, mostra que quando existe mostos com características semelhantes e condições de

fermentação parecidas, como a temperatura e a quantidade de levedura inoculada, o crescimento da levedura será semelhante, e não influencia o processo.



**Figura 29:** Representação gráfica do efeito da utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase nos resultados das concentrações de diacetilo ao longo do tempo de fermentação para a Cerveja C.

Entre as duas cubas, controlo sem enzima e ensaio com enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase foi notória a grande diferença das concentrações de diacetilo (figura 29). A cuba ensaio da Cerveja C, durante a fermentação nunca teve concentrações de diacetilo acima da concentração máxima aceitável para o tipo de cerveja em estudo.

A utilização da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C, permitiu reduzir o tempo de maturação em aproximadamente 8 dias comparativamente à Cerveja C controlo.

Na etapa de maturação, tabela 18, verificaram-se características ligeiramente diferentes entre as duas cubas. Na coloração, a cuba controlo possuiu mais cor que a cuba ensaio, enquanto que o amargor para a cuba controlo foi menor do que para a cuba ensaio.

**Tabela 18:** Resultados físico-químicos das cubas ensaio e controlo na fase de maturação, no estudo da utilização da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C.

	Controlo	Ensaio
Extrato Aparente ( $^{\circ}$ P)	4,32	4,49
Atenuação Real (%)	63	62
pH	4,37	4,3
Coloração (EBC)	314	291
Amargor (U.A)	17	21

Comparando o amargor determinado na fase de maturação para a cuba controlo e ensaio, com o amargor determinado ao mosto frio (tabela 17), antes de se iniciar a fermentação, verificou-se que durante o processo de fermentação existiu uma diminuição do valor de amargor de 43% e 28% para a cuba Cerveja C controlo e ensaio, respetivamente.

Através da análise das características determinadas para o produto acabado, ensaio e controlo, (tabela 19), verificou-se que o extrato aparente, o pH e a estabilidade de espuma, foram semelhantes para ambas as cervejas. A Cerveja C controlo apresentava uma coloração superior, que foi de encontro ao observado na fase de maturação (tabela 18), e um teor em CO<sub>2</sub> também superior, no produto acabado. Em contrapartida o valor de amargo foi superior para o produto acabado Cerveja C ensaio, também verificado na fase de maturação. Quanto ao valor de diacetilo, foi inferior para o produto acabado da Cerveja C ensaio, mas ambos apresentaram valores satisfatórios.

**Tabela 19:** Resultados das análises do produto acabado do controlo e do ensaio, do estudo da utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C.

	Controlo	Ensaio
Extrato Aparente (°P)	3,00	3,15
Atenuação Real (%)	63	62
pH	4,38	4,33
Coloração (EBC)	214,00	194,00
Diacetilo (mg/L)	0,06	0,03
Estabilidade de Espuma (s)	279	275
CO <sub>2</sub> (g/L)	5,31	5,22
Amargor (U.A)	15	19

Relativamente à atenuação real verifica-se que comparativamente à atenuação real limite determinada ao mosto frio (tabela 17), a cuba ensaio apresenta uma diferença de 4,6% enquanto que a cuba controlo apresenta apenas 1,6%.

Pelos resultados da tabela 19 conclui-se que aparentemente a enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase não influenciou de forma significativa as características fisico-químicas dos produtos acabados da Cerveja C analisada.

A análise sensorial é das análises mais importantes, uma vez que esta permite verificar a perceção humana ao produto, com o seu palato e os seus aromas. Esta análise foi realizada por um painel de jurados treinados para detetar imperfeições. Os resultados encontram-se



expostos na tabela 20, e demonstram que a nível sensorial não houve diferenças significativas obtendo ambos os produtos acabados de Cerveja C, uma avaliação satisfatória.

**Tabela 20:** Resultados da análise sensorial realizada ao produto acabado, o controlo e ensaio, no estudo da utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C.

Análise sensorial	Controlo	Ensaio
Controlo Organolético	0,0	0,0
Avaliação - Controlo Organolético	Satisfatório	Satisfatório
Estabilidade Organolética	0,0	-0,3
Avaliação- Estabilidade Organolética	Satisfatório	Satisfatório

### 3.3.3 Ensaio da utilização da solução de enzima $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja D

Na Cerveja D foram realizados dois ensaios do estudo da utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase mas, por razões que se prendem com o funcionamento da empresa, não houve uma cuba controlo, ou seja, uma cuba constituída por mosto da Cerveja D sem adição da solução de enzima de forma a poder comparar ambas as fermentações com e sem solução de enzima.

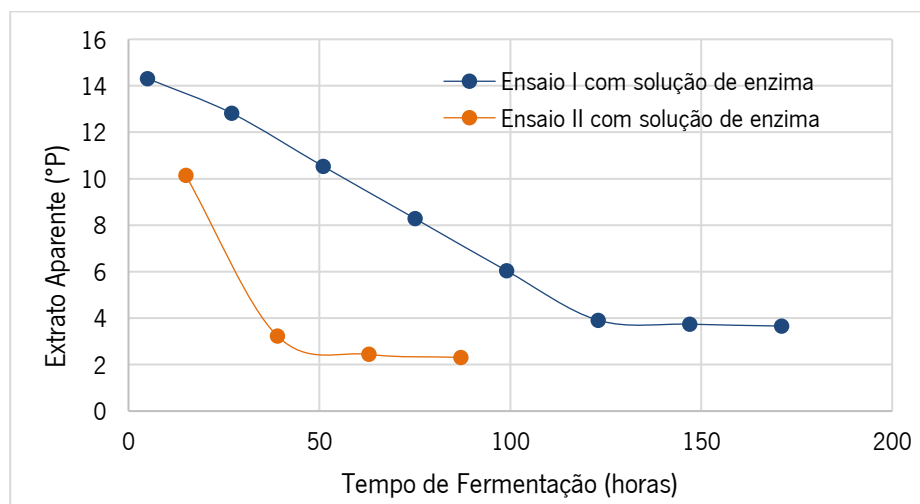
Em ambos os ensaios foi adicionada a solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase, contudo em quantidades diferentes, à cuba Ensaio I foi adicionada a quantidade de 3 kg de solução de enzima (0,01g/L), enquanto que à cuba Ensaio II foi adicionada a quantidade de 3,5 kg de solução de enzima (0,015g/L).

**Tabela 21:** Resultados físico-químicos médios do mosto e respetivo desvio padrão para os dois ensaios de utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja D.

		pH	Coloração EBC	Amargor (UA)	Atenuação Real Limite (%)
Ensaio I	Média	5,09	24,60	34,00	67,50
	Desvio Padrão	0,06	2,43	2,22	0,58
Ensaio II	Média	5,05	26,40	28,00	69,50
	Desvio Padrão	0,06	2,66	4,32	1,29

Os resultados dos mostos de Cerveja D determinados nos dois ensaios realizados encontram-se na tabela 21, notando-se diferenças significativas no amargor e na atenuação real limite.

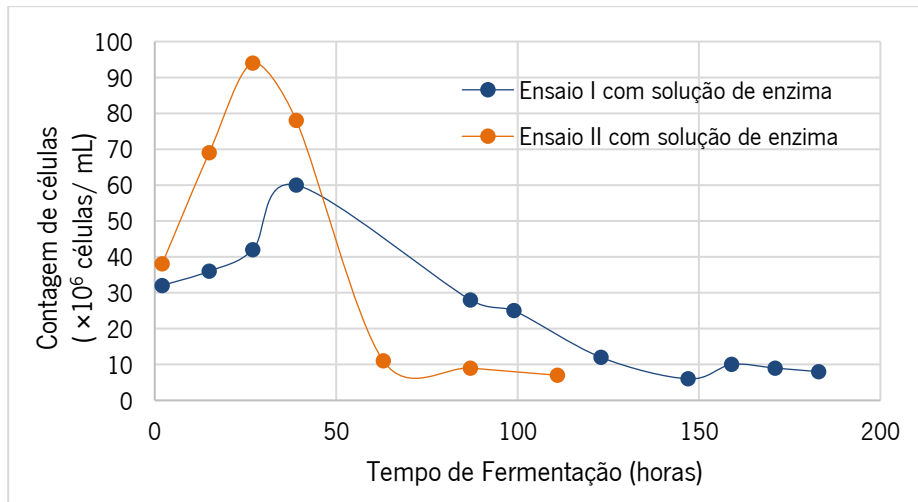
Observando a figura 30 verifica-se que houve uma diferença significativa no perfil de redução de extrato aparente entre as duas cubas ensaio. Apesar da diferença de concentração de enzima entre os ensaios esta não seria suficiente para justificar as diferenças na redução do extrato aparente observadas. No entanto, estas podem ser justificadas pela utilização de temperaturas de fermentação diferente, a cuba de Ensaio II fermentou a uma temperatura 2 °C mais alta que a cuba do Ensaio I e foi mais rápida.



**Figura 30:** Representação gráfica dos resultados de extrato aparente (°P) para as cubas cilindro cónicas ensaio ao longo da fermentação da Cerveja D com adição da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase.

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram que o aumento da temperatura aumenta a taxa de fermentação, ou seja, reduz o tempo de fermentação.<sup>83</sup>

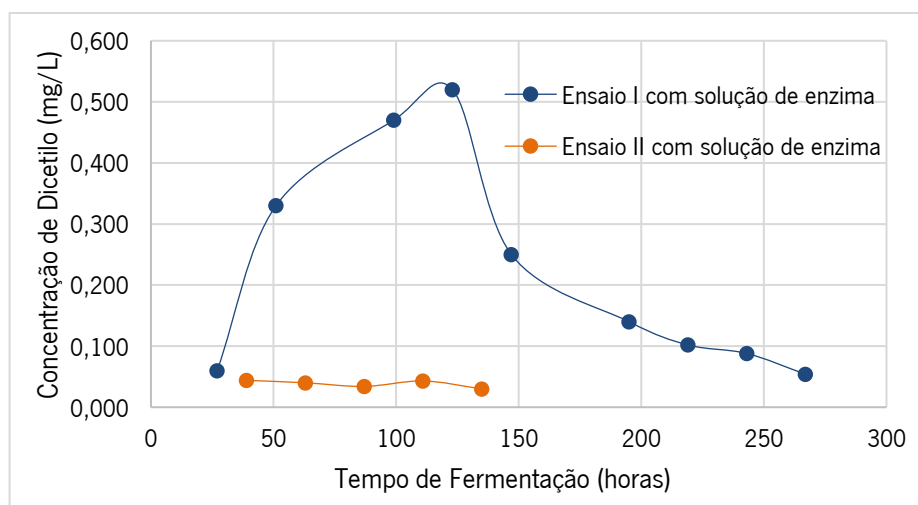
A quantidade de levedura no início da fermentação do Ensaio II foi superior à quantidade de levedura no Ensaio I, sendo esta diferença de  $6 \times 10^6$  células/mL (figura 31). Verificou-se ainda um crescimento mais acentuado num tempo mais reduzido, da levedura no Ensaio II, que pode mais uma vez ser justificado pela maior temperatura de fermentação. O aumento da temperatura de fermentação levou ao aumento do crescimento celular da levedura.<sup>83</sup>



**Figura 31:** Representação gráfica dos resultados das contagens de células para as cubas cilindro cónicas ensaio ao longo da fermentação da Cerveja D com adição da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase.

Os resultados da concentração de diacetilo obtidos para ambos os ensaios ao longo do tempo de fermentação apresentados na figura 32 demonstraram uma disparidade entre as duas cubas ensaio.

A diferença nas concentrações de diacetilo pode ser justificada quer pela maior concentração de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase no ensaio II, quer pela maior temperatura de fermentação nesse mesmo ensaio. A produção e remoção de diacetilo é dependente da temperatura. Um aumento da temperatura de fermentação leva ao aumento da produção de diacetilo, mas também ao aumento da sua remoção.<sup>72</sup>



**Figura 32:** Representação das determinações das concentrações de diacetilo ao longo da fermentação da Cerveja D com adição da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase.

A utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase permitiu reduzir a taxa de redução de diacetilo para a Cerveja D. Para o Ensaio I a taxa de redução de diacetilo foi de 11 dias e para o Ensaio II, foi de 4 dias. Qualquer um destes valores era bastante inferior à média da taxa de redução de diacetilo de fermentações geralmente observadas para a Cerveja D. Com base neste valor, e mesmo sem ter sido realizado um ensaio controlo, conclui-se que a utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase permite reduzir o tempo de maturação da Cerveja D.

**Tabela 22:** Resultados das análises realizadas às cubas cilindro cónicas em maturação para a Cerveja D no estudo da utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase.

	Ensaio I	Ensaio II
Extrato Aparente (°P)	3,51	2,26
Atenuação Real %	64	70
pH	4,36	4,35
Coloração (EBC)	19,10	21,20
Amargor (U.A)	29	23

Analisando a tabela 22, verifica-se que comparando os resultados da atenuação real com os resultados da atenuação real limite (tabela 21), o Ensaio I foi o que teve uma maior perda (5,2%), ou seja, a levedura não foi capaz de atingir a atenuação real limite do mosto, verificando alguma dificuldade na fermentação.

Na tabela 22 encontram-se ainda os valores de amargor determinados para os dois ensaios em maturação e, comparando com os valores de amargor determinados em mosto frio (tabela 21), verifica-se uma perda de amargor de 14,7% no Ensaio I e de 17,9% no Ensaio II.

### 3.4 Ensaios com a utilização de um antiespumante

O ensaio da utilização do antiespumante foi realizado várias vezes testando a Cerveja B, de forma a compreender o impacto da sua utilização durante a fermentação e sobretudo na qualidade do produto final

#### 3.4.1 Resultados físico-químicos médios do mosto

Os parâmetros físico-químicos dos mostos frios foram determinados antes da adição do antiespumante. Analisando os resultados médios entre as cubas controlo e ensaio (tabela 23),

conclui-se que existem ligeiras diferenças entre os mostos, que estão diretamente relacionadas com a variabilidade do processo.

**Tabela 23:** Resultados físico-químicos médios do mosto e respetivo desvio padrão para os ensaios da utilização do antiespumante na Cerveja B, e volume de mosto na cuba cilindro cónica.

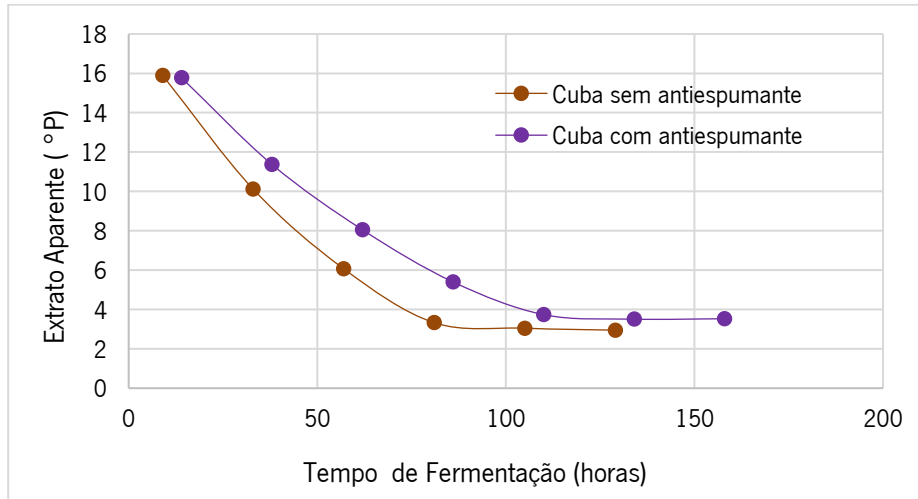
		pH	Coloração (EBC)	Amargor (UA)	Atenuação Real Limite (%)	Volume de Mosto na Cuba (hL)
<b>Controlo I</b>	Média	5,16	15,40	40,67	71,00	2850
	Desvio Padrão	0,02	1,08	1,53	0,00	
<b>Ensaio I</b>	Média	5,12	15,27	39,33	71,00	2850
	Desvio Padrão	0,03	1,03	2,31	0,00	
<b>Ensaio II</b>	Média	5,03	17,03	40	66,00	2850
	Desvio Padrão	0,02	0,42	-	-	
<b>Controlo III</b>	Média	5,12	14,57	39,00	71,00	2700
	Desvio Padrão	0,02	0,81	-	-	
<b>Ensaio III</b>	Média	5,11	16,43	39,00	71,25	3000
	Desvio Padrão	0,02	1,06	2,16	0,5	
<b>Controlo IV</b>	Média	5,08	16,50	36,75	72,00	2811
	Desvio Padrão	0,02	0,28	1,50	0,00	
<b>Ensaio IV</b>	Média	5,10	17,55	38,25	71,75	2982
	Desvio Padrão	0,02	1,89	3,30	0,50	

Relativamente aos volumes de mosto nas cubas, as cubas ensaio, às quais foi adicionado o antiespumante, possuíam um maior volume de mosto, com exceção do Ensaio I que tinha um volume igual ao Controlo I. Mostrou-se assim que a adição de antiespumante permite aumentar o volume de mosto na cuba aumentando a sua capacidade de produção.

### 3.4.2 Resultados de extrato aparente, contagem de células e diacetilo para o Controlo IV e Ensaio IV

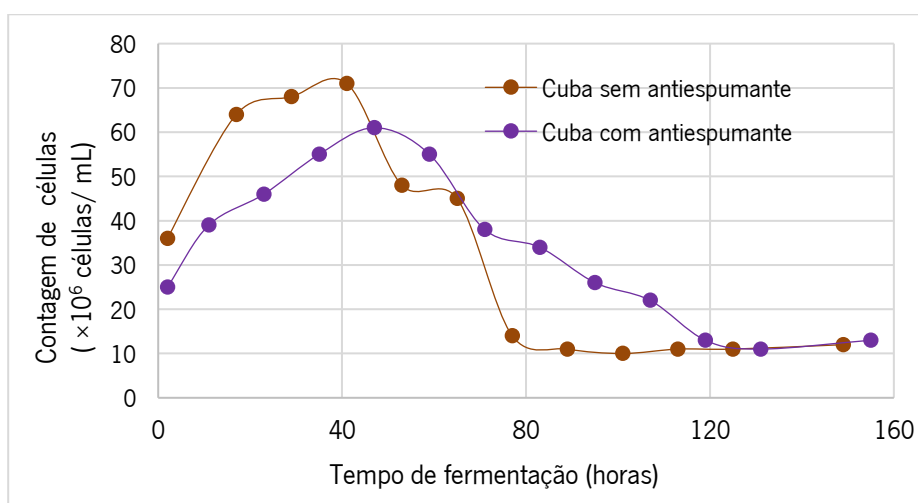
A cuba com antiespumante (Ensaio IV) levou cerca de 29 horas a mais para reduzir o extrato até se verificar uma variação  $\leq 0,1^\circ\text{P}$  entre duas medições consecutivas (figura 33),

pois como já foi dito só quando se obtêm esta diferença, é que se considera que ocorreu a paragem de fermentação. O facto de a fermentação ter demorado mais tempo a terminar poderá dever-se ao maior volume de mosto presente na cuba ensaio.



**Figura 33:** Representação gráfica do efeito da ação do antiespumante na Cerveja B nos resultados de extrato aparente ao longo do tempo de fermentação, no controlo e ensaio IV.

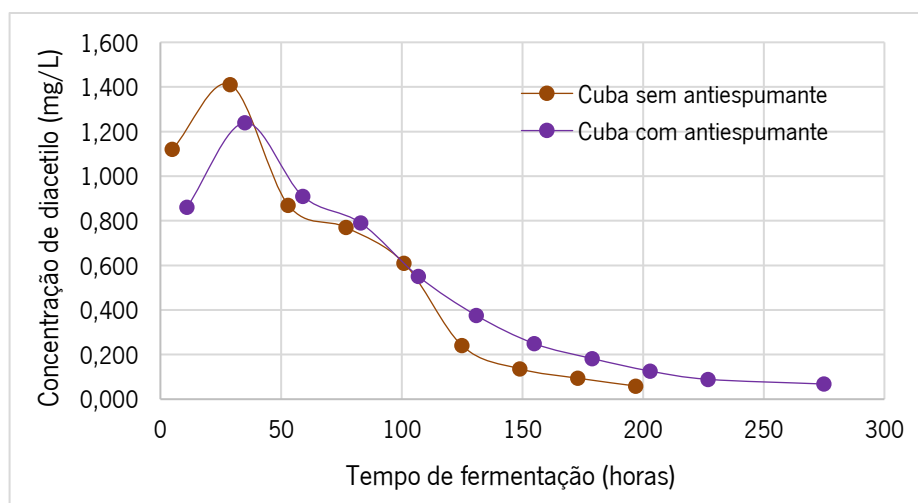
Relativamente à contagem de células de levedura nas cubas controlo e ensaio (figura 34), foram observadas diferenças entre os dois ensaios. Na contagem de células inicial, ou seja, duas horas após o início da fermentação, houve uma diferença de  $11 \times 10^6$  células/mL, sendo a cuba controlo aquela que apresenta maior contagem de células ( $36 \times 10^6$  células/mL).



**Figura 34:** Representação gráfica da contagem de células de levedura no estudo da utilização do antiespumante na Cerveja B ao longo da fermentação para a cuba controlo e ensaio IV.

Quanto ao pico de contagens de células, verificou-se que a cuba controlo foi a que apresentou um pico mais elevado, de  $71 \times 10^6$  células/mL, comparativamente à cuba ensaio,  $61 \times 10^6$  células/mL, sendo que a diferença foi semelhante à observada no início da fermentação. Esta diferença deverá estar associada com a quantidade de levedura semeada, pois para as duas cubas foi semeada a mesma quantidade de levedura e a cuba ensaio possuía maior volume de mosto. Para se obter a mesma contagem de células de levedura na cuba ensaio, deveria ter sido semeada uma quantidade de levedura proporcional ao aumento do volume.

A cuba controlo apresentou um pico de diacetilo maior de 1,410 mg/L e necessitou de 197 horas para reduzir a concentração de diacetilo para 0,059 mg/L, enquanto que a cuba ensaio apresentou um pico de 1,240 mg/L e necessitou de 275 horas para obter a concentração de diacetilo de 0,068 mg/L, inferior ao valor referência para a cerveja em estudo (figura 35).



**Figura 35:** Representação gráfica das concentrações de diacetilo para a cuba controlo e ensaio IV no ensaio da utilização do antiespumante na Cerveja B.

Os perfis de diacetilo encontravam-se de acordo com anteriormente analisado, a cuba controlo possuía um maior pico, pois era aquela que apresentava uma maior quantidade de levedura/volume, logo produziu uma maior quantidade de diacetilo, contudo como possuía mais células de levedura/volume também tinha a capacidade de reduzir a concentração de diacetilo mais rapidamente.

### 3.4.3 Resultados físico-químicos das cubas em maturação dos ensaios

A tabela 24, representa as características analisadas nas Cervejas B controlos e ensaios na fase de maturação. Constatou-se que as cubas ensaio, possuíam um valor de extrato aparente superior mais uma vez por causa do maior volume de mosto.

**Tabela 24:** Resultados das análises realizadas às cubas cilindro cónicas em maturação para a Cerveja B no ensaio da utilização do antiespumante, nos diferentes controlos e ensaios.

	Controlo I	Ensaio I	Ensaio II	Controlo III	Ensaio III	Controlo IV	Ensaio IV
Extrato Aparente (°P)	2,85	3,18	3,38	2,9	3,33	2,69	3,10
Atenuação Real (%)	69	68	68	69	68	71	69
pH	4,27	4,35	4,37	4,21	4,35	4,29	4,39
Coloração (EBC)	14,10	14,20	16,00	14,10	16,40	16,00	15,90
Amargor (U.A)	23	28	27	24	27	23	26

Observou-se que relativamente à atenuação real as cubas controlo possuíam maior atenuação real que as cubas ensaio. Analisando a atenuação real limite dos mostos (tabela 23), verifica-se que houve perda de 3% de atenuação para o Controlo I e 4% para o Ensaio I, para o Controlo III foi de 3% e para o Ensaio III de 5% e por fim para o Controlo IV foi de 1,39% enquanto para o Ensaio IV foi de 3,83%. Esta diferença entre o controlo e o ensaio pode ser justificada pela menor contagem de células nas cubas ensaio.

Em relação ao valor de amargor verificou-se o oposto, os ensaios possuíam sempre maior valor de amargor, ou seja, menor perda, comparativamente ao valor inicial do mosto (tabela 23). Para o par de resultados Controlo I - Ensaio I a perda foi de 43% e 29%, respetivamente, para o par Controlo III - Ensaio III foi 38% e 31% e para o par Controlo IV - Ensaio IV 37% e 32%. Isto é nos controlos observou-se uma perda de amargor de cerca de 40% enquanto que nos ensaios a perda foi de apenas cerca de 30%.

A maior parte da perda de amargor nas cubas controlo deve-se ao facto de estas produzirem maior quantidade de espuma durante a fermentação em comparação com as cubas ensaio, às quais é adicionado o antiespumante.



### 3.4.4 Resultados dos produtos acabados dos ensaios

O produto final da Cerveja B controlo e ensaio foi analisado tendo-se verificado que os resultados obtidos nos diferentes parâmetros vão de encontro aos anteriormente observados na fase de maturação, estes resultados encontram-se na tabela 25.

**Tabela 25:** Valores das características analisadas no produto final dos diferentes ensaios e controlos no estudo da utilização do antiespumante na Cerveja B.

	Controlo I	Ensaio I	Ensaio II	Controlo III	Ensaio III	Controlo IV	Ensaio IV
Extrato Aparente (°P)	1,72	1,72	1,80	1,54	1,80	1,47	1,57
Atenuação Real (%)	69	69	69	71	69	71	70
pH	4,29	4,39	4,38	4,23	4,34	4,34	4,38
Coloração (EBC)	8,60	8,20	8,30	8,20	8,00	7,50	8,00
Turvação a 20°C (EBC)	0,49	0,54	0,57	0,36	0,38		
Turvação a 0°C (EBC)	0,51	0,53	0,55	0,37	0,38		
Turvação Total 5 dias (EBC)	1,80	0,50	1,20	0,30	0,30		
Diacetilo C.G. (mg/L)	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02		
Estabilidade de Espuma (s)	261	251	246	258	253	259	254
CO <sub>2</sub> (g/L)	5,20	5,20	5,40	5,20	5,20		
Amargor (U.A)	17	18	16	18	17	16	18

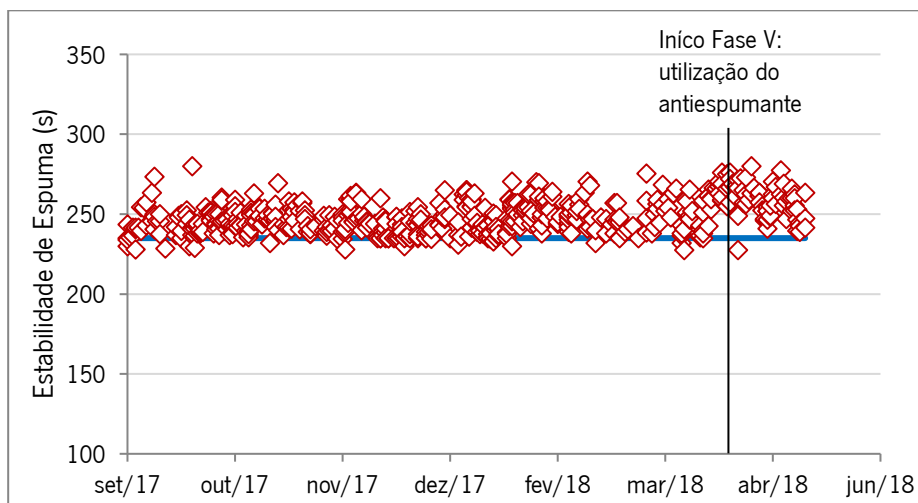
A estabilidade de espuma no produto final dos ensaios, é o parâmetro que requer mais atenção, pois é necessário verificar o impacto da utilização do antiespumante durante a fermentação. Assim, analisando a tabela 25, observa-se que os ensaios possuíram uma menor estabilidade de espuma. No Ensaio I a estabilidade de espuma foi 10 s abaixo do respetivo controlo, enquanto que no Ensaio III e IV a diferença foi de apenas 5 s relativamente aos controlos III e IV. A estabilidade de espuma para o ensaio III foi de 246 s, inferior aos outros ensaios e controlos, contudo encontra-se ainda acima do valor mínimo de referência.

Observando a tabela 26, que representa os resultados da análise sensorial levada a cabo pelo painel de provadores da empresa aos controlos e ensaios da Cerveja B, no estudo da utilização do antiespumante, verificou-se que a nível sensorial não existiram diferenças significativas tendo os controlos e ensaios um perfil aromático satisfatório.

**Tabela 26:** Resultados da análise sensorial realizada aos produtos acabados da Cerveja B no estudo da utilização do antiespumante.

Análise Sensorial		
	Perfil Aromático	Avaliação- Perfil Aromático
Controlo I	-0,60	Satisfatório
Ensaio I	-0,60	Satisfatório
Ensaio II	-0,20	Satisfatório
Controlo III	-0,30	Satisfatório
Ensaio III	-0,30	Satisfatório

Outra etapa do ensaio da utilização do antiespumante diz respeito à adição deste a uma cuba de Cerveja B por semana. A seguir é apresentado um gráfico geral da estabilidade da espuma neste tipo de cerveja de modo a perceber o impacto desta adição.



**Figura 36:** Representação gráfica da estabilidade de espuma da Cerveja B ao longo do tempo.

Analisando a figura 36, verifica-se que com a utilização do antiespumante, a estabilidade de espuma na Cerveja B manteve-se satisfatória, ou seja, acima do valor mínimo de referência, com a exceção de uma determinação.

# 4 Conclusão





O processo cervejeiro é um processo complexo. Várias etapas são requeridas até se obter o produto final com as características desejadas. O principal objetivo deste trabalho foi levar a cabo ensaios que permitissem o aumento da capacidade de produção.

A realização do ensaio de pH teve o intuito de verificar se um pH mais baixo acelerava a redução de diacetilo e diminuir assim o tempo necessário para a maturação. Verificou-se que apesar da influência positiva na redução de diacetilo, o decréscimo de pH conseguido não foi suficiente para se observar uma diferença significativa no tempo de maturação. Em contrapartida, apesar da pouca diferença de pH, denotou-se que com o pH mais baixo foi obtido um valor de amargor inferior no mosto frio, o que não é desejável.

A otimização da receita da Cerveja A com a alteração da base de cerveja, originou um produto final indiferenciável a nível sensorial do original, pois não foi detetada diferença pelo painel de provadores. Esta otimização permitiu aumentar a capacidade de produção por utilizar uma base de cerveja mais disponível na adega. Assim, não há necessidade de se produzir uma base de cerveja especialmente para se obter a Cerveja A, o que permite libertar mais cubas na adega.

O teste da utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase mostrou-se eficaz na redução do tempo de maturação necessário para se obter uma concentração de diacetilo não perceptível a nível sensorial. Na Cerveja B, o Controlo, necessitou de mais 30 h do que o Ensaio para reduzir a concentração de diacetilo até ao valor desejado. Contudo o Ensaio demorou mais 42 h a reduzir o extrato aparente do que o Controlo, podendo ter existido impacto da presença da enzima na levedura. Além disso, a contagem de células de levedura inicial também apresentava diferenças. A nível dos resultados físico-químicos na maturação e no produto final não se verificaram diferenças significativas, entre o controlo e o ensaio, com a exceção da atenuação real quando comparada com a atenuação real limite. Relativamente à análise sensorial, o ensaio teve um resultado de estabilidade organolética não suficientemente satisfatório, por isso, seria necessário repetir o ensaio da utilização da enzima na cerveja B, para comprovar este resultado.

A utilização da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase na Cerveja C, mostrou-se bastante eficaz na redução do tempo de maturação. Permitiu alcançar a concentração de diacetilo pretendida durante a fermentação. Se só fosse necessário corrigir este parâmetro esta cerveja não necessitaria de tempo de maturação. Em termos do produto final não foram verificadas diferenças significativas entre a Cerveja C controlo e ensaio.

Na Cerveja D foram realizados dois ensaios com a utilização da solução de enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase, verificou-se que em comparação com tempos de maturação anteriores desta cerveja, a utilização da solução de enzima reduziu muito o tempo de maturação. Foram testadas duas concentrações diferentes e observou-se que uma maior concentração acoplada com uma maior temperatura de fermentação, permitiu um tempo de maturação ainda menor.

No teste com a utilização do antiespumante na Cerveja B verificou-se que este permitiu reduzir a quantidade de espuma formada durante a fermentação e assim aumentar o volume de mosto por cuba. Observou-se ainda que não existiu impacto na análise sensorial do produto final e a estabilidade de espuma se manteve acima do limite mínimo aceitável.

Em suma, a enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase e o antiespumante permitiram aumentar a capacidade de produção nas cervejas testadas. A otimização das receitas, mantendo as mesmas características, mas usando bases de cerveja mais disponíveis, pode também ser uma estratégia para aumentar a capacidade de produção no *Super Bock Group*.

**5 Referências**

**Bibliográficas**





- (1) Super Bock Group <https://www.superbockgroup.com/detalhe/sobre-o-grupo/> (accessed Feb 14, 2018).
- (2) Kunze, W. Beer- the Oldest Drink for the Common Man. In *Techonology Brewing and Malting*, VLB Berlin: Berlin, 2004; pp 19–31.
- (3) EBlinger, H. A Comprehensive History of Beer Brewing. In *Handbook of Brewing: processes, techonology, markets*; Wiley-VCH, 2009; pp 1–42.
- (4) Hornsey, I. Ancient Egypt. In *A history of Beer and Brewing*, The Royal Society of Chemistry, 2003; pp 32–74.
- (5) Harrison, M. A.; Albanese, J. B. Beer/Brewing. *Ref. Modul. Life Sci.* **2017**, 1–11.
- (6) Boulton, C. Beer. In *Encyclopaedia of Brewing*, John Wiley & Sons, Ltd., 2013; pp 53–60.
- (7) Ronnie, W. The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation. In *Handbook of Food Products Manufacturing*, Y.H.Hui, Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2007; pp 443–506.
- (8) Kunze, W. Raw Materials. In *Techonology Brewing and Malting*, VLB Berlin: Berlin, 2004; pp 32–96.
- (9) Bamforth, C. W. New Bewing Techonologies: Setting the Scene. In *Brewing: New Technologies*, Bamforth, C., Ed.; Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2006; pp 1–9.
- (10) Cevada e Malte <http://www.classificacaovegetal.com.br/produto/cevada-e-malte/> (accessed Sep 27, 2018).
- (11) Boulton, C. Quain, D. The Brewing Process. In *Brewing Yeast and Fermentation*; Blackwell Science Ltd, 2001; pp 19–68.
- (12) Taylor, D. Water. In *Handbook of Brewing*, CRC Press, 2018; pp 67–105.
- (13) Kavalier, A. R.; Pitra, N. J.; Koelling, J. M.; Coles, M. C.; Kennelly, E. J.; Matthews, P. D. Increase in Cone Biomass and Terpenophenolics in Hops (*Humulus Lupulus* L .) by Treatment with Prohexadione-Calcium. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6720–6729.
- (14) Lupulagem Avançada III <http://www.cervejahrenrikboden.com.br/lupulagem-avancada-iii/> (accessed Sep 27, 2018).
- (15) Almaguer, C.; Schönberger, C.; Gastl, M.; Arendt, E. K.; Becker, T. *Humulus Lupulus* - a Story That Begg to Be Told. A Review. *J. Inst. Brew.* **2014**, *120*, 289–314.
- (16) Bamforth, C. W. Yeast. In *Brewing Materials and Processes A Practical Approach to Beer*

- Excellence*; Elsevier, 2016; pp 77–96.
- (17) Stewart, G. G.; Hill, A. E.; Russell, I. Developments in Brewing and Distilling Yeast Strains. *J. Inst. Brew.* **2013**, *119*, 202–220.
- (18) Bamforth, C. Goddisgoode: Yeast and Fermentation. In *Beer: Tap into the Art and Science of Brewing*; Oxford University Press, 2003; pp 141–158.
- (19) Powell, C. D.; Quain, D. E.; Smart, K. A. The Impact of Brewing Yeast Cell Age on Fermentation Performance, Attenuation and Flocculation. *FEMS Yeast Res.* **2003**, *3*, 149–157.
- (20) Kunze, W. Wort Production. In *Technology Brewing and Malting*, VLB Berlin: Berlin, 2004; pp 195–366.
- (21) Bamforth, C. Wort and Wort Quality Parameters. In *Brewing Materials and Processes. A practical approach to beer excellence*; Elsevier, 2016; pp 113–121.
- (22) Eblinger, H. M. Wort Production. In *Handbook of Brewing: processes, technology, markets*; Wiley-VCH, 2009; pp 165–202.
- (23) Brandam, C.; Meyer, X. M.; Proth, J.; Strehaiano, P.; Pingaud, H. An Original Kinetic Model for the Enzymatic Hydrolysis of Starch during Mashing. *Biochem. Eng. J.* **2003**, *13*, 43–52.
- (24) Heisel, S. Providing Cereals for Brewing. In *Brewing: New technologies*; Bamforth, C. W., Ed.; Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2006; pp 10–29.
- (25) Jin, Y.; Speers, R. A.; Paulson, A. T.; Stewart, R. J. Barley  $\beta$ -Glucans and Their Degradation During Malting and Brewing. *MBAA Tech. Q.* **2004**, *41*, 231–240.
- (26) Lauter Tun [http://www.sprinkman.com/products/brewing-systems/tanks-and-vessels/lauter-tun#prettyPhoto\[ppgal\]/2/](http://www.sprinkman.com/products/brewing-systems/tanks-and-vessels/lauter-tun#prettyPhoto[ppgal]/2/) (accessed Jul 10, 2018).
- (27) Schneider, J.; Krottenthaler, M.; Back, W.; Weisser, H. Study on the Membrane Filtration of Mash with Particular Respect to the Quality of Wort and Beer. *J. Inst. Brew.* **2005**, *111*, 380–387.
- (28) Barth, R. Wort Separation and Boiling. In *The Chemistry of Beer: The Science in the Suds*; John Wiley & Sons, Inc., 2013; pp 149–160.
- (29) Boulton, C. Encyclopedia of Brewing; Wiley-Blackwell, 2013; pp 650–653.
- (30) Andrews, M. The Brewhouse. In *Brewing: New Technologies*; Bamforth, C., Ed.; Woodhead Publishing Limited and CRC Press, 2006; pp 208–227.

- (31) Kucharczyk, K.; Tuszyński, T. The Effect of Wort Aeration on Fermentation, Maturation and Volatile Components of Beer Produced on an Industrial Scale. *J. Inst. Brew.* **2017**, *123*, 31–38.
- (32) Eblinger, H. Fermentation, Maturation and Storage. In *Handbook of Brewing: processes, technology, markets*; Eblinger, H., Ed.; Wiley-VCH: Alemanha, 2009; pp 207–224.
- (33) Godtfredsen, S. E.; Rasmussen, A. M.; Ottesen, M.; Rafn, P.; Peitersen, N. Occurrence of  $\alpha$ -Acetolactate Decarboxylases among Lactic Acid Bacteria and Their Utilization for Maturation of Beer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1984**, *20*, 23–28.
- (34) Boulton, C.; Quain, D. Yeast Management. In *Brewing Yeast and Fermentation*; Blackwell Science Ltd, 2001; pp 468–509.
- (35) Gibson, B.; Boulton, C.; Wend, B.; Graham, N.; Lawrence, S.; Linforth, R.; Smart, K. Carbohydrate Utilization and the Lager Yeast Transcriptome during Brewery Fermentation. *Yeast* **2008**, *25*, 549–562.
- (36) Stewart, G. G. The Horace Brown Medal Lecture: Forty Years of Brewing Research. *J. Inst. Brew.* **2009**, *115*, 3–29.
- (37) Kunze, W. Beer Production (Fermentation, Maturation and Filtration). In *Technology Brewing and Malting*; VLB Berlin: Berlin, 2004; pp 367–525.
- (38) Bai, F. W.; Anderson, W. A.; Moo-Young, M. Ethanol Fermentation Technologies from Sugar and Starch Feedstocks. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 89–105.
- (39) Willaert, R.; Nevodic, V. Primary Beer Fermentation by Immobilised Yeast- a Review on Flavour Formation and Control Strategies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 1353–1367.
- (40) Kobayashi, M.; Shimizu, H.; Shioya, S. Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* **2008**, *106*, 317–323.
- (41) Petersen, E. E.; Margaritis, A.; Stewart, R. J.; Pilkington, P. H.; Mensour, N. The Effects of Wort Valine Concentration on the Total Diacetyl Profile and Levels Late in Batch Fermentations with Brewing Yeast *Saccharomyces Carlsbergensis*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2004**, *62*, 131–139.
- (42) Peddie, H. Ester Formation in Brewery Fermentations. *J. Inst. Brew.* **1990**, *96*, 327–331.

- (43) Lodolo, E. J.; Kock, J. L. F.; Axcell, B. C.; Brooks, M. The Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* - The Main Character in Beer Brewing. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*, 1018–1036.
- (44) Dvořák, J.; Dostálek, P.; Štěřba, K.; Čejka, P.; Kellner, V.; Čulík, J.; Beinrohr, E. Determination of Total Sulphur Dioxide in Beer Samples by Flow-through Chronopotentiometry. *J. Inst. Brew.* **2006**, *112*, 308–313.
- (45) Ilett, D. R. Aspects of the Analysis, Role and Fate of Sulphur Dioxide in Beer - A Review. *Master Brew. Assoc. Am. Tech. Q.* **1995**, *32*, 213–221.
- (46) Anness, B. J.; Bamforth, C. W. Dimethyl Sulphide- a Review. *J. Inst. Brew.* **1982**, *88*, 244–252.
- (47) Krogerus, K.; Gibson, B. R. Diacetyl and Its Control during Brewery Fermentation. *J. Inst. Brew.* **2013**, *119*, 86–97.
- (48) Wainwright, T. Diacetyl- A Review. *J. Inst. Brew.* **1973**, *79*, 451–470.
- (49) Bamforth, C. W.; Kanauchi, M. Enzymology of Vicinal Diketone Reduction in Brewer's Yeast. *J. Inst. Brew.* **2004**, *110*, 83–93.
- (50) García, A. I.; García, L. A.; Díaz, M. Modelling of Diacetyl Production During Beer Fermentation. *J. Inst. Brew.* **1994**, *100*, 179–183.
- (51) Saerens, S. M. G.; Verbelen, P. J.; Vanbeneden, N.; Thevelein, J. M.; Delvaux, F. R. Monitoring the Influence of High-Gravity Brewing and Fermentation Temperature on Flavour Formation by Analysis of Gene Expression Levels in Brewing Yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 1039–1051.
- (52) Kobayashi, K.; Kusaka, K.; Takahashi, T.; Sato, K. Method for the Simultaneous Assay of Diacetyl and Acetoin in the Presence of  $\alpha$ -Acetolactate: Application in Determining the Kinetic Parameters for the Decomposition of  $\alpha$ -Acetolactate. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, *99*, 502–507.
- (53) Rondags, E.; Stien, G.; Germain, P.; Marc, I. Kinetic Study of the Chemical Reactivity of  $\alpha$ -Acetolactate as a Function of pH in Water, and in Fresh and Fermented Culture Media Used for *Lactococcus Lactis* SPP. *Lactis* BV. *Diacetyllactis* Cultivation. *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 747–752.
- (54) Godtfredsen, S. E.; Otresen, M. Maturation of Beer with  $\alpha$ -Acetolactate Decarboxilase. *Carlsb. Res. Commun* **1982**, *47*, 93–102.

- (55) Dulieu, C.; Moll, M.; Boudrant, J.; Poncelet, D. Improved Performances and Control of Beer Fermentation Using Encapsulated  $\alpha$ -Acetolactate Decarboxylase and Modeling. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 958–965.
- (56) Boulton, C. Fermentation of Beer. In *Brewing: New Technologies*; Bamforth, C. W., Ed.; Woodhead Publishing Limited and CRC Press, 2006; pp 228–253.
- (57) Ryder, D. Processing Aids in Brewing. In *Handbook of Brewing*; CRC Press, 2018; pp 287–327.
- (58) Braun, F.; Hildebrand, N.; Wilkinson, S.; Back, W.; Krottenthaler, M.; Becker, T. Large-Scale Study on Beer Filtration with Combined Filter Aid Additions to Cellulose Fibres. *J. Inst. Brew.* **2011**, *117*, 314–328.
- (59) Howard, G. A. Institute of Brewing Analysis Committee Estimation of the Bitterness of Beer. *J. Inst. Brew.* **1968**, *74*, 249–251.
- (60) Multiple Volume Expansion method <https://wiki.anton-paar.com/en/multiple-volume-expansion-method/> (accessed Oct 5, 2018).
- (61) Método de Análise Para a Determinação de DMS, Álcoois, Ésteres e Acetaldeído Na Cerveja Por Cromatografia Gasosa. Documento interno do Super Bock Group pp 1–7.
- (62) Bishop, L. . Analysis Committee of The European Brewery Convention The Measurement of Total Polyphenols in Worts and Beers. *J. Inst. Brew.* **1972**, *78*, 37–38.
- (63) Jurić, A.; Ćorić, N.; Odak, A.; Herceg, Z.; Tišma, M. Analysis of Total Polyphenols, Bitterness and Haze in Pale and Dark Lager Beers Produced under Different Mashing and Boiling Conditions. *J. Inst. Brew.* **2015**, *121*, 541–547.
- (64) Lie, S. The EBC-Ninhydrin Method for Determination of Free Alpha Amino Nitrogen. *J. Inst. Brew.* **1973**, *79*, 37–41.
- (65) Determinação Do SO<sub>2</sub> Em Cerveja: Sistema Em Fluxo Segmentado (SKALAR). Documento interno do Super Bock Group 2018, pp 1–7.
- (66) Coulter Counter Série Z <https://www.beckman.pt/cell-counters-and-analyzers/z-series-coulter-counter> (accessed Oct 10, 2018).
- (67) Particle and Cell Size and Count Determination - Z2 COULTER COUNTER <https://www.azom.com/equipment-details.aspx?EquipID=1005> (accessed Oct 10, 2018).
- (68) Dulieu, C.; Poncelet, D. Spectrophotometric Assay of  $\alpha$ -Acetolactate Decarboxylase. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 537–542.

- (69) X. Zheng, T. D'Amore, I. R.; Stewart, G. G. Factors Influencing Maltotriose Utilization During Brewery Wort Fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1994**, *52*, 41–47.
- (70) Jones, P; Pamment, N; Breenfield, P. Alcohol Fermentations by Yeasts- The Effect of Environmental and Other Variables. *Process Biochem.* **1981**, *16*, 42–49.
- (71) Martiny, S. The Course of the Anaerobic Alcohol Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae* Simulated through a Mathematical Model of the Glycolysis. *Anal. Stimul. Biochem.* **1972**, *25*, 387–397.
- (72) Krogerus, K.; Gibson, B.; Hytonen, E. An Improved Model for Prediction of Wort Fermentation Progress and Total Diacetyl Profile. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2015**, *73*, 90–99.
- (73) Haukeli, A. D.; Lie, S. Conversion of  $\alpha$ -Acetolactate and Removal of Diacetyl a Kinetic Study. *J. Inst. Brew.* **1978**, *84*, 85–89.
- (74) Verbelen, P. J.; Dekoninck, T. M. L.; Saerens, S. M. G.; Van Mulders, S. E.; Thevelein, J. M.; Delvaux, F. R. Impact of Pitching Rate on Yeast Fermentation Performance and Beer Flavour. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 155–167.
- (75) Boulton, Chris; Quain, D. *Brewing Yeast and Fermentation*; Blackwell Science Ltd, 2001.
- (76) Kunze, W. Finished Beer. In *Technology Brewing and Malting*, VLB Berlin: Berlin, 2004; pp 733–780.
- (77) Olaniran, A. O.; Hiralal, L.; Mokoena, M. P.; Pillay, B. Flavour-Active Volatile Compounds in Beer: Production, Regulation and Control. *J. Inst. Brew.* **2017**, *123*, 13–23.
- (78) Bamforth, C. W. Dimethyl Sulfide - Significance, Origins, and Control. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2014**, *72*, 165–168.
- (79) Hrivňák, J.; Šmogrovičová, D.; Nádaský, P.; Lakatošová, J. Determination of Beer Aroma Compounds Using Headspace Solid-Phase Microcolumn Extraction. *Talanta* **2010**, *83*, 294–296.
- (80) Pires, E. J.; Teixeira, J. A.; Brányik, T.; Vicente, A. A. Yeast: The Soul of Beer's Aroma - A Review of Flavour-Active Esters and Higher Alcohols Produced by the Brewing Yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1937–1949.
- (81) Meilgaard, M. C. Flavor Chemistry in Beer: Part II: Flavor and Flavor Threshold of 239 Aroma Volatiles. *Master Brew. Assoc. Am. Tech. Q.* **1975**, *12*, 151–168.

- (82) Saison, D.; De Schutter, D. P.; Uyttendhove, B.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R. Contribution of Staling Compounds to the Aged Flavour of Lager Beer by Studying Their Flavour Thresholds. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1206–1215.
- (83) Okabe, M.; Katoh, M.; Furugoori, F.; Yoshida, M.; Mitsui, S. Growth and Fermentation Characteristics of Bottom Brewer's Yeast under Mechanical Stirring. *J. Ferment. Bioeng.* **1992**, *73*, 148–152.