



**Universidade de Aveiro**  
2013

Departamento de Química

**Diogo André**  
**Marques Figueira**

**Desenvolvimento de métodos preditivos de análise**





**Universidade de Aveiro**  
2013

Departamento de Química

**Diogo André  
Marques Figueira**

**Desenvolvimento de métodos preditivos de análise**

**Nº Mec.: 46598**

Relatório de estágio apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, no Ramo de Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Engenheira Beatriz Tili Simões Carvalho, do Departamento de Inovação e Desenvolvimento da empresa UNICER Bebidas, S.A. e do Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Aos meus pais, pela sua coragem e bondade  
Às minhas irmãs pelo riso e felicidade transmitida  
À Rita, por tudo.



## **Júri**

### Presidente/President

Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho  
Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

### Vogais/Vogals

Engenheira Beatriz Monica Tili Simões Carvalho (orientadora)  
Gestora de projetos do Departamento de Inovação e Desenvolvimento da empresa UNICER Bebidas, S.A

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva (co-orientador)  
Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo  
Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro



## Agradecimentos

Ao Dr. Tiago Brandão pela oportunidade concedida de realizar um estágio numa empresa conceituada e com décadas de história

À Engenheira Beatriz Carvalho, pelos conselhos, pelas palavras motivadoras quando foram necessárias e acima de tudo pelo conhecimento transmitido. Foi uma honra trabalhar consigo. “Nenhuma tarefa é impossível, nenhum objetivo inatingível.”

Aos restantes elementos do Departamento de Inovação e Desenvolvimento, pessoas conhecedoras e que contribuíram para tornar o estágio uma experiência multidisciplinar e empolgante

Ao Mestre Pedro Carneiro, companheiro inseparável e contribuidor para os trabalhos apresentados neste documento. Os teus ensinamentos mostraram como encarar o futuro de frente, com confiança, e contribuíram para moldar o meu carácter deste dia em diante.

Aos elementos do Laboratório Central da UNICER, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado e que no dia-a-dia do estágio transmitiram o seu conhecimento sem reservas, a sua ética de trabalho e demonstraram como uma empresa e um laboratório acreditado devem funcionar. Um agradecimento especial à Ana Branco, Catarina Lopes e Helena Cunha.

A todas as pessoas com a qual tive o prazer de contactar, porque “o maior valor da UNICER são as suas pessoas”.

Ao Doutor Jorge Saraiva, pelos conselhos, ensinamentos e paciência.

Aos meus pais. Porque o esforço e sacrifício de educar uma criança até se tornar um homem é prova do carinho e do amor paternal que nunca faltou. Porque quando o espírito vacilou sempre estiveram presentes para motivar e para me ajudar a levantar. Porque foram o meu farol e o meu porto de abrigo.

Às minhas irmãs que agora trilham os seus caminhos e que foram as minhas companheiras de viagem e parceiras no riso.

À Rita, porque página à página a nossa história continua a ser escrita, os capítulos continuam a ser compostos e num futuro obscuro e incerto estás sempre presente com palavras doces e animadoras.



**Palavras-chave** *Saccharomyces pastorianus*, aminoácidos, cerveja, mosto, fermentação, performance, EBC

**Resumo** Neste relatório são apresentados os resultados obtidos no estágio que decorreu entre 19/09/2012 e 17/05/2013 na empresa UNICER, Bebidas S.A.. Foram avaliados os efeitos do perfil de aminoácidos na performance fermentativa de 5 mostos produzidos com recurso a sub-lotes de malte industriais de atributos conhecidos. As características de cada um destes sub-lotes de matérias-primas foram correlacionadas, tendo sido identificadas relações estatisticamente significativas entre as características das matérias-primas e do mosto obtido posteriormente. A ocorrência de variações de performance fermentativa entre os mostos com diferentes concentrações de FAN (mg/L) e diferentes perfis de aminoácidos foi analisada e discutida. Verificaram-se valores de atenuação real (%) entre 66,44% e 69,37%, sendo evidente que nenhuma das fermentações terminou prematuramente. Destacou-se a existência de uma relação linear positiva entre a presença de glutamato e aspartato e a produção de etanol. Concluiu-se que a variação de performance fermentativa não é independente do perfil de aminoácidos, estabelecendo-se uma relação entre a presença das classes de aminoácidos no mosto e a performance fermentativa. Com base na literatura existente foram propostos mecanismos para descrever os resultados verificados na fase experimental. Por fim foram discutidas as vantagens de estudos posteriores para a elaboração de critérios de seleção baseados na presença de aminoácidos. Num projeto paralelo, duas instalações de produção foram comparadas, de modo a compreender e registar a influência que diferentes escalas possuem na performance fermentativa. Esta comparação abordou as etapas de produção de mosto, fermentação e filtração. Verificou-se que o mosto obtido à escala industrial apresentou os melhores resultados de performance fermentativa. A produção de mosto otimizada para a instalação piloto obtém resultados em linha com o melhor mosto do teste. A análise de filtrações permitiu concluir que existe uma perda acrescida de características do líquido na filtração à escala piloto, sugerindo-se alterações para melhoria do processo na instalação piloto.



**Keywords**

*Saccharomyces pastorianus*, amino acids, beer, wort, fermentation, performance, EBC

**Abstract**

In this report are presented the results attained in the internship that took place between 19/09/2012 and 17/05/2013 in the facilities of UNICER, Bebidas S.A.. The effects of the amino acid profile in the fermentation performance of 5 worts produced from the constituent lots of industrial malts, whose properties are known, were assessed. The properties of each malt were correlated, and statistically significant relationships between the raw materials and the produced wort were identified. The variations in fermentative performance, between worts with different FAN (mg/L) concentrations and different amino acid profiles, were analyzed and discussed. The values of real degree of fermentation (%) were between 66,44% and 69,37%, therefore there was no evidence of stuck fermentations. A positive linear relationship between ethanol production and the concentration of glutamate and aspartate was verified. It was concluded that the variations in fermentative performance are not independent of amino acid concentration, and a relationship between the presence of the groups of amino acid and fermentative performance was established. Based on the existing scientific literature, mechanisms were proposed in order to describe the experimental results. The advantages of further studies, to define new raw material selection criteria based on amino acid content, were discussed. In a parallel project, two production facilities, one industrial and one pilot, were compared in order to understand and pinpoint the influence that different scales exert on the fermentative performance. The processes of wort production, fermentation and filtration were reviewed. It was verified that the industrial wort achieved the best fermentation performance results. The optimized production of wort in the pilot plant allows results of fermentative performance in line with the best wort of the test. The analysis of the filtrations in different plants showed that there is a higher loss of the characteristics of the fermentation product in the pilot plant than on the industrial plant. Several adjustments were suggested in order to improve the pilot plant process.



## Índice

Índice de Tabelas.....	e
Índice de Figuras.....	h
Índice de ilustrações.....	k
Índice de Abreviaturas.....	l
Nota Introdutória.....	1
Capítulo 1.....	3
Introdução.....	3
1. A UNICER.....	5
1.1 A empresa e o setor de atividade.....	5
1.2 Valores Unicer.....	5
1.3 As marcas.....	6
1.4 A história.....	6
1.5 Sustentabilidade ambiental.....	7
2. Produção de cerveja.....	8
2.1. Matérias-primas.....	8
2.1.1 Cevada.....	8
2.1.2 A água.....	10
2.1.3 O lúpulo.....	11
2.1.4 A levedura.....	11
2.2 O malte.....	13
2.2.1 Produção de malte.....	13
2.3 Produção de mosto.....	15
2.4 Fermentação.....	17
2.4.1 O processo fermentativo.....	17
3. Bioquímica do azoto.....	20

3.1	Metabolismo do azoto.....	20
3.1.1	Utilização do azoto pela levedura.....	20
3.1.2	Perfil de consumo de azoto.....	20
3.1.3	Performance fermentativa e concentração de azoto.....	23
3.2	Métodos de detecção de azoto.....	24
3.2.1	Azoto aminado livre.....	24
3.3	A produção de dicetonas vicinais.....	24
4.	Seleção de malte e performance fermentativa.....	27
4.1	Critérios para a seleção de malte.....	27
4.2	Critérios de seleção com base em compostos azotados.....	27
4.3	Ponto de situação na análise de malte em relacionamento com azoto.....	28
5.	Parâmetros analíticos da indústria cervejeira.....	30
5.1	Métodos analíticos disponíveis na empresa Unicer.....	30
5.1.1	Densidade relativa.....	30
5.1.1	Composição em açúcares fermentáveis.....	30
5.1.2	Determinação da concentração de etanol.....	31
5.1.3	Determinação do grau de atenuação.....	32
5.1.4	Determinação da concentração de dicetonas vicinais.....	32
	Capítulo 2.....	33
1.	O projecto MPA – Métodos Preditivos de Análise.....	35
1.1	Efeito do perfil de aminoácidos na fermentação.....	35
1.2	Seleção de matérias-primas.....	37
1.3	Objectivos.....	37
2.	Materiais e métodos.....	39
2.1	Produção de mosto.....	39
2.1.1	Seleção de matérias-primas.....	39

2.1.2 Fabrico de mosto.....	39
2.2 Fermentações.....	40
2.2.1 Condições de fermentação.....	40
2.3 Métodos analíticos.....	41
3. Resultados e discussão.....	43
3.1 Mostos produzidos.....	43
3.2 Fermentações EBC.....	48
3.3 Análise de perfil de aminoácidos.....	56
4. Conclusões.....	67
Capítulo 3.....	71
1. Comparação entre escalas.....	73
1.1 A instalação piloto.....	73
1.2 O processo industrial.....	75
2. Comparação da produção de mosto e fermentação.....	77
2.1 Materiais e métodos.....	77
2.1.1 Produção de mosto.....	78
2.1.2 Métodos analíticos.....	79
2.2 Resultados e discussão.....	80
2.2.1 Produção de mosto.....	80
2.2.2 Fermentações.....	81
2.2.3 Comparação com fermentações industriais.....	84
2.3 Conclusão da comparação de fermentações.....	85
3. Análise de filtrações.....	87
3.3.1 Materiais e métodos.....	88
3.3.2 Resultados e discussão.....	89
3.3.3 Conclusão.....	91

Considerações finais do estágio .....	93
Bibliografia .....	94
Glossário .....	99
Anexos .....	i
Anexo A.....	i
A.1 .....	i
Anexo B.....	ii
B.1.....	ii
B.2.....	iii
B.3.....	iv
Anexo C.....	v
C.1.....	v
C2.....	vi
C3.....	vii
C4.....	viii
C5.....	ix
C6.....	x
C7.....	xi
Anexo D.....	xii
D.1 .....	xii
D.2 .....	xiii
D.3 .....	xiv

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Componentes do grão de cevada em % (m/m). (2).....	10
Tabela 2 – Passos de um processo de produção de mosto industrial. (2, 8).....	16
Tabela 3 – Composição típica de um mosto. (16).....	17
Tabela 4 – Classes de aminoácidos do mosto em função da ordem de assimilação durante a fermentação (23, 24) .....	21
Tabela 5 – Aminoácidos do mosto separados por classes em função do efeito na produção de compostos organoleticamente importantes (23) .....	22
Tabela 6 – Elementos de análise do azoto.(2, 7, 37, 42, 45, 46) (1) Mostos com 12 °P; (2) Mostos com valores entre 14-18 °P.....	28
Tabela 7 – Correlações existentes entre os parâmetros de quatro maltes de diferentes estirpes de cevada. (13).....	29
Tabela 8 – Alguns dados adaptados de Lekkas (2007) (22).....	35
Tabela 9 – Informação do malte utilizado para a produção de mosto para este trabalho.....	39
Tabela 10 – Principais características dos mostos produzidos. Os resultados de FAN (mg/L) do mosto foram obtidos com uma taxa de recuperação de 93%.....	43
Tabela 11 – Concentração de aminoácidos dos mostos utilizados neste trabalho. A divisão por classes foi realizada segundo a classificação de Jones e Pierce (1967) (24) ....	44
Tabela 12 – Resultado da análise dos mostos produzidos na instalação piloto relativamente à presença de iões e ácido oxálico. ....	45
Tabela 13 – Coeficiente de produto momento de Pearson (r), existente entre análises realizadas às matérias-primas e as análises realizadas aos mostos obtidos. ....	47
Tabela 14 – Resultado da análise de resultados para determinar as fases de desenvolvimento das fermentações realizadas .....	52
Tabela 15 – Dados de desenvolvimento da biomassa na fase exponencial, verificados na série 2, obtidos a partir do tratamento de dados da variação da biomassa ...	52
Tabela 16 – Percentagem final de viabilidade celular.....	53

Tabela 17 – Resultados finais das fermentações realizadas. A determinação de FAN foi realizada com 91% de taxa de recuperação. ....	54
Tabela 18 – Cálculo do coeficiente de produto momento de Pearson (r) de forma a definir a extensão de uma relação linear entre os resultados finais das fermentações. ....	58
Tabela 19 - Cálculo do coeficiente de produto momento de Pearson (r) de forma a definir a extensão de uma relação linear entre concentração inicial de aminoácidos e resultados finais das fermentações.....	60
Tabela 20 – Principais diferenças entre o perfil de aminoácidos de Pewter relativamente aos restantes mostos. ....	64
Tabela 21 – Principais diferenças entre o perfil de aminoácidos de Prestige relativamente aos restantes mostos. ....	64
Tabela 22 - Principais diferenças entre o perfil de aminoácidos de Braemar relativamente aos restantes mostos. ....	64
Tabela 23 – Resumo das características de produção e fermentação dos mostos em estudo .....	77
Tabela 24 – Principais diferenças entre os diagramas utilizados para a produção de mosto.....	78
Tabela 25 – Resultados das análises realizadas aos mostos produzidos na instalação piloto. ....	80
Tabela 26 – Resultados das análises de FAN a mostos laboratoriais das matérias-primas e variação de FAN relativamente à análise das matérias-primas utilizadas.. ....	81
Tabela 27 – Resultados finais da fermentação dos mostos produzidos .....	83
Tabela 28 – Análise pré-filtração e análise pós-filtração. ....	89
Tabela 29 - Resultados da avaliação e caracterização organolética do produto final. ....	91
Tabela 30 – Características dos estudos do consumo de aminoácidos. (24, 25, 28) i	
Tabela 31 – Lotes de malte utilizados no projecto MPA. ....	v
Tabela 32 – Descrição da avaliação numérica atribuída pelo painel de provadores .....	xii
Tabela 33 – Tabela com a terminologia recomendada pela EBC para descrever sensações de aroma/gosto.....	xiii

Tabela 34 – Tabela com a terminologia simplificada para descrever as sensações de aroma/gosto.....xiv

## Índice de Figuras

Figura 1 – Principais marcos da história da empresa Unicer.....	7
Figura 2 – Esquema de um corte longitudinal de um grão de cevada (7) .....	9
Figura 3 - Diagrama de um corte transversal de um grão de cevada (7).....	9
Figura 4 – Variação de temperatura e humidade ao longo do tempo durante a secagem de um malte claro (8) .....	14
Figura 5 – Exemplo de um diagrama de fermentação lager. (9).....	19
Figura 6 – Metabolismo de produção e degradação de dicetonas vicinais. (39) ...	25
Figura 7 – Variação da concentração de dicetonas vicinais (VDK) ao longo de uma fermentação. (7) .....	26
Figura 8 – Efeito de diferentes processos de maltagem no conteúdo de aminoácidos de um malte com origem na variedade Copeland. (13).....	29
Figura 9 – Variação do conteúdo de FAN durante a maltagem de duas estirpes de cevada, Puffin e Chariot. Adaptado de (47) .....	29
Figura 10 – Valores de concentração de dicetonas vicinais e $\alpha$ -acetohidróxidos no fim de três fermentações: controlo, suplementada com lisina e suplementada com metionina. (22).....	36
Figura 11 – Esquema de um reator EBC. Adaptado de (51) .....	41
Figura 12 – Variação da concentração de extrato aparente (°P) nas 6 fermentações realizadas.....	49
Figura 13 - Pormenor da variação da concentração de extrato aparente (°P) no final das fermentações.....	49
Figura 14 – Variação da concentração de etanol nas 6 fermentações realizadas...50	
Figura 15 - Pormenor da variação da concentração de etanol (%v/v) no final das fermentações.....	50
Figura 16 – Variação da atenuação real (%) nas 6 fermentações realizadas .....	51
Figura 17 – Pormenor da variação da atenuação real (%) no final das fermentações.....	51
Figura 18 - Variação da concentração de biomassa (milhões de células/mL) da 2ª série de fermentações, avaliada recorrendo a um Coulter Counter. ....	52

Figura 19 – Variação da percentagem de viabilidade celular, através da representação da percentagem de células inviáveis, durante as últimas 167,5 horas de fermentação, aproximadamente 7 dias.....	53
Figura 20 – Representação gráfica dos resultados finais das fermentações realizadas.....	55
Figura 21 - Representação gráfica dos resultados finais das fermentações realizadas.....	55
Figura 22 – Perfil global de aminoácidos..	56
Figura 23 – Distribuição da concentração de aminoácidos pelas diferentes classes de aminoácidos. ....	57
Figura 24 – Variação, em percentagem, do perfil de aminoácidos de cada mosto. ....	63
Figura 25 - Variação, em percentagem, do perfil de aminoácidos de cada mosto.	63
Figura 26 – Esquema das correntes existentes no interior de um equipamento whirlpool. (2).....	75
Figura 27 – Gráfico exemplo de um diagrama de produção de mosto.....	79
Figura 28 – Resultados do consumo de extrato e de produção de etanol para dois dos mostos analisados. ....	82
Figura 29 – Dados de variação de percentagem de atenuação e contagem de células nas fermentações dos mostos em análise.....	82
Figura 30 - Especificações para malte de uma empresa produtora.....	ii
Figura 31 - Tabela com especificações utilizadas para seleção de malte. (42) .....	iii
Figura 32 – Comparação da concentração de aminoácidos entre maltes com diferentes níveis de cor. A cor dos maltes é crescente da esquerda para a direita. (81) .....	iv
Figura 33 - Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (%v/v) verificados na fermentação Pewter. ....	vi
Figura 34 - Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Pewter. ....	vi
Figura 35 - Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (%v/v) verificados na fermentação Esterel. ....	vii
Figura 36 - Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Esterel. ....	vii

Figura 37 - Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (% v/v) verificados na fermentação Composto. ....	viii
Figura 38 - Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Composto. ....	viii
Figura 39 - Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (% v/v) verificados na fermentação Braemar.....	ix
Figura 40 - Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Braemar.....	ix
Figura 41 – Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (% v/v) verificados na fermentação Prestige .....	x
Figura 42- Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Prestige .....	x
Figura 43 – Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (% v/v) verificados na fermentação Teste .....	xi
Figura 44 – Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Teste.....	xi

## Índice de ilustrações

Ilustração 1 – Imagens de microscopia de leveduras de fermentação de topo (à esquerda) e de fermentação baixa (à direita). Magnificação de 640 vezes. (8).....	12
Ilustração 2 – Reatores EBC utilizados neste trabalho.....	41
Ilustração 3 – Caldeira de empastagem/cuba filtro .....	74
Ilustração 4 – Caldeira de caldas/caldeira de ebulição.....	74
Ilustração 5 - Whirlpool.....	74
Ilustração 6 – Filtro horizontal de placas verticais utilizado na produção de mosto na UNICER. ....	76
Ilustração 7 – Fotografia do filtro horizontal de placas verticais existente na instalação piloto .....	88

## Índice de Abreviaturas

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FAN	<i>Free amino nitrogen</i> ou azoto aminado livre
HGB	<i>High gravity brewing</i>
E <sub>app</sub>	Extrato aparente (°P)
E <sub>r</sub>	Extrato real (°P)
d <sub>r</sub>	Densidade do resíduo (g/cm <sup>3</sup> )
d <sub>a</sub>	Densidade da amostra(g/cm <sup>3</sup> )
d <sub>h</sub>	Densidade da água (g/cm <sup>3</sup> )
SG	Densidade relativa a 20°C
RDF	<i>Real degree of fermentation</i> ou atenuação real
IP	Instalação piloto

## **Nota Introdutória**

O estágio que deu origem a este relatório foi realizado na empresa UNICER Bebidas, S.A., sediada em Leça do Balio, distrito do Porto. Como empresa líder de mercado e com mais de um século de história, a UNICER já desenvolveu inúmeros projetos de investigação e desenvolvimento, levando a empresa à dimensão que possui nos dias de hoje. Ao longo deste percurso foi desenvolvido um espólio imaterial muito valioso na forma de conhecimento adquirido. Desta forma, para salvaguardar os interesses da empresa, foram propositadamente omitidos dados que colocariam em causa o segredo industrial. A discussão de dados de alguns elementos neste relatório foi realizada de forma comparativa, no entanto, todos os métodos utilizados encontram-se adequadamente descritos.

Este trabalho tem o título de “Desenvolvimento de métodos preditivos de análise”. Como complemento à informação deste elemento indica-se o subtítulo: “Análise de parâmetros de seleção de matérias-primas e estudos comparativos na indústria cervejeira”.

O trabalho descrito no capítulo 2 deste relatório é a continuação de um projecto iniciado em Janeiro de 2012 pelo mestre Pedro Carneiro, entre outros colaboradores UNICER, que continua ligado ao projeto e a trabalhar para a sua continuidade. O primeiro passo foi a selecção de matérias-primas e a produção de mostos na instalação piloto, bem, como a análise de aminoácidos e iões.

Destaca-se também que os trabalhos apresentados neste relatório tiveram como base o trabalho de equipa e o esforço comum.



# **Capítulo 1**

## **Introdução**



## 1. A UNICER

### 1.1 A empresa e o setor de atividade

A Unicer Bebidas, S.A. é a maior empresa portuguesa do setor das bebidas em Portugal. Este título sustenta-se pelas posições dominantes que a empresa possui nos negócios da cerveja e da água engarrafada. A empresa também se encontra presente no segmento dos vinhos e refrigerantes. A representação no setor do turismo é feita através da propriedade de dois ativos na região de Trás-os-Montes: o hotel Vidago Palace e o spa&nature park Pedras Salgada.

A presença da empresa no setor de produção de malte, através da empresa Maltibérica, reforça a importância do negócio da cerveja na atividade comercial. A Maltibérica, que se localiza em Poceirão, no concelho de Palmela, e próxima do porto de Setúbal, pretende garantir uma elevada qualidade no malte que produz e, simultaneamente, estimular a produção de cevada dística em Portugal.

A Unicer é uma empresa de capital maioritariamente português que se reparte por dois grandes grupos acionistas: o grupo Viacer, constituído pelas empresas BPI, Arsopi e Violas, possui 56% da participação na empresa enquanto o grupo Carlsberg possui os restantes 44%.

Segundo o Relatório de Sustentabilidade de 2011, a Unicer apresenta um volume de vendas de 485 milhões de euros, e emprega cerca de 1500 pessoas. Estes números demonstram a importância que a empresa possui não só na economia local como também na economia nacional. (1)

### 1.2 Valores Unicer

Visão: “Onde quer que estejamos a Unicer e as nossas marcas serão sempre a primeira escolha”

Missão:

- Conquistarmos a preferência dos Consumidores para as nossas Marcas;
- Sermos o parceiro preferido dos nossos Clientes;
- Obtermos o reconhecimento e valorização adequados por parte da Comunidade;
- Garantirmos a remuneração e a confiança dos nossos acionistas;

### 1.3 As marcas

As marcas do portefólio Unicer são reconhecidas internacionalmente, sendo distribuídas em 50 países, com especial destaque para os países de língua oficial portuguesa.

Do variado portefólio de marcas da Unicer destacam-se as seguintes:

- Cervejas: Super Bock, Super Bock Stout, Super Bock Sem Álcool, Super Bock Abadia Gourmet, Super Bock Classic, Super Bock Green, Super Bock Abadia, Cheers, Carlsberg, Cristal, Clock, Marina, Kronenburg, Gimbergen Blond.
- Águas: Vitalis, Vitalis Sabores, Caramulo, Água das Pedras, Água das Pedras Levíssima, Água das Pedras Sabores, Vidago e Melgaço.
- Refrigerantes: Frutis Natura, Frutis, Frutea Ice Tea, Frisumo, Guaraná Brasil, Snappy.
- Vinhos: Quinta do Minho, Campo da Vinha, Porta Nova, Vinha das Garças, Vinha de Mazouco, Vinha de Mazouco Reserva, Planura, Planura Reserva, Planura Syrah, Monte Sacro, Vini , Vini Sangria e Tulipa.
- Sidras: Somersby.

A Super Bock, além de ser a cerveja portuguesa mais consumida em todo o mundo possuiu, em 2010, uma quota de mercado interno de 49% num volume de consumo de 590 milhões de litros, e uma percentagem de produto para exportação de 40%, isto é, 4 em cada 10 litros de cerveja produzidos foram dedicados ao mercado externo, dos quais o mais importante, com 60% deste volume, é Angola.

A Vini Sangria, produto que entrou no mercado em 2010 no formato de barril, foi considerado “Sabor do Ano” em 2010 e 2011. Hoje, fruto da inovação e desenvolvimento que caracteriza esta empresa, existe também no formato de lata 0,5L.

### 1.4 A história

A empresa que hoje em dia é conhecida como Unicer teve origem em Março de 1890, com a constituição, por escritura, da Companhia União Fabril Portuense das Fábricas de Cerveja e Bebidas Refrigerantes, também conhecida pela sigla CUFP. Esta empresa dedicava-se à produção de cervejas, refrigerantes e “licores e outras bebidas”.

A inauguração da unidade de produção da Via Norte, em Leça do Balio, local onde ainda hoje se encontram as instalações da empresa, ocorreu em Setembro de 1964. Em Junho de 1990 a Unicer, então denominada União Cervejeira, S.A., é privatizada, ficando todo o seu capital entregue ao setor privado. Em 2001 a Unicer – Bebidas de Portugal, S.A. assumiu o nome que perdura até hoje.

A Figura 1 mostra os principais pontos da história da empresa.

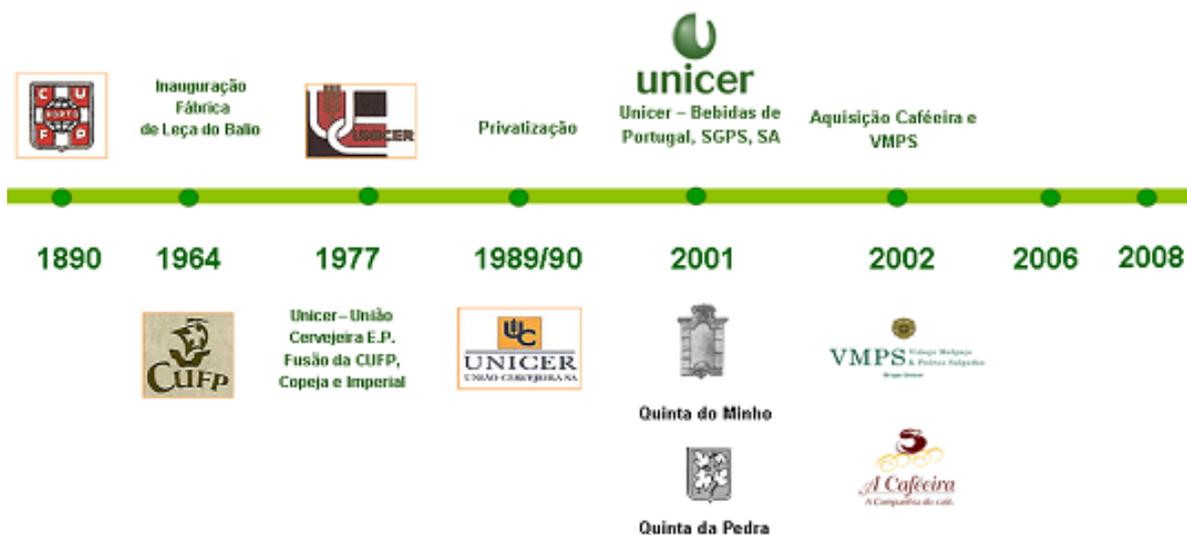


Figura 1 – Principais marcos da história da empresa Unicer.

### 1.5 Sustentabilidade ambiental

A Unicer é uma empresa com um elevado sentido de responsabilidade ambiental e enceta esforços para melhorar a sua relação com o meio ambiente. Para que isto aconteça, é promovida:

- a prevenção e o controlo integrados da poluição
- a ecoeficiência de processos e produtos através do uso sustentável de água e utilização racional de energia
- a minimização de impactos ambientais, promovendo a redução de emissões poluentes e privilegiando soluções de reutilização e valorização.

Estas políticas tiveram como resultado direto uma redução de 18% no consumo total de energia, de 12% no consumo de água e de 19% na libertação de gases com efeito de estufa. Além disto, cerca de 95% dos resíduos gerados são encaminhados para processos de valorização. Estes dados mostram porque é que a Unicer é uma das empresas cervejeiras mais eficientes e conscientes do grupo Carlsberg. (1)

## 2. Produção de cerveja

### 2.1. Matérias-primas

A cerveja é produzida recorrendo a quatro matérias-primas essenciais: cevada, água, levedura e lúpulo. As características e a qualidade de cada uma têm a capacidade de influenciar decisivamente o produto final, podendo contribuir para os atributos próprios de uma determinada cerveja ou, por outro lado, torná-la pouco apelativa ao consumidor.(2)

#### 2.1.1 Cevada

A cevada (*Hordeum vulgare*) é considerada pela FAO um dos mais importantes cultivares do século XXI, sendo utilizada principalmente para alimentação animal, para a produção de cerveja e como alimento. (3) Fisiologicamente, a cevada é classificada em dois tipos, que possuem propriedades diferentes:

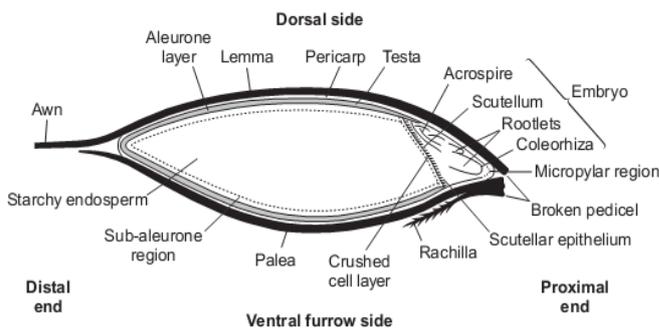
- 1) Cevada de Inverno, cujas sementes são plantadas em meadas de Setembro e possuem período de maturação de cerca de 10 meses e possuem uma produtividade de cerca de cerca de 6 t/ha. São mais resistentes ao frio mas têm necessidades nutricionais acrescidas;(2)
- 2) Cevada de Primavera, cujas sementes são plantadas em Março e Abril e possuem um período de maturação de cerca de 5 meses, com uma produtividade de cerca de 4 t/ha. São mais susceptíveis a efeitos indesejáveis por consequência de baixas temperaturas, no entanto possuem necessidades nutricionais mais modestas.(2)

Os diferentes tempos de maturação entre os dois tipos de cevada descritos refletem-se na produtividade anual por área de cultivo, isto é, quanto maior o tempo de maturação maior a produtividade. Este aumento de produtividade encontra-se na ordem das duas toneladas por hectare entre as duas variedades. (2, 4)

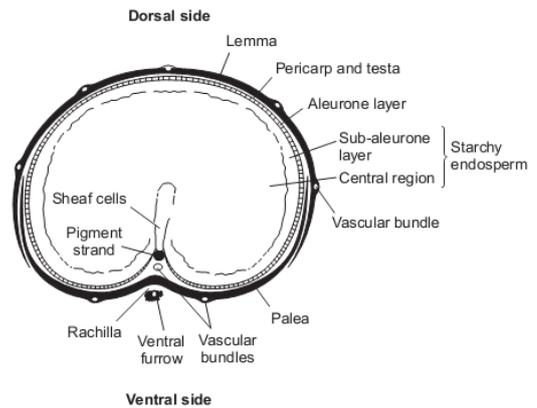
A cevada, além de ser classificada em função do momento da sementeira, também é taxonomicamente avaliada em subespécies. As subespécies mais importantes na indústria cervejeira são a *Hordeum vulgare subs.distichon* ou cevada dística e *Hordeum vulgare subs hexastichon*, cevada hexástica. A separação nestas duas subespécies em particular deve-se a características morfológicas da espiga, verificando-se espigas planas com duas carreiras ou espigas cilíndricas com seis carreiras, respetivamente. A cevada de duas

carreiras produz apenas um grão por nódulo, enquanto a cevada de seis carreiras tem a capacidade de produzir até três grãos. (5, 6)

A cevada, após processamento adequado, é o componente que fornece todos os nutrientes e elementos necessários para a fermentação do caldo fermentativo, denominado de mosto. (2, 7, 8) Esta matéria-prima é um cereal, o que significa que se trata de um elemento que permite a reprodução da planta que lhe dá origem. A sua estrutura garante que o embrião possua todos os elementos necessários para a germinação. As Figuras 2 e 3 são representações esquemáticas do grão de cevada. (8)



**Figura 2 – Esquema de um corte longitudinal de um grão de cevada (7)**



**Figura 3 - Diagrama de um corte transversal de um grão de cevada (7)**

Os grãos de cereais são elementos complexos envoltos por um órgão chamado envelope da semente (testa), que protege o embrião e o endosperma. O endosperma encontra-se diferenciado pela camada de aleurona e inclui a região de sub-aleurona e o endosperma amídico interno. Os tecidos embriônicos encontram-se na parte basal do grão e compreendem o escutelo, um tecido de apoio e o embrião. Estes são os componentes principais do grão de cevada.(8)

O pericarpo, uma pele resistente, e o envelope da semente condicionam a absorção de água e são os responsáveis pela protecção das regiões internas de contaminação. A sua constituição consiste principalmente em polímeros como a celulose, hemicelulose, lenhina e algumas proteínas. (2, 8)

Durante o desenvolvimento do grão do cereal, as células do endosperma diferenciam-se em dois tipos de tecidos distintos: a camada de aleurona e o endosperma amídico. Os corpos de inclusão existentes nas células da camada de aleurona contêm, principalmente, fitina, proteínas, compostos proteínas-hidratos de carbono e alguns lípidos. (2, 8)

Depois de entrar em contacto com água, e de se estabelecer o início da germinação, a camada de aleurona liberta enzimas hidrolíticas de modo a converter as proteínas de reserva e os grânulos de amido do endosperma em açúcares e aminoácidos. Estes servem de nutrientes ao embrião, tratando-se por isso do ponto de partida da atividade enzimática durante a maltagem.(8)

O endosperma amídico contém a maioria dos polímeros de reserva. Este elemento representa o corpo de maior massa celular do grão, e é constituído principalmente por amido, que é sintetizado no interior de amiloplastos. As paredes celulares destas células possuem quantidades consideráveis de  $\beta$ -glucanas (80%) e arabinoxilanas (20%). A espessura das paredes celulares, que se encontram separadas entre si por uma lamela média, de composição proteica, é dependente de características como a variedade e as condições de crescimento da planta. A cevada utilizada na indústria cervejeira possui caracteristicamente paredes celulares mais finas que a cevada utilizada na alimentação animal: trata-se de um fator relevante para a capacidade produtiva da cerveja a partir do malte, pois cria obstáculos à hidrólise de substâncias de reserva. (2, 8)

A composição em matéria seca da cevada encontra-se descrita na Tabela 1. Como é possível verificar, a porção de hidratos de carbono é a mais relevante em termos quantitativos, no entanto, cada componente é diferente e desempenha diferentes funções no processamento e utilização do grão.

**Tabela 1 – Componentes do grão de cevada em % (m/m). (2)**

<b>Componente</b>	<b>%(m/m)</b>
<b>Hidratos de carbono totais</b>	70.0 – 85.0
<b>Proteínas</b>	10.5-11.5
<b>Matéria Inorgânica</b>	2.0-4.0
<b>Gordura</b>	1.5-2.0
<b>Outras substâncias</b>	1.0-2.0

### **2.1.2 A água**

A água é, naturalmente, um elemento de extrema importância no processo cervejeiro. As suas características, como a dureza, o pH, e os iões dissolvidos influenciam as características do produto final de tal forma que algumas cervejas se tornaram reconhecidas devido à especificidade da água que é utilizada na sua produção. De um

ponto de vista tecnológico, a água é o elemento que permite que todas as reacções biológicas ocorram: favorece a germinação da cevada no fabrico do malte, permite que ocorra a empastagem da farinha de malte e dos adjuntos de fermentação na qual ocorrem os principais processos enzimáticos e é o principal componente do caldo fermentativo na qual a levedura realiza a conversão de mosto para cerveja. (8)

### **2.1.3 O lúpulo**

O lúpulo, de nome científico *Humulus lupulus*, é o componente que confere o aroma e sabor característico da cerveja. O aroma é conferido pelos componentes voláteis do lúpulo enquanto o sabor é conferido pelos componentes não voláteis. Os componentes de maior relevância industrial são  $\alpha$ -ácidos e os  $\beta$ -ácidos contidos na resina do lúpulo. A maior contribuição para o amargor da cerveja é proveniente da presença de iso- $\alpha$ -ácidos solúveis, que são obtidos através da isomerização de  $\alpha$ -ácidos a elevadas temperaturas. Os iso- $\alpha$ -ácidos apresentam atividade bacterioestática, o que contribui para a criação de um ambiente hostil ao desenvolvimento de microrganismos contaminantes durante a fermentação. (2, 8, 9)

### **2.1.4 A levedura**

A globalidade da indústria cervejeira utiliza um conjunto alargado de estirpes para realizar as fermentações, no entanto, de uma forma geral, estas estirpes podem ser agregadas em dois grupos principais considerando como critério distintivo o seu comportamento de floculação:

- Leveduras de fermentação alta, ale e weiss, do qual é exemplo a *Saccharomyces cerevisiae*. Caracteristicamente estas leveduras sobem para o topo do recipiente de fermentação durante a mesma. As temperaturas de fermentação situam-se entre os 18°C e 24°C. Verifica-se que este tipo de leveduras forma cadeias de células interligadas, efeito que é resultado de um período maior de ligação à célula mãe após o processo de gemulação. (2, 9, 10)

- Leveduras de fermentação baixa, lager, do qual é exemplo a *Saccharomyces carlsbergensis*. No fim da fermentação, as leveduras deste grupo acumulam-se no fundo do recipiente onde ocorre a fermentação. Este grupo necessita de temperaturas menores para que ocorra uma fermentação adequada, entre 8°C e 14°C. Ao microscópio apresentam-se

quase exclusivamente como células individualizadas ou aos pares. Os microrganismos deste grupo distinguem-se pela capacidade de fermentar completamente o trissacarídeo rafinose. (2, 9, 10)

Os grupos descritos possuem várias diferenças morfológicas e fisiológicas, pelo que a sua utilização na indústria cervejeira tem de ser seguida de uma adaptação do processo tecnológico de produção. A Ilustração 1 apresenta imagens de microscopia de ambos os grupos de leveduras. (2, 9, 10)

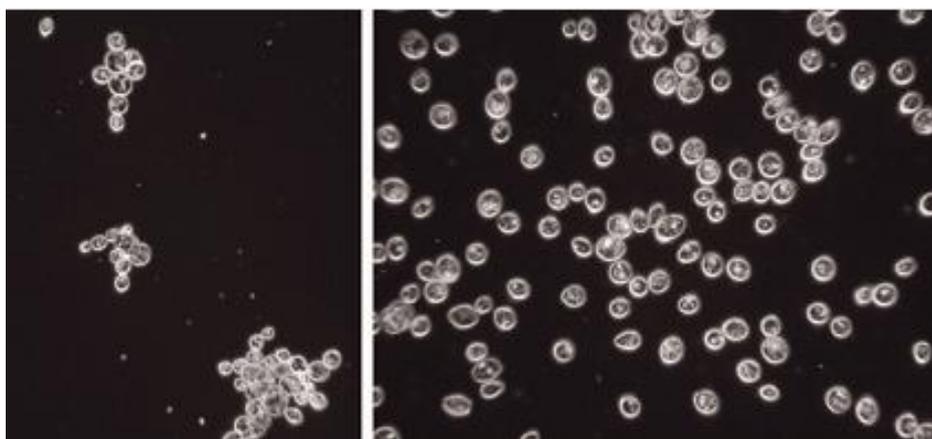


Ilustração 1 – Imagens de microscopia de leveduras de fermentação de topo (à esquerda) e de fermentação baixa (à direita). Magnificação de 640 vezes. (8)

As leveduras são organismos capazes de alternar o seu metabolismo entre condições aeróbias, metabolismo oxidativo, e o metabolismo fermentativo, dependendo da concentração de oxigénio no meio. Este efeito denomina-se efeito *Pasteur*. Apesar de a fermentação alcoólica ocorrer em condições de total anaerobiose, o fornecimento de oxigénio durante o início da fermentação permite a ocorrência de fermentações equilibradas, o que se reflete na qualidade do produto final. (2, 10, 11)

Os processos metabólicos das leveduras são influenciados pela concentração de açúcares no meio. Na presença de uma concentração de açúcares superior a 0,1g/L os complexos enzimáticos responsáveis pelo metabolismo aeróbio são inibidos e ocorre fermentação com produção de etanol. Este efeito é independente da concentração de oxigénio e tem o nome de efeito *Crabtree*. Verifica-se que as leveduras utilizadas na indústria cervejeira são organismos *Crabtree* positivos. (2, 10, 12)

## 2.2 O malte

### 2.2.1 Produção de malte

O malte é obtido após a passagem do grão de cevada por um processo denominado maltagem. Este processo consiste na indução da germinação do grão de cevada de forma a ativar as enzimas do grão. Depois de induzida a germinação, esta é parada através de um processo de secagem que garante a estabilidade do material até à sua utilização no fabrico de mosto.

A produção de malte é realizada em instalações denominadas malterias, que possuem o equipamento necessário para armazenar a cevada e realizar as etapas do processo de produção.

O primeiro passo denomina-se molha; este passo sujeita os grãos de cevada a uma fase hidratada, em que a cevada é submetida ao contacto com água através de imersão ou aspersão. De seguida ocorre uma fase seca em que ocorre arejamento. Estas duas fases sucedem-se até se verificar o aparecimento da coleoriza nos grãos de malte em conjunto com uma coloração amarela na água. Este elemento, indicativo da germinação, assinala que o grão está pronto para passar à fase de germinação. O processo de molhagem ocorre, dependendo das características do grão, entre 12°C e 18°C. (7) O grão de cevada aumenta de tamanho entre 30% e 40% devido ao efeito da hidratação. (7, 8)

Com o fim da hidratação, passa-se para a germinação; depois de hidratado, o grão começa uma fase mais intensa de desenvolvimento, em que começa a crescer, verificando-se o desenvolvimento de pequenas raízes na base do grão, e do coleóptilo por baixo da camada externa de protecção. As enzimas hidrolíticas, necessárias na produção de mosto, começam a surgir em maior quantidade, especialmente as que provocam alterações no amido do endosperma. Após um pequeno período, o embrião liberta giberelinas, que se difundem pelo grão originando a produção de enzimas na camada de aleurona. (8) Com a presença de cada vez mais enzimas o grão aumenta o seu grau de modificação. Os nutrientes produzidos passam o endosperma para alimentar o embrião, que se continua a desenvolver. Quando a acrospira atinge o tamanho de 75% do grão, o nível de acumulação de nutrientes, açúcares e compostos azotados, entre outros, pára de aumentar, indicando que se atingiu o limite pretendido do nível de germinação. A continuação da germinação

implica o consumo de nutrientes úteis, o que tem efeitos negativos nos rendimentos das instalações de produção de malte. (8)

O passo seguinte é a secagem. O malte “verde” é transferido para salas de secagem. Estas salas possuem um fundo pontilhado que permite a passagem de ar quente que seca o malte “verde”. O calor assim fornecido permite terminar o processo de modificação e parar o crescimento da planta reduzindo a humidade dos grãos até níveis que permitem o seu adequado armazenamento. As enzimas formadas durante os passos anteriores retêm a sua atividade e, simultaneamente, são desenvolvidas características de cor, sabor e aroma de acordo com as especificações fornecidas pela indústria cervejeira. A temperatura é controlada de modo a otimizar a secagem: a temperatura inicial não pode ser muito elevada já que em contacto com a humidade proveniente do malte verde ocorre desnaturação de enzimas importantes para o fabrico de mosto. Desta forma, a pré-secagem é iniciada a 50°C e termina a 65°C, a partir do momento em que a humidade do ar à saída atinge os 20%, inicia-se a secagem com um aumento gradual de temperatura até aos 85°C. Este passo é determinante no estabelecimento do conteúdo em aminoácidos do malte, verificando-se diferentes teores dos nutrientes com diferentes processos de secagem. Na Figura 4 encontra-se representado um esquema de variação de temperatura e humidade durante a secagem de um malte de cor clara. (8, 13)

Modificações nos parâmetros do processo de secagem, nomeadamente o aumento de temperaturas, têm como consequência a produção de maltes denominados especiais. Estes maltes possuem características diferentes de um malte “normal”, como uma cor mais intensa e um menor conteúdo de açúcares e aminoácidos. Geralmente este tipo de maltes é produzido em menores quantidades. (2, 8)

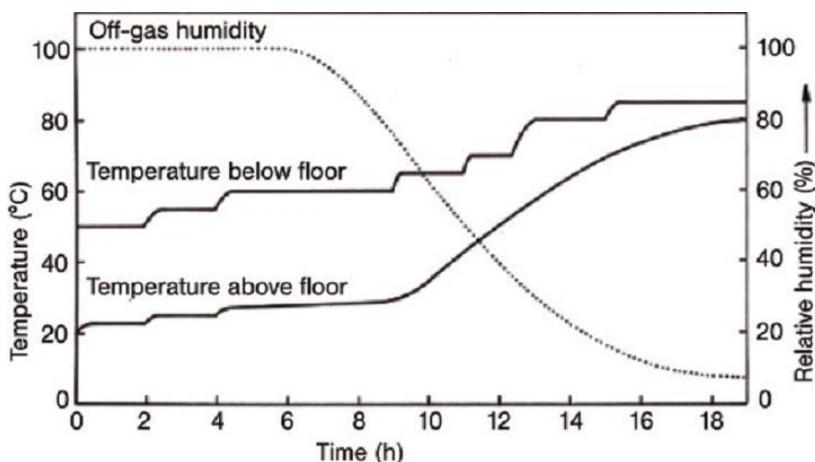


Figura 4 – Variação de temperatura e humidade ao longo do tempo durante a secagem de um malte claro (8)

### 2.3 Produção de mosto

O mosto é o produto obtido após a passagem de malte moído em suspensão por um conjunto de tratamentos térmicos a vários patamares. Estes tratamentos térmicos têm como objectivo criar um meio fermentativo, rico em micro e macro nutrientes, capaz de satisfazer as necessidades nutricionais da levedura durante a fermentação.

O fabrico do mosto pode seguir vários diagramas diferentes em função do produto que se pretende obter e das especificidades da instalação onde é realizado o fabrico, no entanto, os principais passos são transversais, isto é, são utilizados na generalidade das instalações industriais cervejeiras. A Tabela 2 sumariza o processo de fabrico.

O processo de fabrico inicia-se com a empastagem, passo que consiste na mistura da farinha do malte com água quente, a temperatura e agitação adequadas. (2, 8)

Segue-se a proteólise/gelificação. Neste passo o património enzimático proveniente do malte começa a exercer a sua atividade. O alvo neste patamar são as proteínas e as  $\beta$ -glucanas. As proteinases são endógenas, provenientes do malte, enquanto as  $\beta$ -glucanases são exógenas, e contribuem para a diminuição da viscosidade do mosto. Este passo ocorre a temperaturas entre 45°C e 50°C. As principais proteases existentes no malte, com atividade nesta fase, são carboxipeptidases, aminopeptidases, dipeptidases e endopeptidases. (2, 8, 14)

No passo de liquefacção, o aumento da temperatura do mosto para cerca de 64°C favorece a atividade das  $\beta$ -amilases que, através das extremidades não redutoras das cadeias de amilopectina e amilose produzem o dissacarídeo maltose. Existe também atividade de  $\alpha$ -amilases, que agem em qualquer ponto das cadeias e, ao quebrar as ligações glicosídicas, potenciam a atividade das  $\beta$ -amilases. (2, 8)

É durante a sacarificação que a atividade hidrolítica das  $\alpha$ -amilases do malte, com atividade ótima entre 72°C e 75°C, ocorre com mais intensidade. A atuação destas enzimas permite degradar as ainda existentes cadeias longas de polissacarídeos originando dextrinas mais pequenas. Devido à atividade enzimática na sacarificação e na liquefacção são produzidas grandes quantidades de maltose, e quantidades menores de maltotriose, sacarose, glucose, frutose e oligossacarídeos. A sacarificação é dada como terminada após a realização de um teste com iodo, que garante que todo o amido foi degradado. (2, 8)

A filtração remove os resíduos não solúveis que entraram no sistema durante a empastagem, o que permite clarificar o mosto. Estes resíduos consistem principalmente nos invólucros do malte ou cevada e têm o nome de drêche. (2, 8, 15)

**Tabela 2 – Passos de um processo de produção de mosto industrial. (2, 8)**

<b>Nº</b>	<b>Nome</b>	<b>Principal Efeito</b>	<b>Intervalo de temperaturas (°C)</b>
<b>1</b>	Empastagem	Dissolução da farinha de malte em água	40-45
<b>2</b>	Proteólise/Gelificação	Degradação de proteínas e $\beta$ -glucanas	45-50
<b>3</b>	Liquefacção	Degradação de amilose e amilopectina	62-65
<b>4</b>	Sacarificação	Degradação final de polissacarídeos originando um líquido negativo para o teste do iodo	75-78
<b>5</b>	Filtração	Remoção de componentes insolúveis de maior tamanho do mosto	
<b>6</b>	Ebulição	Pasteurização, degradação de compostos e adição de lúpulo	100-104
<b>7</b>	Decantação	Remoção de proteínas insolúveis e complexos prejudiciais	

A temperatura mais elevada de todo o processo ocorre durante a ebulição. Neste passo diminui-se para níveis aceitáveis a concentração de microrganismos contaminantes, pois sujeita-se o líquido a uma temperatura de cerca de 100°C. Neste momento é adicionado o lúpulo, cujos componentes são extraídos e isomerizados, e ocorre a inativação das enzimas do malte, que caso permanecessem ativas iriam resultar em perfis organoléticos atípicos. A coagulação e decantação de proteínas são desejáveis, no entanto, é necessário equilíbrio de modo a que a cerveja final mantenha algumas características organoléticas essenciais e a capacidade de formar a espuma adequada. (8)

A Tabela 3 mostra a composição típica de um mosto após o seu processo de produção. Dadas as possíveis variações no processo tecnológico de obtenção do mosto é natural que se verifiquem diferenças tanto devido ao processo como devido às matérias-primas.

**Tabela 3 – Composição típica de um mosto. (16)**

<b>Composição típica de um mosto</b>	
<b>Composto</b>	<b>Quantidade (g/L)</b>
<b>Maltose</b>	52,4
<b>Glucose</b>	9,1
<b>Frutose</b>	2,1
<b>Sacarose</b>	2,3
<b>Maltotriose</b>	12,8
<b>Açúcares não fermentescíveis</b>	23,9
<b>Matéria azotada (como N)</b>	0,8
<b>Aminoácidos (como N)</b>	0,30
<b>Compostos fenólicos</b>	0,25
<b>Ácidos Iso-<math>\alpha</math></b>	0,035
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	0,065

## 2.4 Fermentação

### 2.4.1 O processo fermentativo

No fim da ebulição a cerveja passa por permutadores que arrefecem o mosto até à temperatura adequada para a inoculação e entrada em reatores cilindro-cónicos. As temperaturas de entrada nestes reatores são um parâmetro estabelecido pelos cervejeiros de acordo com as características da cerveja que se pretende obter, e de acordo com as características dos equipamentos.

Após o arrefecimento, o mosto é arejado até serem atingidas concentrações de oxigénio no mosto entre 7 e 9 mg/L. O arejamento do mosto fornece o oxigénio utilizado em reacções necessárias para a síntese de ácidos gordos, elementos necessários para garantir a estabilidade das membranas celulares durante o processo fermentativo e

consequentemente o estado fisiológico saudável dos microrganismos. Este é o único momento em todo o processo de produção de cerveja em que oxigénio é deliberadamente adicionado ao líquido. Para que não exista o risco de contaminações do mosto o ar tem de ser esterilizado por meio de filtros. A adição de oxigénio é geralmente realizada através da injeção de ar comprimido, num local das tubagens onde se cria um fluxo turbulento de mosto, até uma concentração de 8 a 10 mg/L. (2, 8, 9)

A inoculação é realizada ao mesmo tempo que o mosto, frio e arejado, é bombeado pelas tubagens até chegar aos reatores, garantindo uma adequada dispersão da levedura no mosto. A levedura utilizada é proveniente de tanques onde é realizada uma propagação até ser atingido o volume necessário ou, por outro lado, de tanques onde é recolhida após o término de uma fermentação, e mantida em condições adequadas para que possa ser reutilizada.(2, 9)

As leveduras, quando atingem o mosto frio, com elevadas concentrações de açúcares, não utilizam o oxigénio existente no mosto frio para realizar fosforilação oxidativa, já que são organismos *Crabtree* positivos e por isso realizam a fermentação alcoólica no início da fermentação. No entanto, o oxigénio dissolvido no meio é consumido em poucas horas. O oxigénio, que entra no interior das células por difusão facilitada, é utilizado para realizar a síntese de ergosterol e a insaturação de precursores de ácidos gordos, que, no fim do metabolismo, são incorporados na bicamada lipídica da membrana celular. Assim, leveduras que são inicialmente expostas a oxigénio são mais saudáveis, possuindo uma maior capacidade de resistência a situações de stress e maior integridade estrutural ao longo das gerações. (8, 17)

Nas primeiras 10 horas ocorre a fase lag, com o consumo do oxigénio, diminuição do pH e absorção do azoto aminado livre. O desenvolvimento celular é modesto o que mostra que a levedura se encontra em fase de adaptação ao meio. (2, 9)

Após a adaptação inicial a levedura entra na fase de crescimento exponencial, verificando-se uma elevada taxa de consumo de substrato e produção abundante de etanol, fatores que contribuem para a diminuição da densidade do meio. Nesta fase o oxigénio presente no meio já se encontra totalmente consumido e as células encontram-se em pleno desenvolvimento celular, verificando-se a maior taxa de crescimento da cultura. A fase exponencial tem o seu término após cerca de 60h, momento em que se dá a entrada na fase estacionária, e conseqüente diminuição do consumo de azoto, substrato e diminuição da

taxa de produção de etanol. Após cerca de 10 dias a fermentação termina. O diagrama da Figura 5 apresenta um diagrama de fermentação para uma cerveja lager. (9)

Seguem-se as fases de maturação e estabilização coloidal. Na fase de maturação a temperatura é ligeiramente aumentada de modo a que a levedura possa metabolizar alguns elementos que são nocivos para as propriedades organoléticas da cerveja. Destes elementos um dos que mais afeta a qualidade final é o diacetilo, uma dicetona vicinal que provoca o sabor a lípidos, ou ranço, no produto final. Na fase de estabilização coloidal a cerveja é arrefecida para temperaturas negativas, e favorece-se a eliminação de matéria proteica. (9)

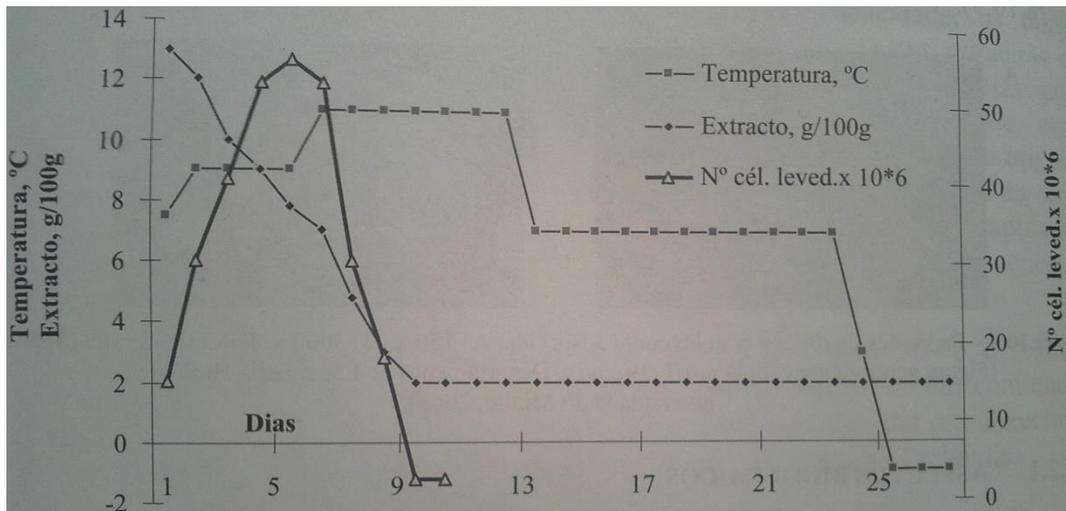


Figura 5 – Exemplo de um diagrama de fermentação lager. (9)

### **3. Bioquímica do azoto**

#### **3.1 Metabolismo do azoto**

##### **3.1.1 Utilização do azoto pela levedura**

O azoto é um elemento químico essencial ao funcionamento da levedura. As leveduras são microrganismos não-diazotróficos, pelo que a existência no malte de azoto fermentável é um dos parâmetros rigorosamente controlados para garantir que todas as necessidades nutricionais da levedura são adequadamente supridas e a performance mantida em níveis adequados.

As leveduras são capazes de utilizar uma grande variedade de compostos como fonte de azoto, pelo que possuem mecanismos de controlo por forma a garantir um fornecimento constante. Verificou-se que os iões de amónia e os aminoácidos asparagina, glutamina e glutamato são fontes preferenciais de azoto, ao contrário do aminoácido prolina que não é metabolizado. (13, 18) Se a concentração destas fontes de azoto preferenciais for muito baixa, outras fontes de azoto podem ser utilizadas, tais como nitritos, nitratos, amidas, outros aminoácidos e péptidos.

A utilização de fontes secundárias de azoto requer a síntese de enzimas e permeases especificamente catabólicas, cuja produção se encontra regulada por um processo denominado repressão catabólica de azoto, que é inibido na presença das fontes preferenciais deste elemento. (19-21)

O mosto, que é um sistema complexo e possui uma grande quantidade de compostos dissolvidos, leva a levedura a ter de adaptar o seu metabolismo em função da diminuição da concentração dos elementos presentes no mosto, isto é, a levedura metaboliza fontes de azoto cada vez menos preferenciais ao longo da fermentação. Este facto é excecionalmente importante neste sistema em que a principal fonte de azoto fermentável são aminoácidos. (22)

##### **3.1.2 Perfil de consumo de azoto**

Os mecanismos reguladores de azoto na célula condicionam a entrada e assimilação de compostos azotados, o que permite elaborar perfis de consumo de aminoácidos pelas leveduras. O estudo destes perfis de consumo deu origem à distribuição

dos aminoácidos por grupos, como mostram as Tabelas 4 e 5. Estas tabelas, apesar de adequadas em várias situações foram realizadas com recurso a uma estirpe de fermentação de topo, *S. cerevisiae Guinness 4200*. A Tabela 4 mostra uma classificação dos aminoácidos segundo a ordem de assimilação, a Tabela 5 realiza um agrupamento segundo a importância destes como reguladores do desenvolvimento de sabores da cerveja. (21-24)

**Tabela 4 – Classes de aminoácidos do mosto em função da ordem de assimilação durante a fermentação (23, 24)**

<b>Classe A</b>	<b>Classe B</b>	<b>Classe C</b>	<b>Classe D</b>
Arginina	Histidina	Alanina	Prolina
Asparagina	Isoleucina	Glicina	
Aspartato	Leucina	Fenilalanina	
Glutamato	Metionina	Tirosina	
Glutamina	Valina	Triptofano	
Lisina		(Amónia)	
Serina			
Treonina			

Os aminoácidos da classe A caracterizam-se por uma assimilação imediata assim que ocorre inoculação do mosto, enquanto os aminoácidos da classe B são assimilados mais lentamente ao longo da fermentação. O grupo C, terceiro na ordem de assimilação, inclui um elemento extra: os iões de amónia, segundo Lekkas e colaboradores (2007) (22). Os elementos desta classe só são assimilados no momento em que os elementos da classe A se encontram em concentração nula. A classe D possui apenas um aminoácido, a prolina, cuja assimilação requer condições aeróbias. (22-25)

O segundo agrupamento, que assume a ocorrência de desequilíbrios no perfil de concentrações de aminoácidos devido a diferentes práticas na indústria, analisa a possibilidade de a síntese de um aminoácido pela levedura poder ser realizada sem consequências para as características organolépticas ou se a assimilação a partir de meio fermentativo é crítica para a formação de metabolitos relevantes.

A concentração inicial no mosto de aminoácidos de classe 1 foi considerada de pouca importância, já que estes podem ser assimilados do mosto ou, alternativamente, sintetizados a partir de catabolismo dos hidratos de carbono e reacções de transaminação. (21, 23)

**Tabela 5 – Aminoácidos do mosto separados por classes em função do efeito na produção de compostos organoleticamente importantes (23)**

<b>Classe 1</b>	<b>Classe 2</b>	<b>Classe 3</b>
Aspartato	Isoleucina	Lisina
Asparagina	Valina	Histidina
Glutamato	Fenilalanina	Arginina
Treonina	Glicina	Leucina
Serina	Tirosina	
Metionina		
Prolina		

Deficiências na concentração inicial nas classes 2 e 3 são de maior importância: as relações entre a disponibilidade de valina, um aminoácido da classe 2, e a produção de diacetilo, assim como a relação entre maior produção de etanol devido à maior presença de aminoácidos foram demonstradas. (21, 23, 26, 27)

Depois dos estudos de Pierce e Jones (1964) (24) e Pierce (1987) (23), surgiram os trabalhos de Palmqvist e Ayrappa (1969) (28) e, mais recentemente, de Perpète (2004) (25). Estes estudos utilizaram estirpes de levedura de fermentação baixa, e, por isso, merecem destaque devido às diferenças que se podem encontram entre as características das leveduras utilizadas. As classificações segundo os diferentes autores e as diferenças características dos ensaios encontram-se indicadas na Tabela 9, no Anexo A.1. (23-25, 28)

Aminoácidos individuais são mais rapidamente metabolizados do que fontes mais complexas de azoto, como pequenos homodipéptidos. Apenas péptidos com até cinco resíduos são transportados para o interior da célula. A indução de proteínas transportadoras de péptidos é regulada positivamente pela presença de concentrações vestigiais de aminoácidos: a presença de leucina, por exemplo, favorece a entrada de péptidos no interior da célula. (21, 23)

A explicação da existência destas classes é, segundo Regenber e colaboradores (1999)(29), parcialmente relacionada com a produção de permeases de aminoácidos com diferentes graus de especificidade para diferentes moléculas. A expressão dos genes para estas permeases é estimulada pela presença dos aminoácidos que devem transportar. (29)

Como se verifica que os diferentes aminoácidos podem ter diferentes papéis durante a fermentação, incluindo efeitos antagonísticos, é um tópico de estudo relevante conhecer a resposta da fermentação a perfis de aminoácidos distintos. (25)

### **3.1.3 Performance fermentativa e concentração de azoto**

Um mosto bem suplementado é essencial para uma boa performance fermentativa e para um produto de boa qualidade. Nos casos em que se verifica que o malte não foi bem modificado, ou que existe alguma deficiência em dado micronutriente, verifica-se a ocorrência de *stuck fermentations*, ou fermentações paradas, que se caracterizam pela incapacidade da levedura em prosseguir com a fermentação quando ainda existe uma quantidade considerável de nutrientes no meio. Um exemplo típico de uma fermentação parada ocorre quando o desenvolvimento celular é limitado pela ausência de azoto, verificando-se um declínio na performance fermentativa: células em desenvolvimento são capazes de fermentar açúcares do meio a um ritmo mais elevado do que células que se encontram em estado de manutenção e, conseqüentemente, a produção de etanol é reduzida. (26, 30-32)

A produção de mostos de elevada gravidade, com valores de extrato entre 15 e 20 graus Plato, tem como objectivo aumentar a produtividade de uma instalação, isto é, possibilitar a produção de um produto com maior teor alcoólico por unidade de volume instalado. O produto fermentado, que possui uma maior concentração de etanol, pode depois ser diluído de acordo com as especificações de extrato do produto final com manutenção das propriedades organolépticas. Para permitir a produção dos mostos de elevada gravidade são utilizados adjuntos ricos em açúcares, de que é exemplo o griz de milho. Estes adjuntos possuem uma baixa concentração de compostos azotados, o que os torna um risco para a performance da fermentação. Apesar de o malte geralmente possuir uma concentração de compostos azotados fermentáveis em excesso, a proporção da mistura de matérias-primas utilizada deve garantir uma concentração adequada de azoto fermentável, senão existe o risco de ocorrerem fermentações paradas. A manutenção da performance fermentativa nestas condições é, por isso, um importante problema industrial. (2, 30-33)

## 3.2 Métodos de detecção de azoto

### 3.2.1 Azoto aminado livre

Para a avaliação de um conteúdo adequado em azoto de um mosto, ou de um malte quando utilizado o processo de preparação da amostra adequado, a indústria cervejeira assumiu como padrão uma técnica denominada azoto aminado livre, FAN (sigla da expressão inglesa *Free Amino Nitrogen*).

Por definição, o FAN reflete o azoto proveniente de aminas disponível durante a fermentação. A técnica mais comum utiliza ninidrina para promover uma reacção com as aminas primárias de péptidos e aminoácidos, no entanto, esta técnica também quantifica a presença de iões amónia, sendo, por isso, possível quantificar todo o azoto disponível para a célula. A ninidrina, que é um poderoso agente oxidante, tem como produto da reacção um composto de cor roxa denominado Roxo de Ruhemann, que, apesar da cor, é lido espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 570 nm. (34-37)

Dado que o FAN é utilizado como método de análise da presença de azoto num mosto, foram definidos limites mínimos de concentração a partir dos quais se pode garantir uma performance fermentativa adequada. Estes parâmetros encontram-se entre 140 mg/L e 150 mg/L para mostos de 12 °P, e 200 mg/L a 280 mg/L para mostos com valores Plato entre 14 °P e 18 °P. (2, 21, 32, 33, 36, 38)

Alguns autores, como Lekkas (2007) (22), consideram o FAN como uma forma relativamente grosseira de análise do conteúdo em azoto fermentável. Este método, apesar de muito utilizado na indústria tem algumas limitações, e podem ser estabelecidas relações com outros métodos, tal como o *Yeast Available Nitrogen* utilizado na indústria vitivinícola. (22, 36)

## 3.3 A produção de dicetonas vicinais

A determinação de dicetonas vicinais é relevante para os parâmetros de qualidade do produto final. Estes compostos, analisados na forma de diacetilo e pentanodiona (2,3-butanediona e 2,3-pentanodiona), possuem o sabor a ranço, oxidação lipídica, por vezes descrito como manteiga. O limite de detecção organolética destes compostos é de cerca de 0,09 mg/L para o diacetilo e de 0,15mg/L para a pentanodiona.(7)

A produção dos precursores destes compostos são ácidos  $\alpha$ -acetohidróxidos, o  $\alpha$ -acetolactato e o  $\alpha$ -acetobutirato. Estes precursores são sub-produtos da síntese dos



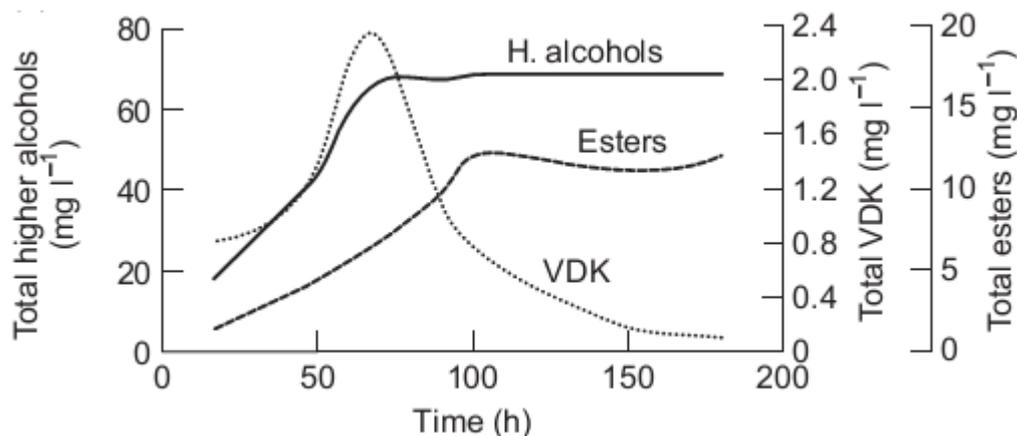


Figura 7 – Variação da concentração de dicetonas vicinais (VDK) ao longo de uma fermentação. (7)

A produção de dicetonas vicinais também é influenciada pelo conteúdo em azoto metabolizável de um mosto e pelo perfil de aminoácidos existente neste: verificou-se que uma elevada concentração de valina e isoleucina minimizava a formação excessiva de  $\alpha$ -acetoácidos.

Em 1984, Nakatani et al. (1984a,b) (40, 41) derivaram uma relação entre a concentração total de dicetonas vicinais formadas e a concentração de FAN mínima verificada durante a fermentação. Esta relação encontra-se expressa na Fórmula 1. (40, 41)

$$T - VDK_{\max} = \frac{0,161}{FAN_{\min} - 3,87} + 0,415$$

Fórmula 1- Relação entre a concentração de dicetonas vicinais e a concentração de FAN. (40, 41)

Na Fórmula 6,  $T - VDK_{\max}$  representa a concentração total de dicetonas vicinais formadas e  $FAN_{\min}$  a menor concentração de FAN verificada durante a fermentação.

## **4. Seleção de malte e performance fermentativa**

### **4.1 Critérios para a seleção de malte**

A indústria cervejeira trabalha em conjunto com os fornecedores de malte para que sejam produzidos lotes de malte adequados às necessidades do fabrico de mosto e posterior produção de cerveja. Considerando o interesse económico crescente nesta atividade foi dado um ênfase cada vez maior à investigação dos parâmetros e especificações que as matérias-primas precisam de cumprir. Apesar de existir uma abundância de parâmetros de seleção, nem todos são relevantes para uma adequada escolha do malte a utilizar para o fabrico de mosto. A determinação destes parâmetros recorre a ensaios laboratoriais de produção para determinar as características das matérias-primas. (7, 42, 43)

Um parâmetro de especial importância para estabelecer a qualidade do malte é o extrato, medida de avaliação de material solúvel fermentável, açúcares, obtido ao produzir o mosto. Este parâmetro é dependente da atividade enzimática do malte. (7, 42, 43)

A Figura 12, no Anexo B1 mostra uma folha real de especificações de malte fornecida por uma empresa portuguesa produtora de malte. A Figura 13, que se encontra no Anexo B2, mostra um conjunto de parâmetros que podem ser utilizados para a análise de malte.

### **4.2 Critérios de seleção com base em compostos azotados**

O azoto é um nutriente do meio que pode influenciar de várias maneiras as características físico-químicas do produto final e o processo biotecnológico que lhe dá origem, pelo que o controlo do conteúdo de compostos azotados no malte é essencial. O azoto é relevante na estabilidade coloidal da cerveja, na estabilidade do aroma, no sabor, na estabilidade da espuma e, evidentemente, na performance fermentativa. (7, 42, 44)

A Tabela 6 descreve alguns parâmetros utilizados para caracterizar os maltes relativamente ao seu conteúdo em compostos azotados.

Tabela 6 – Elementos de análise do azoto.(2, 7, 37, 42, 45, 46) (1) Mostos com 12 °P; (2) Mostos com valores entre 14-18 °P

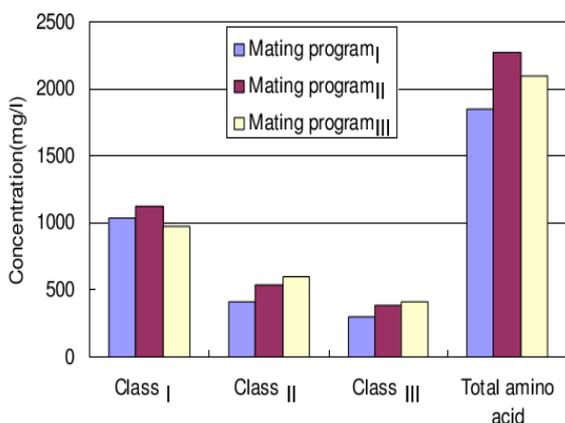
<b>Parâmetro</b>	<b>Importância</b>	<b>Valores alvo</b>
<b>Azoto total</b>	Indicação do conteúdo total de azoto em função do número de átomos	
<b>Azoto total solúvel</b>	Permite avaliar a influência das proteínas em parâmetros de estabilidade coloidal, sabor e aroma	900-1200 mg/L <sup>1</sup> (8)
<b>Índice de Kolbach</b>	Rácio entre a concentração de proteínas solúveis e a concentração total de proteínas; é um indicador da modificação de proteínas	36-42% (46)
<b>FAN (<i>Free amino nitrogen</i>)</b>	Concentração de amins primárias e iões amónia	140-150 mg/L <sup>1</sup> (2) 200-280 mg/L <sup>2</sup> (21)

#### 4.3 Ponto de situação na análise de malte em relacionamento com azoto

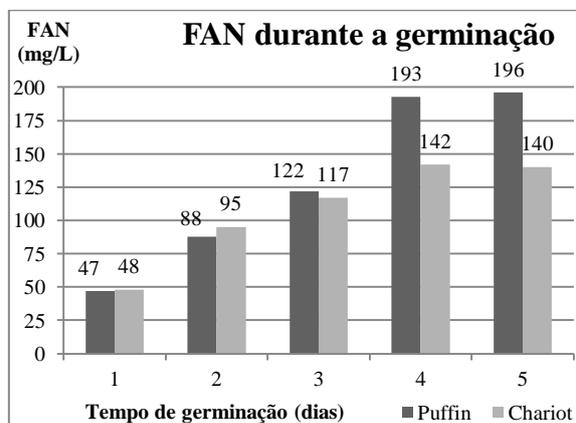
Apesar dos critérios existentes para a seleção do malte, vários trabalhos publicados mostram a relevância que a maltagem tem no perfil de aminoácidos obtido a partir de um determinado malte. Nie e colaboradores (2010) (13) analisaram vários maltes, na qual se destaca o malte europeu Esterel, e diferentes processos de maltagem para demonstrar que a obtenção de um perfil de aminoácidos adequado à fermentação é um processo que deve ser sinérgico com o processo produtivo. Esta afirmação é substantiada pelo facto de a tendência de variação da concentração de aminoácidos ser oscilante ao longo do processo produtivo, e variável entre processos, como se verifica na Figura 8. Simultaneamente foi realizada uma análise das correlações existentes entre os critérios de seleção de malte, verificando-se correlações fortes entre critérios, como demonstrado na Tabela 7. Desta forma, é estabelecida uma base para trabalho futuro acerca da análise de relações complexas entre critérios, de modo a retirar conclusões acerca das propriedades do malte e da capacidade de influenciar estas propriedades. (13, 33)

Agu (2003) (47) escolheu duas estirpes de cevada baseando-se no conteúdo em azoto, uma superior e uma inferior. Depois de realizar uma descrição destas matérias-primas procedeu à sua maltagem. O autor verificou que ocorria uma performance diferente

durante a germinação e na obtenção de extrato fermentável. Os resultados mostraram que o conteúdo em azoto da cevada em maltagem não só se encontrava ligada à produção de enzimas durante a maltagem como também se encontrava ligada à disponibilidade de açúcares e azoto solúvel no mosto. Verificou-se que a cevada com o maior conteúdo em azoto inicial deu origem ao maior conteúdo de azoto no malte, no entanto, este malte apresentou um menor valor de extrato. Estes resultados permitem concluir que existe diferença em parâmetros como o extrato em função do conteúdo em azoto. A quantificação destas relações pode contribuir para uma melhor selecção dos lotes de malte e da performance durante a produção do mosto. A Figura 9 mostra a variação do conteúdo em azoto fermentável durante a germinação das duas cevadas, ilustrando como as duas estirpes de cevada foram influenciadas pelo mesmo processo de maltagem. (47)



**Figura 8 – Efeito de diferentes processos de maltagem no conteúdo de aminoácidos de um malte com origem na variedade Copeland. (13)**



**Figura 9 – Variação do conteúdo de FAN durante a maltagem de duas estirpes de cevada, Puffin e Chariot. Adaptado de (47)**

**Tabela 7 – Correlações existentes entre os parâmetros de quatro maltes de diferentes estirpes de cevada. (13)**

	TP	SP	KI	FAN	TAA
TP	1.000				
SP	0.8312*	1.000			
KI	0.5304	0.9117**	1.000		
FAN	0.6102	0.9411**	0.9803**	1.000	
TAA	0.4003	0.8306*	0.9719**	0.9354**	1.000

<sup>a</sup> TP = total protein; SP = soluble protein; KI = Kolbach index; FAN = free amino nitrogen; TAA = total amino acid; \* and \*\* = significant at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  levels of probability, respectively.

## **5. Parâmetros analíticos da indústria cervejeira**

### **5.1 Métodos analíticos disponíveis na empresa Unicer**

A indústria cervejeira possui convenções que estabelecem métodos padrão de análise. Estes são comparáveis entre laboratórios de controlo de qualidade que utilizam os mesmos sistemas, pelo que permitem trabalhar sinergisticamente para garantir a qualidade dos produtos. Os métodos descritos por cada convenção são constantemente revistos e aprimorados. As convenções são: o Institute of Brewing, a European Brewery Convention, a American Society of Brewing Chemists e a Mitteleuropaischen Analysen Kommission. (7) A Unicer utiliza os métodos estabelecidos pela European Brewery Convention descritos em Analytica – EBC (37).

#### **5.1.1 Densidade relativa**

A densidade relativa da amostra é analisada recorrendo a um aparelho que possui um tubo em U oscilante. Este parâmetro indica o quociente entre a massa volúmica da água e a massa volúmica da amostra, neste caso à temperatura de 20°C e com unidades de gramas por centímetro cúbico. O tubo em U oscilante é o aparelho que transforma a frequência de oscilação de um tubo de vidro em valores proporcionais à densidade da amostra.

#### **5.1.1 Composição em açúcares fermentáveis**

Como descrito neste trabalho, o malte e os processos que lhe dão origem têm a função de fornecer substâncias fermentáveis para a metabolização da levedura. A indústria cervejeira designa por extrato a concentração de açúcares disponíveis para a levedura num mosto ou licor de fermentação. O extrato é determinado recorrendo a uma correlação entre a densidade do mosto e de uma solução de água contendo glucose. Esta correlação baseia-se em resultados empíricos e a conversão pode ser realizada através de uma Tabela de Plato. A unidade são graus Plato (°P), que correspondem à percentagem em massa de sacarose dissolvida na água. As Fórmulas 1, 2 e 3 correspondem aos métodos indicados em Analytica – EBC, método 9.4. (37)

O extrato aparente de uma amostra corresponde à aplicação do polinómio da Fórmula 1. Este parâmetro não efectua qualquer correção para a existência de etanol na amostra, pelo que se relaciona apenas com a densidade da mesma. (37)

$$E_{app}(\%Plato) = -460,234 + 662,649 SG_{da} - 202,414 SG_{da}^2$$

**Fórmula 1 – Cálculo do extrato aparente**

Neste caso,  $E_{app}$  corresponde ao extrato aparente em %(m/m) da amostra e da corresponde à densidade relativa da amostra em g/cm<sup>3</sup> a 20°C.

O extrato real é calculado segundo a Fórmula 2, após correção para a presença de etanol segundo a Fórmula 3, ou fórmula de Taberié. O resíduo corresponde à componente líquida sem etanol, por isso corresponde ao real teor de açúcares da amostra. (37)

$$E_r(\%Plato) = -460,234 + 662,649 SG_{dr} - 202,414 SG_{dr}^2$$

**Fórmula 2 – Cálculo do extrato real.**

$$d_r = d_a - d_h + 1,000$$

**Fórmula 3 – Fórmula de Taberié.**

Neste caso,  $E_r$  corresponde ao extrato do resíduo em °P,  $d_r$  corresponde à densidade do resíduo,  $d_a$  corresponde à densidade da amostra e  $d_h$  corresponde à densidade da água.

### 5.1.2 Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol (m/m) é determinada, nas condições existentes na empresa, através de um espectrofotómetro NIR, *near infra-red*, que avalia a absorvância da amostra a radiação com o comprimento de onda entre 800 e 2500nm. É utilizada uma reta padrão para determinar a concentração de etanol no meio. É importante que as amostras analisadas sejam desgaseificadas de forma a evitar a perda de analito por evaporação e a influência do dióxido de carbono. (37)

A Fórmula 4 exhibe o cálculo utilizado para estabelecer a percentagem m/m de etanol no meio. (37)

$$\text{Álcool \%}(m/m) = \frac{\text{Álcool \%}(V/V) \times 0,791}{SG_{da}}$$

**Fórmula 4 – Cálculo para a conversão da concentração de etanol de %(V/V) para %(m/m).**

Neste caso,  $SG_{da}$  corresponde à densidade relativa da amostra a 20°C.

### 5.1.3 Determinação do grau de atenuação

O grau de atenuação é uma medida utilizada para determinar a quantidade de extrato consumido em percentagem do total, criando uma medida do estado da fermentação. Aqui é apresentado o grau real de atenuação, ou *real degree of fermentation* (RDF). A Fórmula 5 indica o cálculo utilizado, segundo a Analytica – EBC, método 9.5. (37) para o cálculo deste elemento. Como é possível verificar, este parâmetro utiliza a percentagem m/m de etanol da amostra e o extrato real da cerveja, como calculado na Fórmula 2. (8, 37)

$$RDF = \frac{2,0665 \times \text{Álcool \%}(m/m)}{2,0665 \times \text{Álcool \%}(m/m) + E_r(\%Plato)} \times 100$$

Fórmula 5 – Cálculo para a determinação do grau real de atenuação em mostos em fermentação. (37)

### 5.1.4 Determinação da concentração de dicetonas vicinais

A determinação da concentração de dicetonas vicinais, diacetilo e 2,3-pentanodiona, é realizada utilizando um cromatógrafo de fase gasosa Varian Star 3400 com um detetor de captura de electrões. A coluna utilizada é uma coluna de sílica fundida, 60m x 0,25mm, CP-WAX57CB, espessura de 0,4µm. Este método utiliza um padrão interno de 2,3-hexanediona. Os métodos utilizados para a realização desta análise são os indicados em Analytica – EBC, método 9.24.2. (37)

## **Capítulo 2**

### **Métodos preditivos de análise para seleção de matérias-primas**



## 1. O projecto MPA – Métodos Preditivos de Análise

### 1.1 Efeito do perfil de aminoácidos na fermentação

A análise ao fabrico de cerveja indica que o azoto existente no mosto sofre várias modificações desde que se inicia o processamento da cevada até ao ponto em que se dá a inoculação do mosto. Isto mostra que existe uma influência contínua dos processos utilizados no fabrico do mosto na constituição do caldo fermentativo. (33)

O estudo da capacidade de consumo de azoto por parte das células mostrou que estas têm preferência por fontes de azoto simples, como os aminoácidos ou dipéptidos. (19) As implicações deste facto foram estudadas por vários autores, como Lekkas e colaboradores (2007 e 2009) (22, 48), que estudaram os efeitos da adição de aminoácidos específicos, metionina e lisina, aos meios fermentativos, comparando as diferenças existentes entre ambas as fermentações e estabelecendo uma relação com uma fermentação padrão. Aqui verificou-se que a lisina permitia obter fermentações mais rápidas, no entanto, a adição de metionina permitia obter concentrações de dicetonas vicinais inferiores no final da fermentação. Ao avaliar os efeitos na fermentação da lisina e da metionina é possível afirmar que diferentes aminoácidos irão influenciar de forma distinta a fermentação. (22, 48)

A Tabela 8 e a Figura 10 mostram alguns resultados obtidos.

Tabela 8 – Alguns dados adaptados de Lekkas (2007) (22)

	<b>Lisina</b>	<b>Metionina</b>
<b>Tempo de fermentação (h)</b>	48	103
<b>Células em suspensão após 24 horas</b>	Maior quantidade	Menor quantidade
<b>Concentração final de diacetilo</b>	Superior	Inferior

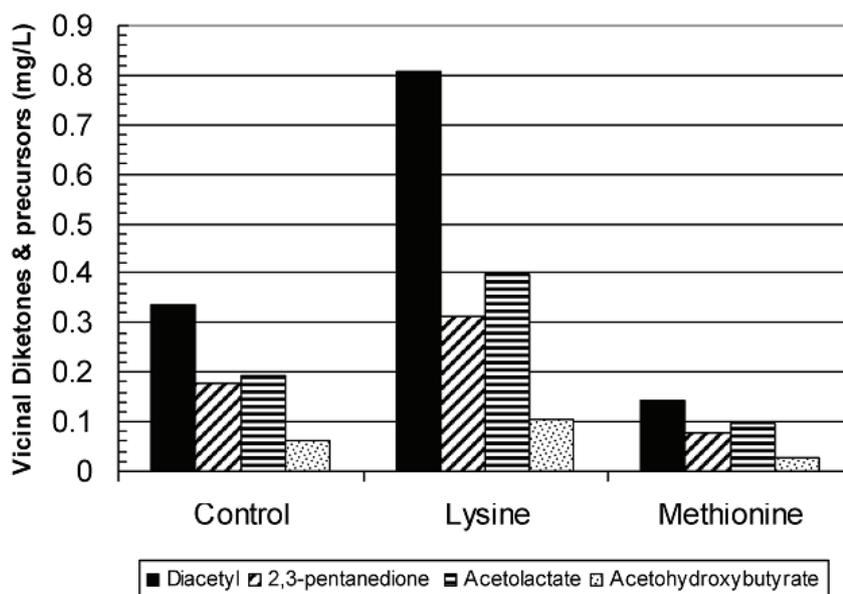


Figura 10 – Valores de concentração de dicetonas vicinais e  $\alpha$ -acetohidróxidos no fim de três fermentações: controle, suplementada com lisina e suplementada com metionina. (22)

Analogamente aos trabalhos de Lekkas (2007 e 2009) (22, 48), os estudos de Pierce (1964) (24) e depois prosseguidos por vários autores, já tinham demonstrado que os aminoácidos possuem diferentes momentos de entrada na célula, demonstrando também que é possível agrupar estes componentes em função do seu efeito nos parâmetros organolépticos. Estes estudos tiveram como base a realização de fermentações em meios sintéticos e em meios complexos. (24, 25, 28, 29)

Uma das causas apontadas para as diferenças na absorção prende-se com a existência de diferentes permeases na membrana celular que, influenciadas pela presença ou ausência dos aminoácidos e outras fontes de azoto, permitem a passagem de moléculas para o interior da célula. A atividade das permeases relaciona-se diretamente com os mecanismos de repressão catabólica de azoto. (20, 29, 49)

Com os estudos de Nakatani e colaboradores (1984a,b), e com a elucidação do metabolismo de produção de isoleucina e valina, estabelece-se uma relação direta entre a presença ou ausência de aminoácidos e um dos critérios de qualidade fundamentais de cerveja: a concentração de dicetonas vicinais. (7, 40, 41)

Considerando que o mosto é um meio complexo, e sabendo que vários processos bioquímicos se encontram a ocorrer em simultâneo, conclui-se que diferentes concentrações dos vários aminoácidos irão ter diferentes efeitos no processo fermentativo. Em função do papel que cada aminoácido pode desempenhar na fermentação, as relações

poderão ser sinérgicas ou antagónicas, isto é, com efeitos benéficos ou nocivos na fermentação. Assim, torna-se claro que o estudo do perfil de aminoácidos no mosto irá permitir retirar conclusões relevantes acerca da forma como as fermentações cervejeiras se processam e de como a performance fermentativa será afetada por variações de concentração destes compostos. (25, 28, 29, 50)

A performance fermentativa, neste trabalho, deve ser entendida como a capacidade de, no normal decorrer da fermentação, a levedura consumir a maior quantidade possível de extrato aparente (°P) ocorrendo a produção da maior quantidade possível de etanol (% v/v). Desta forma, o principal parâmetro de avaliação da performance fermentativa será a atenuação real (%), que engloba ambos os parâmetros e que é utilizada como indicador de performance industrial. A performance fermentativa de uma fermentação é considerada aceitável quando o valor de atenuação real (%) obtido é superior a 67%. Valores finais de atenuação real (%) inferiores ao valor aceitável são indicativos de problemas graves ao nível da fermentação, quer sejam efeito de limitação nutricional, contaminação ou outros fatores.

## 1.2 Seleção de matérias-primas

Dado que o processo cervejeiro é um processo integrado, e que modificações a montante irão ter consequências a jusante, é uma consequência deste trabalho que o estudo do perfil de aminoácidos no mosto poderá apresentar uma influência sobre a forma como são estabelecidas as especificações para a escolha das matérias-primas. Esta afirmação é substantiada pelo estudo de Nie (2010) (13), que mostra que diferentes maltes possuem diferente conteúdo em azoto e que este é influenciado de forma determinante pelo processo produtivo. (13, 33, 49)

As especificações das matérias-primas também podem ser correlacionadas entre si, especialmente no que toca aos parâmetros ligados ao azoto, e com os parâmetros de performance fermentativa. Um adequado relacionamento entre todos estes parâmetros permitirá estabelecer métodos preditivos de análise para a escolha das matérias-primas mais adequadas ao processo fermentativo. (13)

## 1.3 Objectivos

Desta forma estabelecem-se os principais objectivos deste trabalho:

- 1- Identificar de um perfil de aminoácidos ótimo para estimular a performance fermentativa;
- 2- Estabelecer métodos preditivos de análise para a escolha de matérias-primas ótimas para o processo cervejeiro.

O sucesso em cumprir estes objectivos será acompanhado por benefícios económicos, já que em empresas cervejeiras, que trabalham com economias de escala, mesmo pequenas otimizações, de poupança ou eficiência, podem ter um impacto significativo.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Produção de mosto

#### 2.1.1 Seleção de matérias-primas

As matérias-primas utilizadas para a produção de mosto foram seleccionadas a partir de um lote de malte utilizado para a produção industrial de mosto. Cada lote de malte utilizado industrialmente é composto por sub-lotes, que são analisados individualmente. Estes sub-lotes de malte podem ser, ou não, da mesma estirpe de cevada.

Para a elaboração deste trabalho foram utilizados individualmente os sub-lotes de malte de um lote industrial. As análises realizadas pelo fornecedor e a informação do lote industrial são apresentadas na Figura 30 do Anexo B.1.. A informação relativa à cevada utilizada para a produção do malte do lote industrial encontra-se na Tabela 9. O lote Composto utilizado neste trabalho consiste na mistura dos sub-lotes industriais de acordo com a percentagem utilizada no lote industrial.

**Tabela 9 – Informação do malte utilizado para a produção de mosto para este trabalho.**

Nº	Cevada	Tipo	Plantação	Composição
1	<b>Pewter</b>	Dística	Primavera	
2	<b>Braemar</b>	Dística	Primavera	
3	<b>Esterel</b>	Hexástica	Inverno	
4	<b>Prestige</b>	Dística	Primavera	
5	<b>Composto</b>			45% Pewter, 15% Prestige, 15% Braemar, 20% Esterel

#### 2.1.2 Fabrico de mosto

A produção do mosto utilizado neste trabalho ocorreu na instalação piloto da empresa UNICER. Todos os mostos foram produzidos nas mesmas condições e nas mesmas instalações. O diagrama de produção utilizado consiste num diagrama standard utilizado na instalação piloto. O objectivo de extrato aparente do mosto foi de 16 °P, tendo

sido utilizadas como matérias-primas: griz de milho, xarope de glucose e cevada. Foi utilizado o mesmo lote de cada matéria-prima, e na mesma proporção, em todos os mostos produzidos de forma a garantir que a variabilidade existente seria proveniente apenas do lote de malte. A adição de extrato de lúpulo durante a fase de ebulição de cada mosto permitiu atingir 40 unidades de amargor em unidades da *European Brewery Convention* (EBC) no mosto frio.

No final da fase de produção foram retirados volumes de 200 litros de cada mosto e conservados a temperaturas de -20°C.

Na realização deste trabalho foi ainda utilizado um mosto teste, recolhido na UNICER com as mesmas características dos mostos produzidos na instalação piloto.

## 2.2 Fermentações

### 2.2.1 Condições de fermentação

As fermentações executadas neste trabalho foram realizadas em reatores cilíndricos com um volume útil de 2 litros denominados tubos EBC. A amostragem é realizada através de pontos de recolha que se encontram a uma altura de  $\frac{3}{4}$  do reator. A manutenção das condições anaeróbicas no interior dos reatores é garantida através de tampas de silicone adaptadas. Estas possuem peças de vidro em formato de u com uma coluna de água no seu interior, o que permite a saída de dióxido de carbono e impede a entrada de ar. A temperatura de fermentação foi mantida constante a 12°C através de camisas de arrefecimento presentes nos tubos. De forma a recircular a água nas camisas de arrefecimento, e a garantir a temperatura das fermentações, foi utilizado um circulador FPW50-HE da Julabo, Seelbach, Alemanha. A oxigenação do mosto foi realizada recorrendo a ar comprimido esterilizado através da passagem por um filtro estéril. O mosto foi oxigenado inserindo o ar comprimido pela parte inferior dos tubos durante um período de 3 horas.

A inoculação foi realizada com um alvo de 16 milhões de células/mL. A levedura utilizada consistiu numa estirpe industrial de *Saccharomyces pastorianus*, mantida em meio sólido a 4°C em frascos de cultura. A preparação do inóculo consistiu na passagem da levedura dos frascos de cultura em meio sólido para erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de mosto autoclavado. Após 4 dias, a totalidade dos 100 mL inoculados são transferidos

para erlenmeyers de 2,5 L, com 1,5 L de mosto autoclavado. Ao fim de 7 dias a levedura existente nos erlenmeyers de 2,5 L é transferida para um único recipiente e, depois de homogeneizada, é determinada a concentração de células da pasta de levedura e o inóculo pesado em conformidade com o alvo.

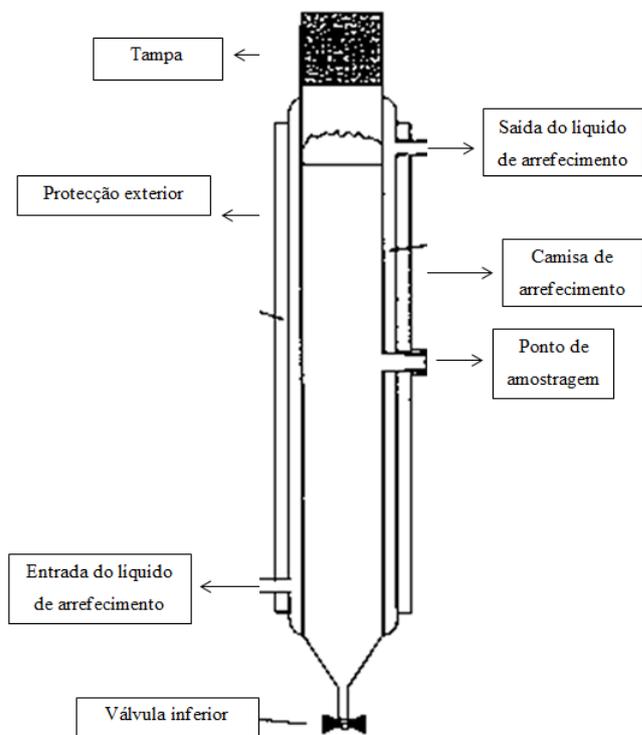


Ilustração 2 – Reatores EBC utilizados neste trabalho

Figura 11 – Esquema de um reator EBC. Adaptado de (51)

### 2.3 Métodos analíticos

Todas as análises realizadas para a elaboração deste trabalho foram realizadas no Laboratório Central da UNICER. As medições de gravidade ( $^{\circ}$ P) de cerveja e mosto, etanol (% v/v), pH, atenuação real (%) e cor (EBC) foram obtidas com recurso a um equipamento Alcoalyzer Plus, Beer Analyzing System da Anton Paar, Austria. A medição da concentração de compostos organoleticamente ativos foi realizada através de um cromatógrafo de fase gasosa Varian Star 3400, segundo os métodos recomendados em Analytica – EBC, método 9.24.2 para análise de dicetonas vicinais, e método 9.39 para álcoois superiores e ésteres. (37) Antes da realização destas análises a biomassa foi removida das amostras através da filtração com um filtro Whatman 2V de 0,45 $\mu$ m. Um ajudante de filtração, terra de diatomáceas, foi utilizado na remoção de biomassa para análises realizadas no Alcoalyzer Plus.

A determinação do extrato aparente limite (°P) e da atenuação real limite (%) dos mostos analisados foram realizados laboratorialmente de forma a obter uma medida preditiva da performance segundo as indicações da Analytica – EBC, método 8.6.1. (37)

A análise de FAN (mg/L) foi realizada através de um equipamento Skalar Beer & Malt Analyser, Skalar Analytical B.V., Holanda. As amostras para análise de FAN (mg/L) foram centrifugadas a 1650 g durante 15 minutos. A determinação da concentração de aminoácidos e iões foi comissionada a um laboratório acreditado do grupo Carlsberg em Estrasburgo, França.

A determinação de biomassa através de contagem de células foi realizada através de contagem através de um Z1 Coulter Counter, Single Threshold Analyser, Beckman Coulter, E.U.A.. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método do azul de metileno com visualização ao microscópio.

A análise de correlações foi realizada com recurso à determinação do coeficiente de produto momento de Pearson ( $r$ ), e a significância estatística foi determinada com recurso ao teste  $t$  de Student. Para a elaboração destes estudos foi utilizado o programa IBM® SPSS® Statistics versão 20.0.0.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Mostos produzidos

Os mostos produzidos foram exaustivamente analisados segundo os métodos analíticos descritos. A Tabela 10 apresenta os resultados das análises realizadas aos mostos obtidos.

**Tabela 10 – Principais características dos mostos produzidos. Os resultados de FAN (mg/L) do mosto foram obtidos com uma taxa de recuperação de 93%.**

Característica	Unidade	Pewter	Prestige	Braemar	Esterel	Composto	Teste
<b>Extrato aparente (°P)</b>	%P	15,78	15,93	15,83	15,04	15,11	15,74
<b>pH</b>		4,89	4,86	5,13	5,02	4,97	5,05
<b>Coloração</b>	EBC	7,6	6,3	10,5	7,7	7,1	12,9
<b>Amargor</b>	UA	38	36	39	39	36	40
<b>Extrato Aparente Limite</b>	%(p/v)	2	2,64	2,56	1,99	2,02	2,09
<b>Atenuação Real Limite</b>	%	71,3	68,4	68,7	70,9	70,8	70,9
<b>FAN Malte (mosto laboratorial)</b>	mg/100g	136	112	153	139	136	135
<b>FAN Mosto</b>	mg/l	195	165	236	191	186	245

A análise da Tabela 10 mostra que todos os mostos em análise apresentam um valor de extrato entre os 15 °P e os 16 °P, o que indica que os fabricos de mosto foram bem sucedidos em atingir a especificação de extrato. Verifica-se que os valores de FAN (mg/L), com uma média de 195 mg/L, e com um desvio padrão de 23 mg/L são um fator que apresenta variabilidade. Os valores de FAN (mg/L) apresentados nos mostos mono-málticos e no mosto Composto apresentam-se ligeiramente abaixo do estabelecido na literatura como concentração ideal de FAN (mg/L) para mostos de extrato superior a 14 °P. O valor ideal seria uma concentração superior a 200 mg/L. (2, 21, 32, 33)

A Tabela 11 apresenta os valores de concentração de aminoácidos verificados para cada um dos mostos.

Tabela 11 – Concentração de aminoácidos dos mostos utilizados neste trabalho. A divisão por classes foi realizada segundo a classificação de Jones e Pierce (1967) (24)

Aminoácido	Classe	Uni.	Braemar	Pewter	Composto	Esterel	Prestige
Arginina	A	mg/l	140	129	122	139	118
Aspartato	A	mg/l	89	89	81	80	84
Glutamato	A	mg/l	80	85	71	68	68
Lisina	A	mg/l	97	92	87	93	82
Serina	A	mg/l	93	72	68	71	63
Treonina	A	mg/l	80	68	62	65	58
Histidina	B	mg/l	56	47	46	49	43
Isoleucina	B	mg/l	83	67	63	65	55
Leucina	B	mg/l	161	128	126	137	105
Metionina	B	mg/l	40	34	33	35	29
Valina	B	mg/l	149	121	111	118	98
Alanina	C	mg/l	108	88	84	88	86
Fenilalanina	C	mg/l	153	119	116	131	97
Glicina	C	mg/l	49	41	35	37	39
Tirosina	C	mg/l	112	88	87	99	76
<b>AA Totais Classe A</b>		mg/l	579	535	491	516	473
<b>AA Totais Classe B</b>		mg/l	489	397	379	404	330
<b>AA Totais Classe C</b>		mg/l	422	336	322	355	298
<b>Total</b>		mg/l	1491	1266	1192	1275	1105

A Tabela 12, que indica a concentração de iões e ácido oxálico nos mostos produzidos na instalação piloto, permite analisar a influência que estes podem ter na fermentação e no produto final. Estes iões provém das matérias-primas de origem vegetal e da água utilizada no fabrico do mosto. A presença de iões no mosto é dependente de vários fatores que podem influenciar a sua biodisponibilidade: a conjugação de espécies iónicas no mosto, a presença de várias espécies do mesmo elemento, a presença de elementos quelantes e as condições utilizadas para produzir o mosto. (52-54)

Dos iões analisados, os iões potássio, magnésio, zinco e cálcio são os mais importantes relativamente à nutrição iónica da levedura. (10, 53, 54)

O magnésio atua principalmente no meio intracelular, onde é necessário na atividade de mais de 300 enzimas. Este ião desempenha funções ao nível da estabilização dos ácidos nucleicos e ribossomas além de possuir um papel central no controlo do ciclo celular. O limite de concentração mínimo é de 43 mg/L, verificando-se a presença em concentração adequada deste ião nos mostos em análise. (10, 53, 55)

**Tabela 12 – Resultado da análise dos mostos produzidos na instalação piloto relativamente à presença de iões e ácido oxálico.**

<b>Ião</b>	<b>Uni.</b>	<b>Braemar</b>	<b>Pewter</b>	<b>Composto</b>	<b>Esterel</b>	<b>Prestige</b>
<b>Cálcio (Ca<sup>2+</sup>)</b>	mg/l	27,69	49,27	35,37	23,91	48,46
<b>Magnésio (Mg<sup>2+</sup>)</b>	mg/l	94,5	87,4	82,5	85,1	83,3
<b>Sódio (Na<sup>+</sup>)</b>	mg/l	104,5	73,7	104,0	84,1	92,0
<b>Potássio (K<sup>+</sup>)</b>	mg/l	701	678	608	555	635
<b>Cloreto (Cl<sup>-</sup>)</b>	mg/l	319	408,4	366,5	307,6	393,2
<b>Sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)</b>	mg/l	16,7	100,8	99,1	90,1	88,1
<b>Nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</b>	mg/l	4,20	9,30	6,60	5,90	9,40
<b>Ác. oxálico livre (H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)</b>	mg/l	36,2	19,7	18,5	31,0	19,1
<b>Cobre (Cu<sup>2+</sup>)</b>	µg/l	115,0	83,0	78,0	73,0	89,0
<b>Ferro (Fe<sup>++</sup>)</b>	µg/l	243	191	198	167	147
<b>Zinco (Zn<sup>2+</sup>)</b>	µg/l	590	440	450	790	550

O zinco, tal como o magnésio, encontra-se presente em mais de 300 enzimas, entre as quais se destaca a etanol desidrogenase. Proteínas com “dedos de zinco” possuem atividade na regulação da expressão genética e na protecção do material genético de danos oxidativos, verificando-se influência na fluidez da membrana e no complexo de Golgi. Baixos níveis de zinco têm como consequência a diminuição do metabolismo celular e a diminuição da síntese proteica, podendo até originar a ocorrência de uma fermentação parada. A concentração mínima descrita na literatura, o ponto em que a performance fermentativa é afetada pelo défice deste elemento, encontra-se nas 100 µg/L. Assim, conclui-se que não existe défice nutricional de zinco nos mostos em análise. (7, 53, 56-58)

O potássio, também ele utilizado como cofator enzimático, encontra-se em enzimas relacionadas com a síntese proteica, e o metabolismo de hidratos de carbono. Este elemento é ativo nos processos de obtenção de fósforo por parte das células. Segundo os estudos de Jones e colaboradores (1984) (59), o potássio deve encontrar-se numa concentração mínima de 78 mg/L para garantir uma performance fermentativa adequada, concentração que é largamente ultrapassada nos mostos em análise. (55, 59)

O cálcio é um dos iões de maior relevância na indústria cerveira. No fabrico de mosto, a presença deste ião permite favorecer a atividade enzimática. Durante o processo fermentativo, o cálcio é um elemento interveniente no processo de floculação ao

estabilizar os centros de ligação entre lectinas e hidratos de carbono da membrana. A influência deste ião em etapas pós-fermentação, deve-se à reacção entre este catião e o ião oxalato. O cálcio possui a concentração mínima aceitável em cerca de 15 mg/L. Desta forma, verifica-se a presença deste elemento em concentração adequada nos mostos em análise. (7, 10, 52, 53)

A análise de outros iões, além do controlo do equilíbrio iónico adequado no meio fermentativo, têm o objectivo de avaliar o impacto da concentração nas propriedades organoléticas, podendo variar as especificações entre cervejas diferentes. Os iões cloreto, sulfato e sódio conferem à cerveja um sabor salgado/amargo, além da possível utilização do enxofre para a produção de compostos indesejáveis. A concentração máxima do ião cloreto no meio de cultura é de cerca de 150 mg/L, verificando-se valores elevados em todos os mostos analisados. A concentração de sulfato deve encontrar-se entre 10 e 250 mg/L e a concentração do ião sódio deve encontrar-se abaixo de 150 mg/L, critérios cumpridos pelos mostos do teste. (7, 8)

O ião nitrato, ao ser reduzido a nitrito por leveduras contaminantes, pode originar a produção de compostos tóxicos. Este ião apresenta também um efeito inibitório no desenvolvimento da levedura. A concentração máxima no meio de cultura é comum a ambos os efeitos, e não deve ser superior a 50 mg/L, parâmetro que é cumprido neste trabalho. (8, 52)

A presença de ferro, nos seus vários estados de oxidação, afeta o normal desenvolvimento da levedura e origina a formação de sabores inadequados ao paladar do produto final quando encontrado em concentrações superiores a 1 mg/L. Como é possível verificar, os mostos analisados apresentam concentrações deste elemento na ordem das 0,2 mg/L, pelo que é possível afirmar que o ferro não afeta negativamente o processo fermentativo nem a qualidade do produto final. (8, 52)

O ião cobre, tradicional causador de problemas durante a fermentação devido à utilização de tubagens e equipamentos de cobre, que promoviam a migração deste elemento para o meio fermentativo, causa sérios problemas à performance fermentativa. Este elemento é mutagénico e tóxico para a levedura, além de poder causar instabilidade organolética e causar turvação. O mosto não deve conter mais de 100 µg/L de forma a manter os critérios de qualidade, no entanto verifica-se que o efeito inibidor na levedura se verifica a partir de 10 mg/L. As concentrações deste ião evidenciadas nos mostos não se

encontram em concentração suficiente para causar repercussões na performance fermentativa. (8, 52)

O ácido oxálico é proveniente do malte e dos adjuntos utilizados para a produção da cerveja. Este ácido dicarboxílico tem uma elevada afinidade para íons cálcio, originando a formação de precipitados que têm o potencial de causar elevada turvação no produto final e uma formação indesejada de espuma. Assim, deve encontrar-se no produto final em concentrações inferiores a 15 mg/L, verificando-se que os mostos produzidos têm o potencial de desenvolver turbidez elevada, já que apresentam elevadas concentrações deste ácido. (7, 8, 52, 60, 61)

A Tabela 13 mostra a relação existente entre a análise das matérias primas e o resultado das análises aos mostos, exceto o mosto teste.

**Tabela 13 – Coeficiente de produto momento de Pearson (r), existente entre análises realizadas às matérias-primas e as análises realizadas aos mostos obtidos. \* e \*\* indicam significância a um nível de probabilidade de  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , respetivamente.**

	<b>FAN Malte (mg/100g)</b>	<b>FAN Mosto (mg/L)</b>	<b>AA Totais (mg/L)</b>	<b>Proteína solúvel (%)</b>	<b>Proteína total (%)</b>	<b>Índice de Kolbach</b>
<b>FAN Malte (mg/100g)</b>	1,00					
<b>FAN Mosto (mg/L)</b>	0,92*	1,00				
<b>AA Totais (mg/L)</b>	0,91*	0,99**	1,00			
<b>Proteína solúvel (%)</b>	0,98**	0,94*	0,94*	1,00		
<b>Proteína total (%)</b>	0,77	0,86	0,87	0,87	1,00	
<b>Índice de Kolbach</b>	0,50	0,24	0,22	0,34	-0,18	1,00

A análise da Tabela 13 mostra as correlações existentes entre parâmetros analisados nas matérias-primas e no mosto. Os resultados obtidos neste são semelhantes aos obtidos no estudo de Nie (2010) (13).

Como é possível verificar, o FAN do malte (mg/100g), apresenta correlações superiores a 0,90 com três parâmetros: a percentagem de proteína solúvel, a concentração de aminoácidos total (mg/L) e a concentração de FAN do mosto (mg/L). A relação com a percentagem de proteína solúvel apresenta um *p-value*  $< 0,01$ , enquanto as duas restantes relações apresentam um *p-value*  $< 0,05$ .

A relação entre o FAN do mosto (mg/L) e o FAN do malte (mg/100g) mostra que, apesar de a variabilidade consequente da produção do mosto, a produção de *congress mash*, ou mosto laboratorial, permite obter uma correlação elevada e estatisticamente significativa (*p-value* <0,05) entre ambos os líquidos. Este facto indica que a utilização do FAN (mg/L) para análise das matérias-primas é adequada como método de previsão aproximado da concentração de azoto fermentável no mosto.

A proteína solúvel, por sua vez, apresenta correlações superiores a 0,90, com *p-value* <0,05 com o FAN do mosto e os aminoácidos totais. Esta correlação é previsível, já que os elementos analisados pelo método da ninidrina, aminoácidos e pequenos péptidos, correspondem à componente proteica solúvel das matérias-primas após a etapa de proteólise durante a produção de mosto. Neste caso verificou-se que os maltes com maior percentagem de proteína solúvel também apresentaram uma maior concentração de FAN (mg/L). (8, 62)

A correlação mais elevada existente da Tabela 13 ocorre entre a concentração de aminoácidos total (mg/L) e o FAN do mosto (mg/L), verificando-se elevada significância estatística (*p-value* <0,01). Dadas as características do método de análise utilizado e os aminoácidos analisados neste teste é possível afirmar que o método de análise de FAN utilizado é adequado para a avaliação da presença de compostos azotados no mosto.

### 3.2 Fermentações EBC

Os seis mostos em análise foram fermentados em duas séries, isto é, em duplicado. As Figuras 12 a 18 mostram os principais resultados, e os Anexos C2 a C7 apresentam os resultados individuais de cada fermentação.

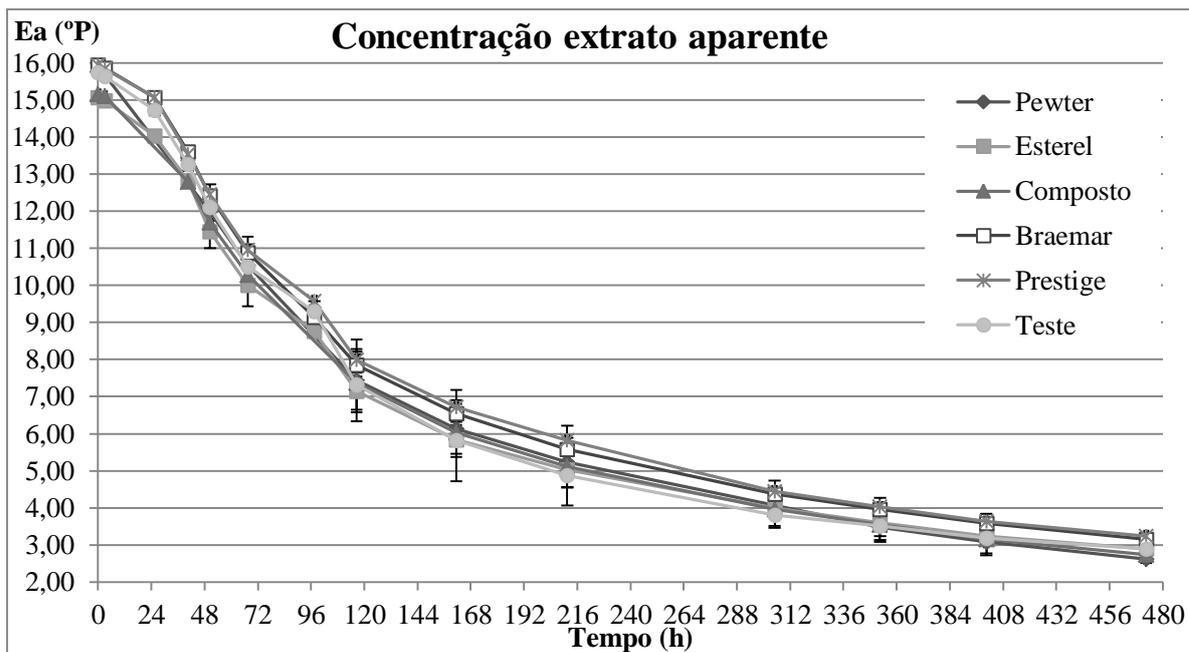


Figura 12 – Variação da concentração de extrato aparente (°P) nas 6 fermentações realizadas

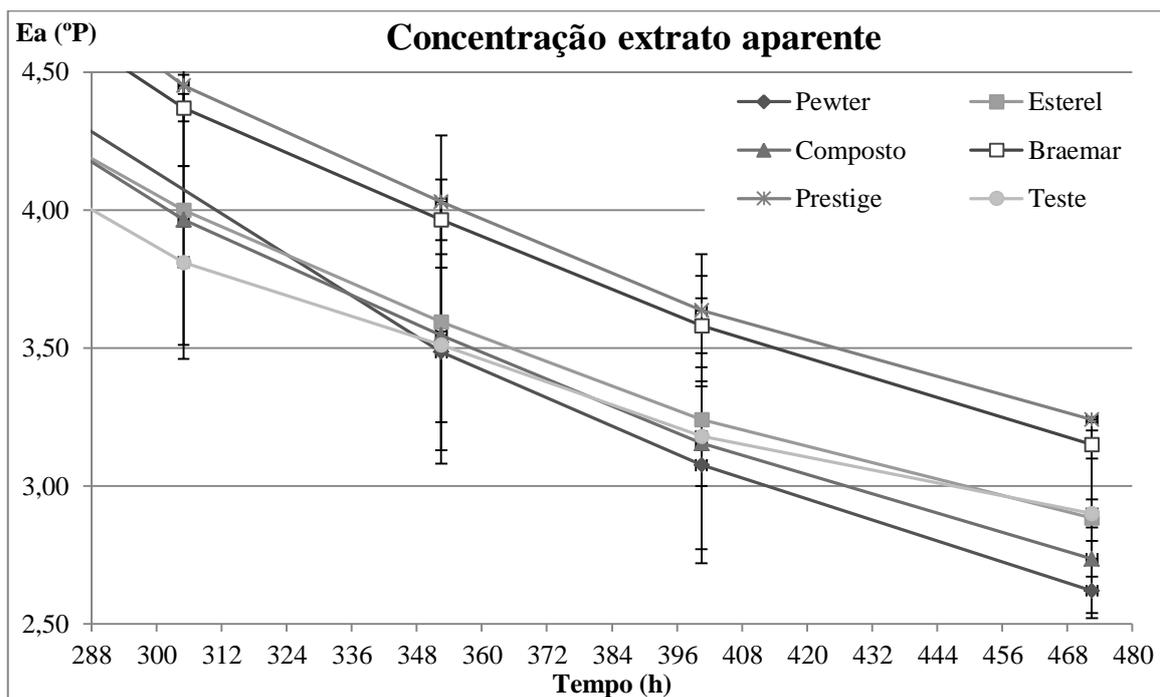


Figura 13 - Pormenor da variação da concentração de extrato aparente (°P) no final das fermentações

A análise da Figura 12 mostra que em todas as fermentações ocorreu consumo de extrato. As fermentações foram terminadas no dia 20, momento em que foi verificado um consumo de extrato inferior a 0,2 °P/dia e, portanto, foi atingido o extrato mínimo. Verifica-se que todas as fermentações atingiram um valor de extrato final inferior a

3,25 °P. No entanto, a Figura 13 permite verificar que a menor concentração de extrato foi atingida na fermentação Pewter, seguida pelas fermentações Composto, Esterel, Teste, Braemar e, por fim, Prestige.

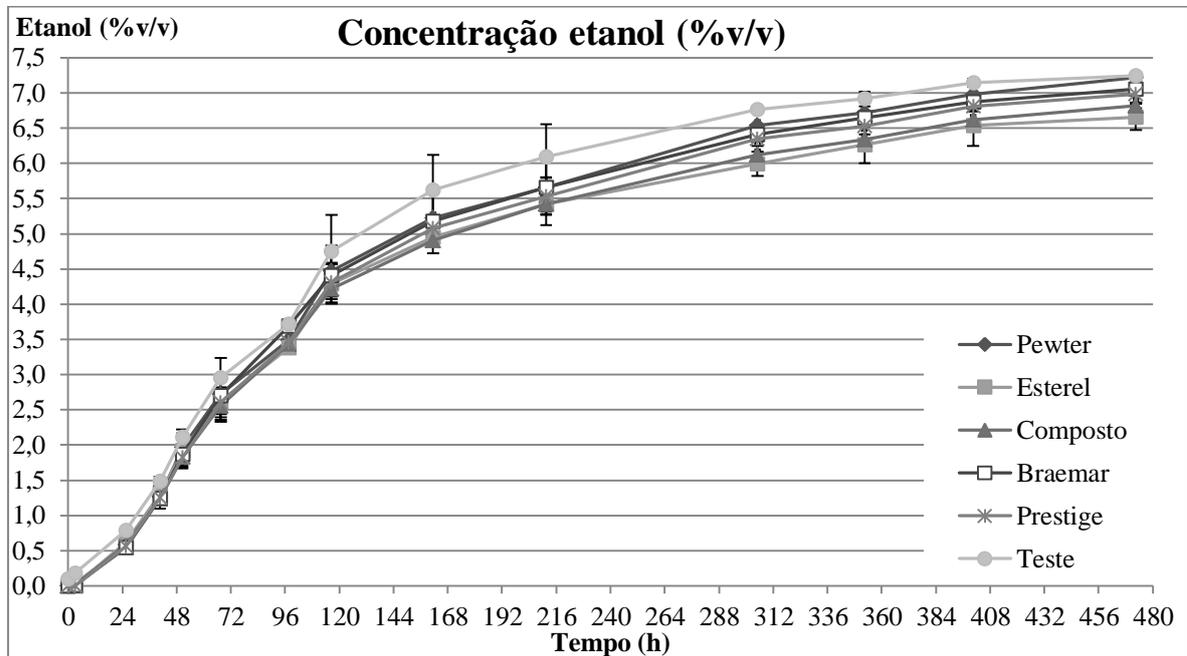


Figura 14 – Variação da concentração de etanol nas 6 fermentações realizadas

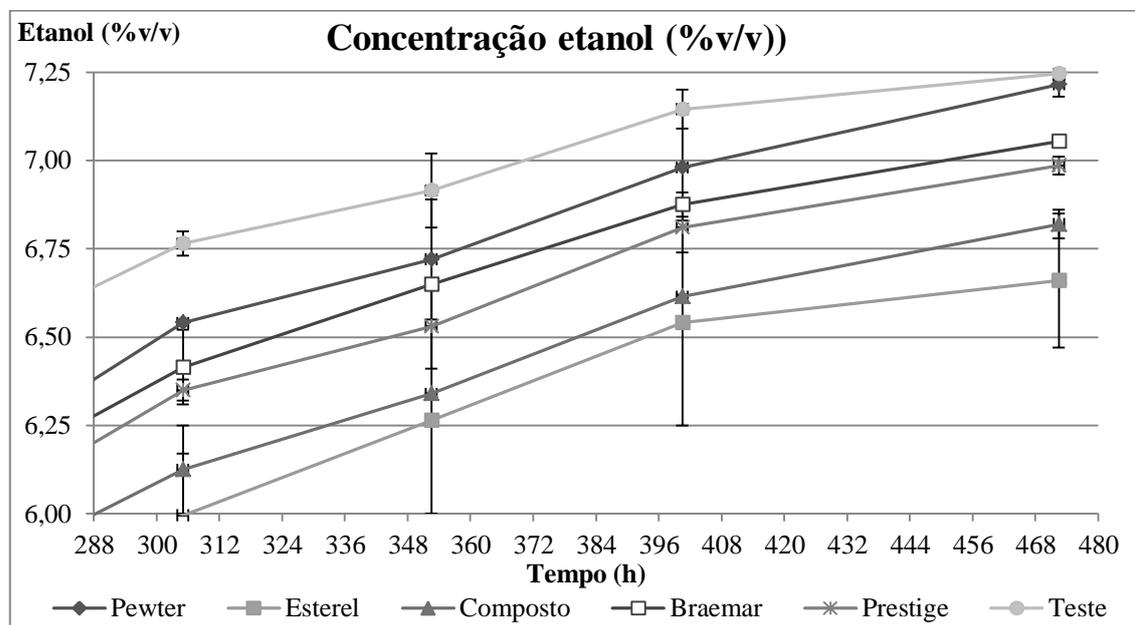


Figura 15 - Pormenor da variação da concentração de etanol (%v/v) no final das fermentações

A análise da Figura 14 mostra que a concentração máxima de etanol (%v/v) foi atingida no último dia de fermentação. Os dados apresentados na Figura 15 mostram que a

fermentação codificada Teste atingiu a maior concentração de etanol, seguida pela fermentação Pewter, Braemar, Prestige, Composto e Esterel, respectivamente.

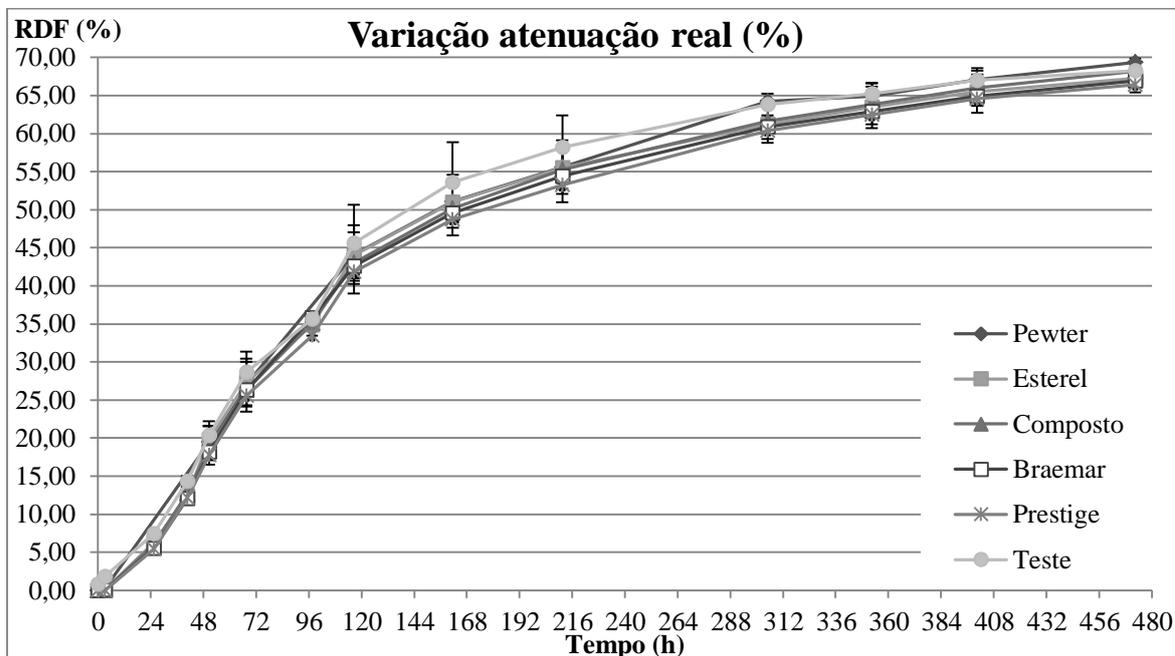


Figura 16 – Variação da atenuação real (%) nas 6 fermentações realizadas

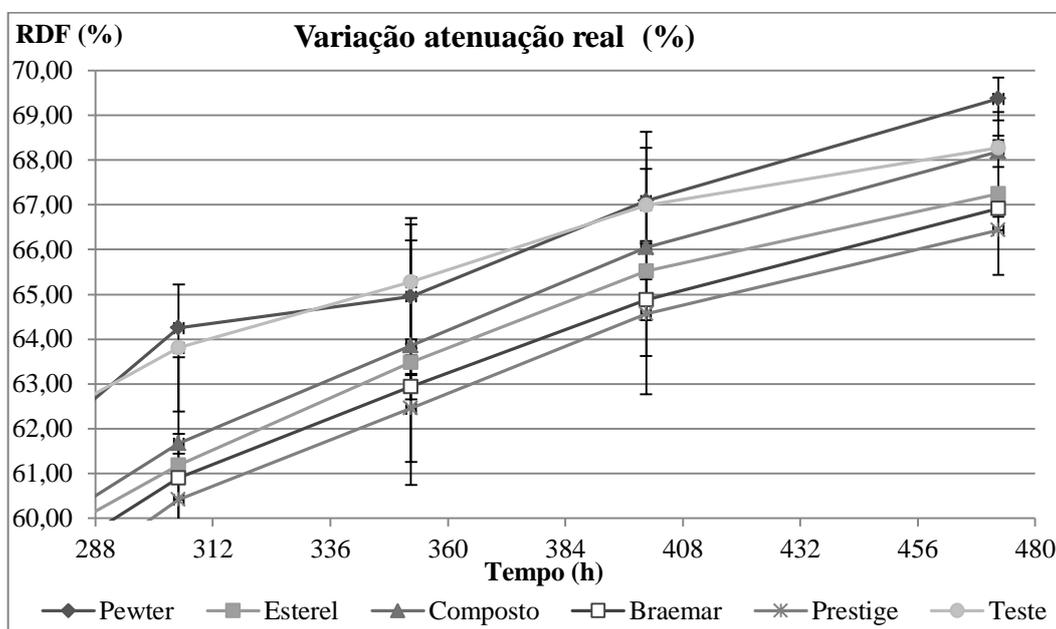


Figura 17 – Pormenor da variação da atenuação real (%) no final das fermentações

A análise das Figuras 16 e 17 mostra que a atenuação real (%), que é um parâmetro calculado a partir da concentração de extrato (°P) e da concentração de etanol (%v/v), atinge o limite máximo às 472 horas, o final da fermentação. Verifica-se que a

fermentação Pewter atingiu o maior valor de atenuação, seguida da fermentação Teste, Composto, Esterel, Braemar e Prestige respectivamente.

A Figura 18 mostra como variou a biomassa ao longo da segunda série de fermentações.

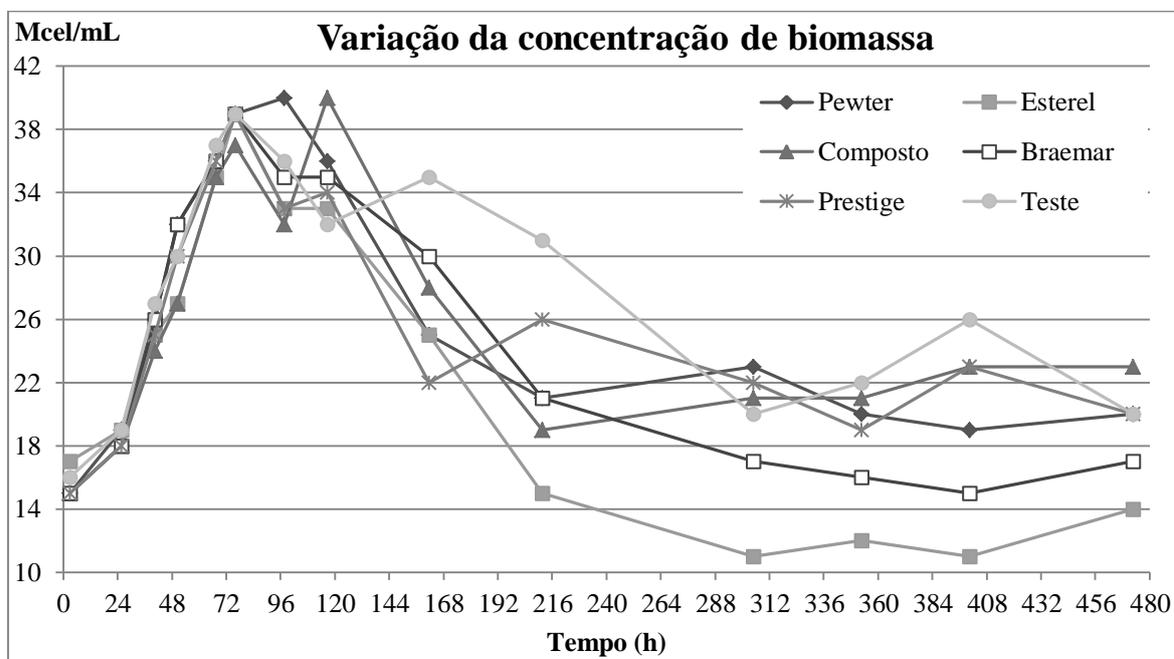


Figura 18 - Variação da concentração de biomassa (milhões de células/mL) da 2ª série de fermentações, avaliada recorrendo a um Coulter Counter.

A análise da variação da biomassa permite diferenciar as fases de desenvolvimento da fermentação, que se encontram descritas na Tabela 14, e identificar o desenvolvimento de biomassa durante a fase exponencial, na Tabela 15.

Tabela 14 – Resultado da análise de resultados para determinar as fases de desenvolvimento das fermentações realizadas,

Fase de desenvolvimento	Intervalo
Fase lag (horas)	[0;25,5[
Fase exponencial (horas)	]25,5;67,5[
Fase de desaceleração (horas)	]67,5;76[
Fase lag (horas)	]76;472,5[

Tabela 15 – Dados de desenvolvimento da biomassa na fase exponencial, verificados na série 2, obtidos a partir do tratamento de dados da variação da biomassa

	$\mu_{max}(h^{-1})$	$r^2$
<b>Pewter</b>	$1,38 \times 10^{-2}$	0,94
<b>Esterel</b>	$1,39 \times 10^{-2}$	0,99
<b>Composto</b>	$1,43 \times 10^{-2}$	0,98
<b>Braemar</b>	$1,46 \times 10^{-2}$	0,92
<b>Prestige</b>	$1,50 \times 10^{-2}$	0,97
<b>Teste</b>	$1,38 \times 10^{-2}$	0,95

O estudo dos dados apresentados na Figura 18 mostra que as fermentações apresentam fases de desenvolvimento que podem ser associadas à informação apresentada na Tabela 14. A fase exponencial, que ocorre entre as 25,5 horas e as 67,5 horas indica que este é o intervalo de tempo onde ocorre o desenvolvimento mais intenso. A Tabela 15, que mostra a taxa de crescimento máxima de biomassa mostra que a fermentação Prestige é a que apresenta o maior desenvolvimento durante a fase exponencial, enquanto a fermentação Pewter se mostrou como a que sofre menor desenvolvimento, a par com a fermentação Teste.

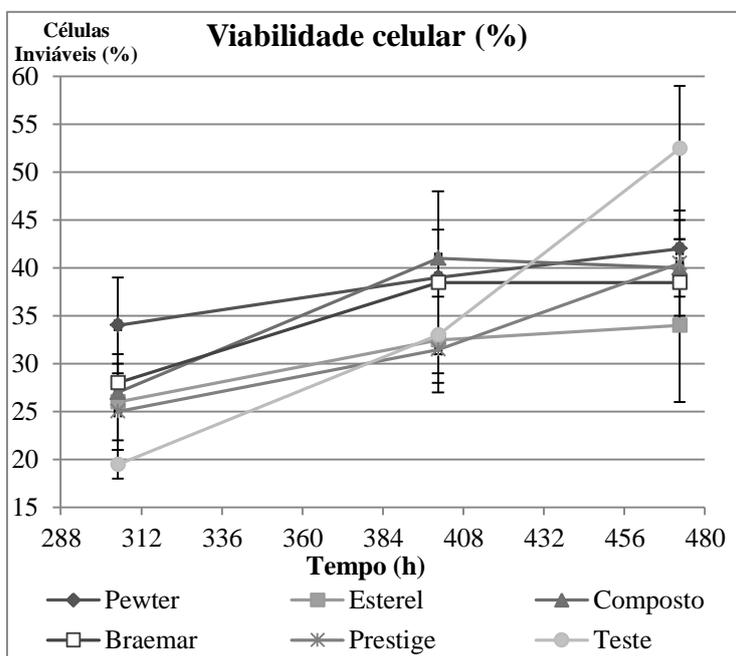


Figura 19 – Variação da porcentagem de viabilidade celular, através da representação da porcentagem de células inviáveis, durante as últimas 167,5 horas de fermentação, aproximadamente 7 dias.

Tabela 16 – Percentagem final de viabilidade celular

Mosto	Células inviáveis (%)
Pewter	42±3
Esterel	34±8
Composto	40±3
Braemar	39±5
Prestige	41±6
Teste	53±7

A viabilidade celular é uma indicação da capacidade das células em resistir às condições de stress presentes no final da fermentação. A Figura 19 mostra um aumento da porcentagem de células inviáveis ao longo das últimas 167,5 horas de fermentação. Esta evolução é explicada pelo aumento da concentração de etanol (%v/v) e devido à exaustão nutricional do meio fermentação. (8, 31, 63)

A Tabela 16 indica, pormenorizadamente, a percentagem de células inviáveis obtida no final das fermentações. Destaca-se a elevada percentagem de células inviáveis verificada na fermentação Teste, 53%, ao contrário da fermentação Esterel, que possui a menor percentagem de células inviáveis, 34%. As restantes fermentações apresentam

valores de células inviáveis próximo de 40%. Na Tabela 17, que apresenta os resultados finais das fermentações realizadas, é possível verificar que a fermentação Esterel possui uma concentração extrato final inferior à verificada na fermentação Teste. No entanto, a fermentação Teste apresenta a maior concentração de etanol (%v/v) do teste, o que pode indicar que este parâmetro é mais influente na viabilidade celular no fim da fermentação. (38, 64-66)

**Tabela 17 – Resultados finais das fermentações realizadas. A determinação de FAN foi realizada com 91% de taxa de recuperação.**

	<b>Pewter</b>	<b>Esterel</b>	<b>Composto</b>	<b>Braemar</b>	<b>Prestige</b>	<b>Teste</b>
<b>Extrato Final (°P)</b>	2,62±0,10	2,89±0,35	2,74±0,07	3,15±0,01	3,24±0,01	2,90±0,05
<b>Etanol (%v/v)</b>	7,22±0,04	6,66±0,19	6,82±0,04	7,06±0,01	6,99±0,03	7,25±0,02
<b>Etanol (%v/v)/ Extrato (°P)</b>	5,49 x10 <sup>-01</sup>	5,48 x10 <sup>-01</sup>	5,51 x10 <sup>-01</sup>	5,57 x10 <sup>-01</sup>	5,51 x10 <sup>-01</sup>	5,65 x10 <sup>-01</sup>
<b>Diacetilo (100*mg/L)</b>	5,0±1,3	7,0±1,9	5,6±0,1	7,3±1,5	6,4±0,7	7,1±0,2
<b>Atenuação real (%)</b>	69,37±0,48	67,25±1,82	68,20±0,35	66,92±0,19	66,44±0,01	68,27±0,18
<b>FAN final (mg/L)</b>	99±10	104±2	103±1	153±9	78±0	167±3
<b>FAN consumido (mg/L)</b>	95	87	83	83	87	78
<b>FAN restante (%)</b>	51%	54%	55%	65%	47%	68%
<b>μ<sub>max</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>	1,38x10 <sup>-02</sup>	1,39 x10 <sup>-02</sup>	1,43 x10 <sup>-02</sup>	1,46 x10 <sup>-02</sup>	1,50 x10 <sup>-02</sup>	1,38 x10 <sup>-02</sup>

A análise da Tabela 17, graficamente representada nas Figuras 20 e 21 mostra que a fermentação onde ocorreu o maior consumo de FAN (mg/L), a fermentação do mosto

Pewter, foi também aquela que atingiu o valor mais elevado de atenuação real (%) e o menor valor de extrato aparente (°P) considerando todos os mostos, e a maior concentração de etanol (%v/v) de entre os mostos, exceto o Teste. O mosto Braemar e o mosto Teste, apesar de serem os mostos com maior concentração de FAN (mg/L) não apresentam uma performance superior ao mosto Pewter. Isto indica que existem fatores adicionais a influenciar a performance fermentativa além da concentração de FAN (mg/L).

A fermentação Prestige apresentou o valor mais elevado de extrato aparente final (°P) e o menor valor de atenuação real (%). Apesar de não ter sido a fermentação com menor teor de etanol (%v/v) considera-se que esta foi a fermentação com pior performance do teste, em contraste com a fermentação Pewter.

A concentração de FAN (mg/L) no final do processo fermentativo é de cerca de metade do valor inicial em todos os mostos do teste. Desta forma é possível afirmar que não ocorreu déficit nutritivo de azoto que pudesse influenciar a performance em nenhuma das fermentações realizadas, isto é, apesar da variação de performance, nenhuma das fermentações se mostra como uma fermentação parada.

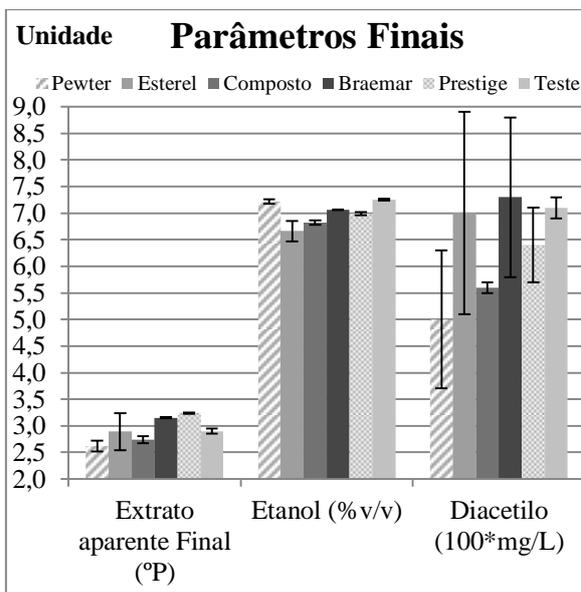


Figura 20 – Representação gráfica dos resultados finais das fermentações realizadas

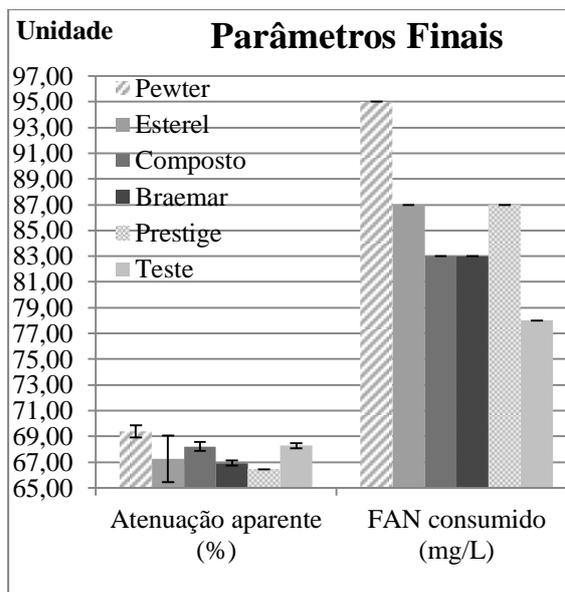


Figura 21 - Representação gráfica dos resultados finais das fermentações realizadas

O mosto Composto é uma mistura dos quatro maltes diferentes analisados individualmente neste trabalho. Como foi possível verificar, esta fermentação não se encontra nos extremos de performance, isto é, não foi a fermentação que evidenciou a pior performance (fermentação Prestige), nem foi a melhor (fermentação Pewter). Esta fermentação apresentou o segundo melhor valor de atenuação real (%), o que é conivente

com a percentagem de 45% de malte Pewter utilizado para a produção deste mosto. Este facto demonstra como a mistura de lotes de matérias-primas influencia, neste caso positivamente, a performance fermentativa dos mostos produzidos.

A realização de testes com variação das percentagens de mistura em novos mostos permitiria quantificar as alterações provocadas na performance de fermentação em função das percentagens utilizadas.

O mosto Teste e o mosto Composto apresentam um valor de atenuação real (%) muito próximo, o que demonstra a existência de semelhanças entre dois mostos com misturas de matérias-primas de aplicação industrial. Apesar da semelhança na atenuação real (%), o mosto Composto fermentou uma maior quantidade de extrato do meio, enquanto o mosto Teste produziu uma maior quantidade de etanol.

### 3.3 Análise de perfil de aminoácidos

Os resultados apresentados na Tabela 11 permitem avaliar o perfil de aminoácidos dos mostos em análise na sua globalidade, como se encontra graficamente na Figura 22.

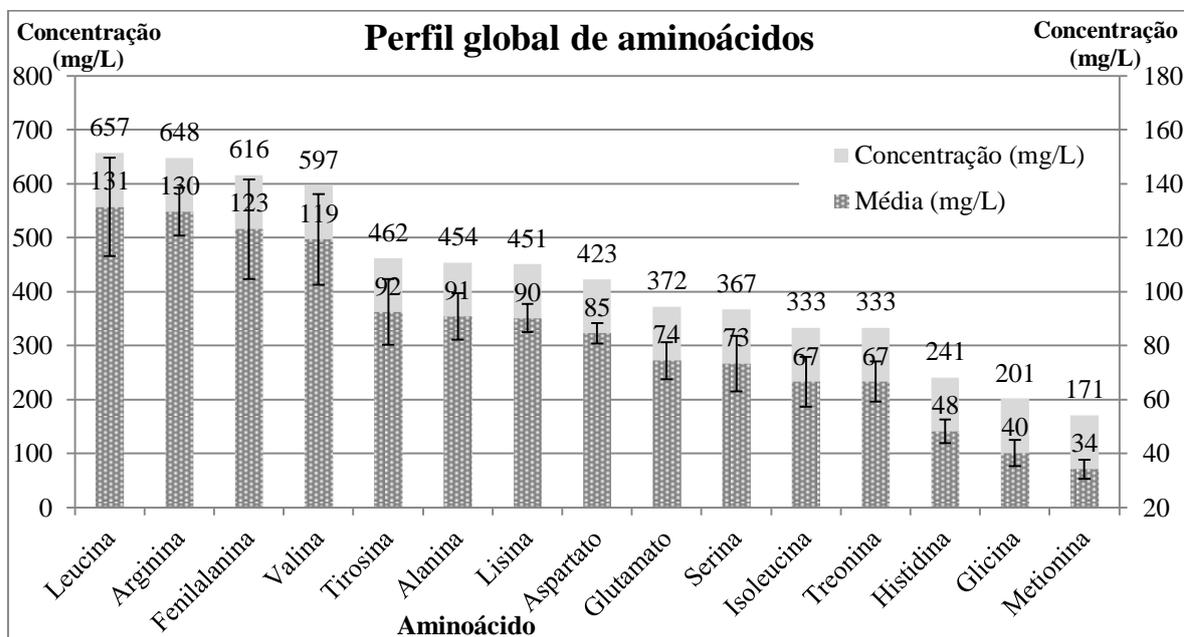


Figura 22 – Perfil global de aminoácidos. A série concentração representa o somatório das concentrações de aminoácidos nos 5 mostos não industriais em análise, enquanto a série média representa a média das concentrações de cada aminoácido.

A análise da Figura 22 permite verificar, por exemplo, que os aminoácidos mais abundantes nas matérias-primas são a leucina, a arginina e a fenilalanina, enquanto os

menos abundantes são a histidina, a glicina e a metionina. A série Média (mg/L) é apresentada com os respectivos desvios padrão, o que mostra a existência de variabilidade nas concentrações de aminoácidos (mg/L) entre os mostos analisados.

A Figura 23 mostra os aminoácidos analisados distribuídos segundo as classes indicadas por Jones e Pierce (1964). (24)

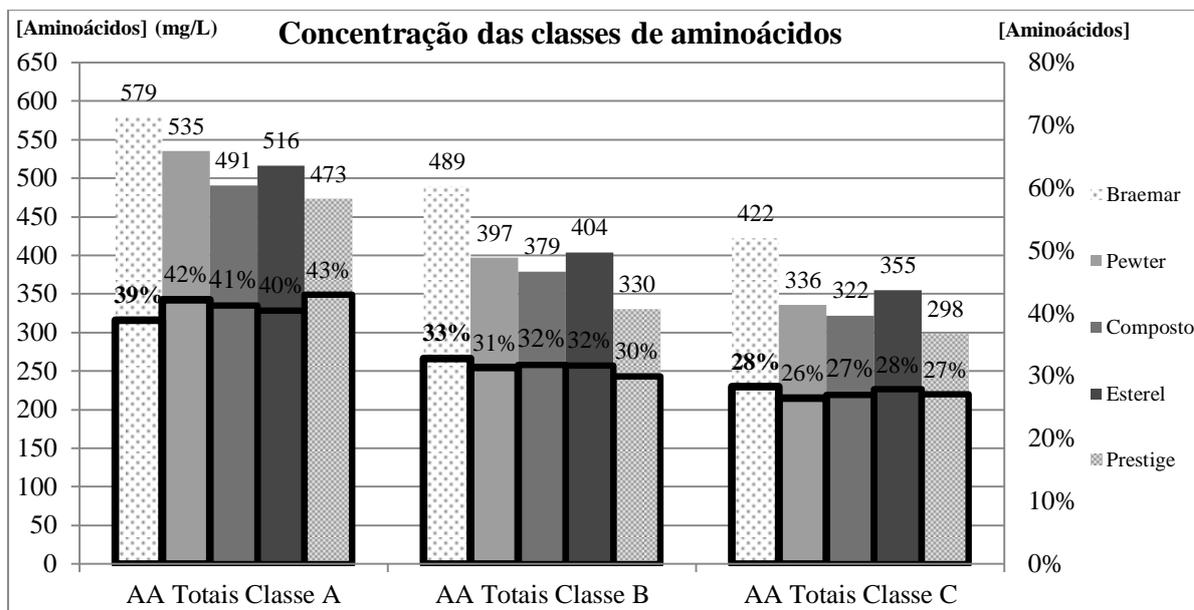


Figura 23 – Distribuição da concentração de aminoácidos pelas diferentes classes de aminoácidos segundo a classificação de Jones e Pierce (1964) (24) em termos absolutos e em percentagem da concentração total.

Como é possível verificar na Figura 23, a classe mais representada em todos os mostos é a classe A, seguida pela classe B e C, respetivamente. Em termos absolutos verifica-se que o mosto Braemar é aquele que apresenta a maior concentração de aminoácidos da classe A, no entanto, em percentagem do total, é aquele que apresenta a menor percentagem de aminoácidos da classe A e maior percentagem de aminoácidos de classe B e C. Este resultado mostra que o perfil de aminoácidos de um mosto pode ser distinto do resultado de concentração absoluta.

A Tabela 18 apresenta os resultados do coeficiente de produto momento de Pearson entre os resultados finais de fermentação, enquanto a Tabela 19 apresenta a mesma relação entre os resultados finais de fermentação e a concentração de aminoácidos. O coeficiente de produto momento de Pearson ( $r$ ) indica a existência de relações lineares, positivas ou negativas, entre dois parâmetros em que um é independente e o outro dependente. Um valor de Pearson igual a 0 indica que não existe correlação linear,

enquanto valores de -1 e 1 indicam a existência de correlação com declive negativo e positivo, respetivamente.

Tabela 18 – Cálculo do coeficiente de produto momento de Pearson (r) de forma a definir a extensão de uma relação linear entre os resultados finais das fermentações. \* e \*\* indicam significância a um nível de probabilidade de *p-value* <0,05 e *p-value* <0,01, respetivamente. n=5

	Etanol (%v/v)	Atenuação real (%)	Extrato aparente (°P)	Diacetilo (mg/L)	Células inviáveis (%)	Total alcoóis (mg/L)	Total ésteres (mg/L)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	Etanol (%v/v) / Extrato ap. (°P)
Etanol (%v/v)	1								
Atenuação real (%)	0,38	1							
Extrato aparente (°P)	-0,05	<u>-0,94*</u>	1						
Diacetilo (mg/L)	-0,42	<u>-0,84</u>	0,75	1					
Células inviáveis (%)	<u>0,82</u>	0,37	-0,09	-0,66	1				
Total alcoóis (mg/L)	-0,16	0,68	-0,8	-0,65	-0,1	1			
Total ésteres (mg/L)	0,29	0,74	-0,69	<u>-0,93*</u>	0,66	0,45	1		
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,06	-0,79	<u>0,88</u>	0,44	0,26	<u>-0,81</u>	-0,27	1	
Etanol (%v/v) / Ext. ap. (°P)	0,26	-0,42	0,55	0,5	0,16	<u>-0,94*</u>	-0,28	0,61	1

Verifica-se a existência de três correlações com *p-value* <0,05. A primeira, estabelecendo a correlação entre a atenuação real (%) e o extrato aparente (°P), é um reflexo da fórmula de cálculo utilizado para determinar a atenuação real (%) de uma fermentação. A segunda estabelece a relação entre a concentração total de ésteres e a concentração final de diacetilo. Esta pode ser explicada pela influência que parâmetros de produção, como a altura e formato do reator, que influenciam a concentração de ambos estes elementos. (67)

A existência de uma correlação entre o rácio etanol produzido e extrato consumido (etanol (%v/v) / extrato aparente consumido (°P)), e a produção de álcoois

superiores indica que quanto maior a quantidade de etanol produzido por unidade de extrato consumido, menor a concentração de álcoois superiores. Este resultado pode indicar a existência de um favorecimento da utilização dos nutrientes do meio de cultura para a produção de etanol em detrimento da via metabólica de produção de álcoois superiores, o metabolismo de Ehrlich. Desta forma, ocorreu a produção de uma quantidade superior de etanol, um produto desejável, e uma diminuição da produção de álcoois superiores, produtos geralmente reconhecidos como elementos organoleticamente desfavoráveis. (8, 50, 68, 69)

Verifica-se que a concentração de etanol (%v/v) e a existência de células inviáveis (%) apresentam uma correlação positiva. Este resultado pode ser explicado por um efeito nocivo do aumento da concentração de etanol no meio e de algum efeito de limitação nutricional consequente do final de fermentação. (8, 31, 63, 64, 66)

A relação existente entre a taxa específica de crescimento durante a fase exponencial,  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ), e o extrato aparente final ( $^{\circ}\text{P}$ ) mostra que as fermentações que apresentaram o maior crescimento exponencial foram aquelas que apresentaram a maior quantidade final de extrato.

A existência de uma correlação entre a taxa de crescimento exponencial,  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ), e a concentração de álcoois superiores (mg/L) é sinal da influência, descrita na literatura, da fase exponencial de desenvolvimento na concentração destes compostos organoleticamente ativos. Neste caso, verificou-se que uma taxa de crescimento exponencial mais elevada origina a produção de uma menor quantidade de álcoois superiores (mg/L). Estes resultados são concordantes com o trabalho de Guido (2003) (69), em que as células que apresentaram um desenvolvimento mais rápido produziram menos álcoois superiores. A explicação apresentada para este resultado consiste numa maior eficiência na utilização dos nutrientes do meio, especificamente aminoácidos, nas fermentações com uma taxa de crescimento mais elevada. Assim, a produção de subprodutos da síntese de aminoácidos é menor. (7, 8, 69-71)

A relação negativa entre os resultados de atenuação real (%) e de concentração de diacetilo (mg/L) indicam que os mostos que atingiram os maiores valores de atenuação real (%) foram aqueles que obtiveram a menor concentração final de diacetilo (mg/L). Este facto é explicado, segundo Boulton e colaboradores (2001, 2008) (72, 73), como consequência do estado fisiológico das células, nomeadamente o estado da membrana

celular na parte final da fermentação, já que uma membrana celular mais saudável permite à célula remover do meio de fermentação uma maior quantidade de diacetilo. Assim, pode ser considerado que as fermentações que atingiram o maior valor de atenuação real mantiveram uma capacidade superior de remoção de dicetonas vicinais do meio de cultura. (72, 73)

A Tabela 19, que relaciona as concentrações de aminoácidos iniciais e os resultados finais de fermentação, mostra a existência de três coeficientes de Pearson com valores superiores a 0,80, dos quais apenas um apresenta um *p-value* <0,05.

Tabela 19 - Cálculo do coeficiente de produto momento de Pearson (r) de forma a definir a extensão de uma relação linear entre concentração inicial de aminoácidos e resultados finais das fermentações. \* e \*\* indicam significância a um nível de probabilidade de *p-value* <0,05 e *p-value* <0,01, respetivamente. n=5.

Aminoácidos (mg/L)	Etanol (%v/v)	Atenuação real (%)	Extrato aparente (°P)	Diacetilo (mg/L)	Células inviáveis (%)	Total alcoóis (mg/L)	Total ésteres (mg/L)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	Etanol (%v/v)/ Extrato ap. (°P)
Arginina	-0,14	-0,06	-0,01	0,58	-0,65	-0,15	-0,64	-0,39	0,25
Aspartato	<b>0,93*</b>	0,25	0,06	-0,13	0,59	-0,34	0,01	0,04	0,46
Glutamato	<b>0,83</b>	0,63	-0,39	-0,37	0,5	0	0,26	-0,38	0,24
Lisina	0,1	0,19	-0,18	0,35	-0,39	-0,14	-0,39	-0,46	0,34
Serina	0,28	-0,11	0,22	0,51	-0,13	-0,63	-0,43	0,05	0,78
Treonina	0,36	0,03	0,09	0,4	-0,09	-0,5	-0,37	-0,09	0,69
Histidina	0,09	-0,13	0,17	0,59	-0,33	-0,54	-0,52	-0,06	0,68
Isoleucina	0,27	0,03	0,06	0,41	-0,14	-0,51	-0,34	-0,1	0,71
Leucina	0,02	-0,01	0,01	0,5	-0,38	-0,41	-0,42	-0,2	0,6
Metionina	0,09	0,04	-0,02	0,46	-0,33	-0,39	-0,39	-0,22	0,59
Valina	0,27	0,03	0,05	0,42	-0,17	-0,48	-0,37	-0,13	0,67
Alanina	0,31	-0,31	0,44	0,62	-0,09	-0,76	-0,56	0,26	<b>0,84</b>
Fenilalanina	-0,01	-0,05	0,04	0,55	-0,43	-0,4	-0,48	-0,2	0,57
Glicina	0,59	-0,21	0,43	0,44	0,16	-0,69	-0,46	0,26	0,76
Tirosina	-0,08	-0,12	0,09	0,61	-0,5	-0,42	-0,55	-0,17	0,56
Total Classe A	0,38	0,13	-0,01	0,33	-0,11	-0,37	-0,36	-0,23	0,56
Total Classe B	0,16	0,01	0,04	0,47	-0,26	-0,46	-0,4	-0,15	0,65
Total Classe C	0,1	-0,14	0,18	0,6	-0,33	-0,54	-0,54	-0,05	0,68
Total AA	0,2	-0,02	0,09	0,49	-0,25	-0,48	-0,45	-0,13	0,65

A concentração de etanol (% v/v) relaciona-se com a concentração de glutamato e aspartato, verificando-se elevada significância na relação com o aspartato. Esta relação possui um valor positivo e, dado a significância existente na concentração de aspartato, é possível afirmar que a concentração destes aminoácidos pode influenciar favoravelmente a concentração final de etanol no meio de fermentação. Estes dados relacionam-se com os estudos de Thorne (1949) (50), de Watson (1976) (74), de Ingledew (1990) (38) e de Thomas (1990) (38).

Os estudos de Thorne (1949) (50) e com eco no trabalho de Thomas (1990) (38) avaliam a forma como os aminoácidos são utilizados pela célula, propondo um mecanismo de utilização direta de alguns aminoácidos, isto é, sem necessidade de recorrer a modificação estrutural posterior, para as necessidades de síntese proteica da célula. É também estabelecido um ranking relativo, com a amónia como referencial, do “valor nutritivo” dos vários aminoácidos relativamente à sua capacidade de serem incorporados na síntese proteica sem ser necessário processamento pela célula. Neste ranking, tanto o aspartato como o glutamato apresentam um elevado “valor nutritivo” para a célula. Esta teoria, proposta por Thorne (1949) (50), conjugada com o facto de ambos os aminoácidos pertencerem à classe A de assimilação pela levedura, podem fornecer uma explicação sólida para a influência que estes dois aminoácidos apresentaram na concentração de etanol (% v/v) existente no final da fermentação. Magasanik e colaboradores (2002) (20) também evidenciam no seu artigo a importância bioquímica do glutamato como base molecular para a síntese de aminoácidos, quando as fontes de azoto no meio já se encontram em menor concentração, o que demonstra a relevância que este aminoácido pode ter no desenvolvimento da fermentação. (20, 23, 24, 33, 38, 50, 74)

Verifica-se que o aminoácido alanina apresenta uma relação com o rácio entre o etanol (% v/v) produzido e o extrato aparente (°P) consumido. Dado que a alanina pertence ao grupo C na classificação de aminoácidos de Pierce (1987), este aminoácido poderá possuir um papel relevante na fase final de fermentação, momento em que fontes preferenciais de azoto já se encontram em concentração inferior ou esgotadas, e a velocidade da fermentação diminuiu. A alanina funciona como um dador de protões na reacção de Stickland, originando a produção de amónia e acetato, que podem ser utilizados pela célula nas fases finais da fermentação. (28, 50, 75-77)

A literatura científica existente refere a existência de uma relação metabólica entre os aminoácidos leucina, isoleucina e valina e a produção de dicetonas vicinais, no entanto não se verificou a existência de uma relação linear entre a concentração destes aminoácidos e a concentração final de diacetilo (mg/L). Apesar de não se verificar esta relação, durante o procedimento experimental não foram obtidos dados relativamente à produção de dicetonas vicinais ao longo da fermentação. Isto significa que a concentração final não é indicativa da produção de diacetilo ao longo da fermentação, já que a concentração final também é decisivamente influenciada pela capacidade das células de degradar o composto na fase de maturação. Independentemente da causa, verifica-se que as fermentações analisadas atingiram o limite de detecção organolético de 0,07 mg/L de concentração de diacetilo (mg/L). (8, 40, 41, 72, 73)

Dado que existem apenas três coeficientes de Pearson próximos de 1 ou -1, conclui-se que, para a amostra utilizada neste teste,  $n=5$ , não se verificou uma grande influência do perfil de aminoácidos nas variações de performance fermentativa. A exceção consiste na relação entre a concentração de etanol e a concentração de aspartato, a única relação estatisticamente significativa.

O mosto Braemar, em especial, não apresentou a melhor performance apesar de possuir a maior concentração de aminoácidos (mg/L). Isto indica que, apesar do baixo número de correlações, o perfil de aminoácidos continua a ser um parâmetro relevante e que, com o aumento do número de amostras, poderá evidenciar relações até agora desconhecidas no âmbito das fermentações realizadas na indústria cervejeira.

As Figuras 24 e 25 mostram como o perfil de aminoácidos varia, em percentagem, em cada mosto analisado.

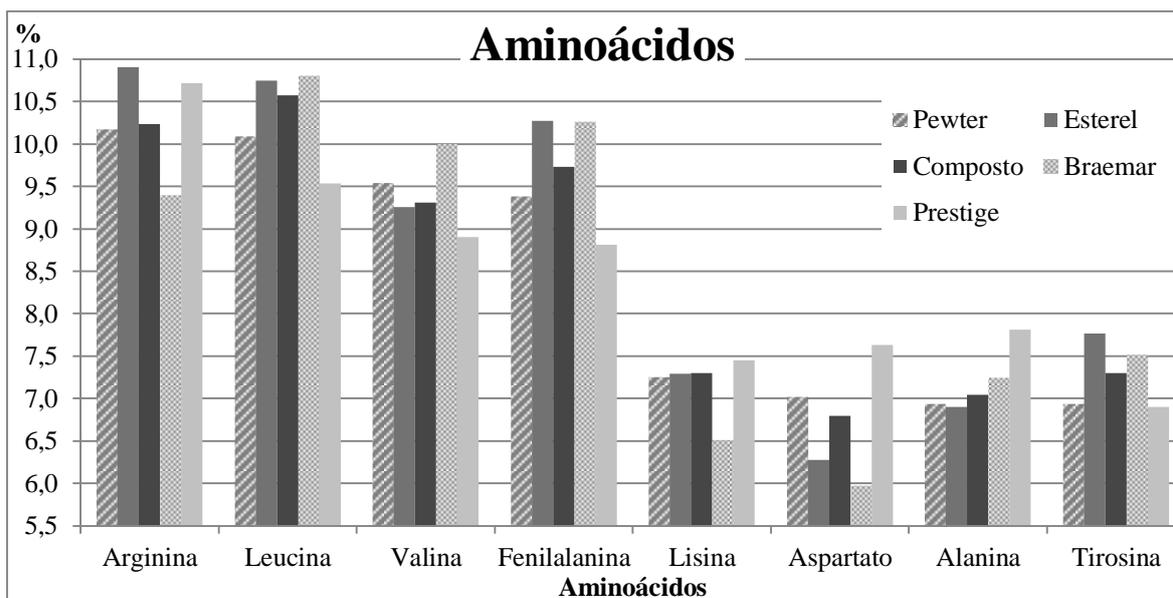


Figura 24 – Variação, em percentagem, do perfil de aminoácidos de cada mosto.

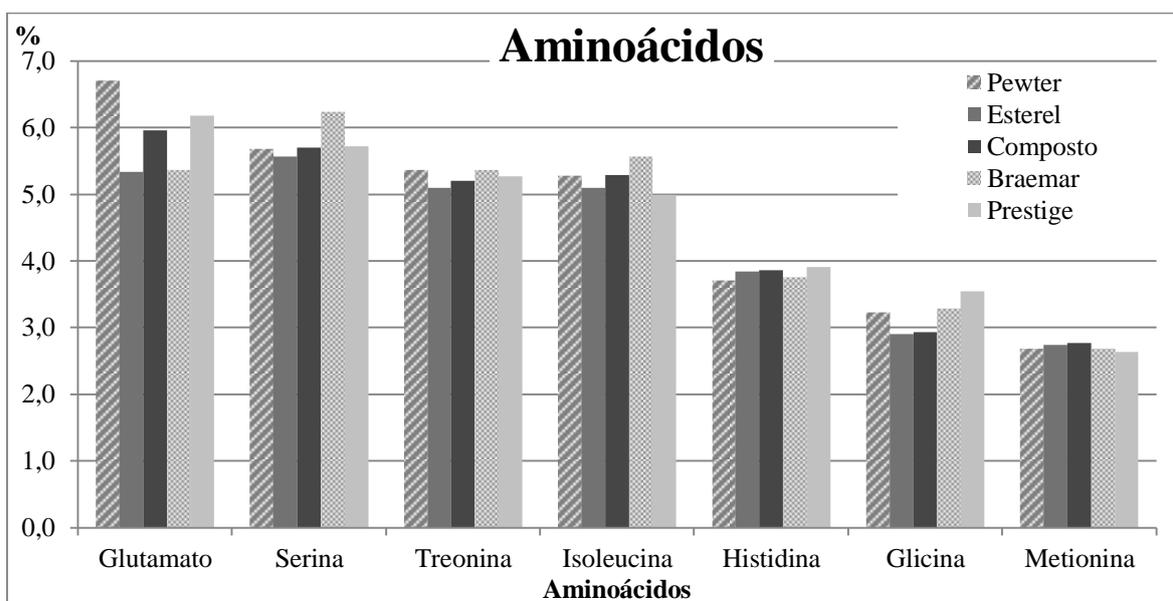


Figura 25 - Variação, em percentagem, do perfil de aminoácidos de cada mosto.

As Tabelas 20, 21 e 22 sintetizam a informação apresentada nas Figuras 24 e 25 relativamente à comparação dos perfis de aminoácidos entre mostos.

**Tabela 20 – Principais diferenças entre o perfil de aminoácidos de Pewter relativamente aos restantes mostos. O valor entre parêntesis representa a diferença percentual no perfil de aminoácidos entre os mostos analisados e o mosto Pewter.**

	<b>VS PT</b>	<b>VS COMP</b>	<b>VS EST</b>	<b>VS BR</b>
<b>Maior diferença</b>	Glutamato (8%)	Glutamato (11%)	Glutamato (20%)	Glutamato (20%)
	Valina (7%)	Glicina (9%)	Aspartato (11%)	Aspartato (15%)
	Fenilalanina (6%)	Aspartato (3%)	Glicina (10%)	Lisina (10%)
<b>Menor diferença</b>	Leucina (6%)	Treonina (3%)	Treonina (5%)	Arginina (8%)

A análise da Tabela 20 mostra que o glutamato e o aspartato se encontram presentes em elevada percentagem no mosto Pewter relativamente aos restantes mostos. Verifica-se que a maior diferença de concentração de glutamato entre perfis se pode encontrar relativamente ao mosto Esterel e ao mosto Braemar, verificando-se a mesma tendência com o aspartato. Dado que o mosto Pewter foi considerado o melhor fermentador, a elevada percentagem destes dois aminoácidos no perfil deste mosto pode ser um indicativo da boa performance, como foi explicado anteriormente. (28, 50)

**Tabela 21 – Principais diferenças entre o perfil de aminoácidos de Prestige relativamente aos restantes mostos. O valor entre parêntesis representa a diferença percentual no perfil de aminoácidos entre os mostos analisados e o mosto Prestige.**

	<b>VS PW</b>	<b>VS COMP</b>	<b>VS EST</b>	<b>VS BR</b>
<b>Maior diferença</b>	Alanina (11%)	Glicina (17%)	Glicina (18%)	Aspartato (22%)
	Glicina (9%)	Aspartato (11%)	Aspartato (18%)	Glutamato (13%)
	Aspartato (8%)	Alanina (10%)	Glutamato (14%)	Lisina (13%)
<b>Menor diferença</b>	Histidina (5%)	Arginina (5%)	Alanina (12%)	Arginina (12%)

A análise da Tabela 21 mostra que o mosto Prestige possui uma maior percentagem de glicina que os mostos Composto e Esterel, apresentando também uma percentagem de glicina 9% superior à do mosto Pewter. O aminoácido aspartato encontra-se também em elevada percentagem no perfil de Prestige, pelo que este aminoácido encontra-se em maior concentração em Prestige do que em Braemar, Esterel, Composto e Pewter respetivamente. A alanina, aminoácido que se destacou na análise de Pearson, encontra-se neste mosto em concentração superior relativamente aos mostos Composto e Esterel.

**Tabela 22 - Principais diferenças entre o perfil de aminoácidos de Braemar relativamente aos restantes mostos. O valor entre parêntesis representa a diferença percentual no perfil de aminoácidos entre os mostos analisados e o mosto Braemar.**

	<b>VS PW</b>	<b>VS COMP</b>	<b>VS EST</b>	<b>VS PT</b>
<b>Maior diferença</b>	Serina (9%)	Glicina (11%)	Glicina (12%)	Fenilalanina (14%)
	Fenilalanina (9%)	Serina (9%)	Serina (11%)	Leucina (12%)
	Tirosina (8%)	Valina (7%)	Isoleucina (8%)	Valina (11%)
<b>Menor diferença</b>	Leucina (7%)	Fenilalanina (5%)	Valina (7%)	Isoleucina (10%)

A Tabela 22 mostra que o mosto Braemar possui uma percentagem de glicina superior aos mostos Composto e Esterel, característica que partilha com o mosto Prestige. Relativamente ao mosto com melhor performance, o mosto Braemar possui uma concentração superior de serina, verificando-se que a percentagem de serina em Braemar também é superior em relação aos mostos Composto e Esterel.

Verifica-se que dos 16 aminoácidos apresentados na Tabela 20, 11 são da classe A, o que significa que as principais diferenças de perfil entre o mosto Pewter e os restantes mostos são os aminoácidos desta classe: glutamato, aspartato, lisina, arginina e treonina. Estes aminoácidos, que caracteristicamente são fontes preferenciais de azoto e que podem ser incorporados na síntese proteica com maior eficiência, permitindo à célula evitar gastos energéticos e, por outro lado, reduzir o tempo necessário até estes aminoácidos se encontrarem disponíveis para utilização. (28, 50, 75, 76)

Dos 16 aminoácidos apresentados na Tabela 21, 9 são da classe A, enquanto a classe C encontra-se representada com 6 aminoácidos. Este dado indica que, com um perfil de aminoácidos com um maior teor de aminoácidos da classe C, a performance fermentativa é afetada negativamente. A concentração de aminoácidos de classe C no final da fermentação é relativamente elevada, já que caracteristicamente o seu consumo não é total e, em alguns aminoácidos, atinge apenas 40%. Alguns autores, como Cooper (1979) (78) referem a existência de um efeito inibidor. Apesar deste efeito, a presença de aminoácidos de classe A tem o efeito contrário, pois estes aminoácidos são metabolizados rapidamente e de forma completa. (23, 28, 50, 76)

Dada a baixa concentração de FAN (mg/L) do mosto Prestige comparativamente aos restantes mostos, e a presença de aminoácidos da classe C nas principais diferenças, é relevante verificar que a atenuação real (%) deste mosto apenas diferiu em 2,93% de atenuação real relativamente ao melhor fermentador. Este facto pode indicar que a presença de uma elevada percentagem de aminoácidos da classe A consegue compensar o efeito negativo da presença de aminoácidos da classe C, permitindo que o mosto Prestige tenha um desempenho quase positivo. (78)

O perfil de aminoácidos do mosto Braemar, que é comparado na Tabela 22, apresenta a menor representação de aminoácidos da classe A: apenas a serina está presente por 3 vezes. Por outro lado, aminoácidos da classe B e C são representados 7 e 6 vezes

respetivamente. Os estudos de Thorne (1949) (50) referem que, á medida que as fontes preferenciais de azoto diminuem a sua concentração, o meio fermentativo torna-se menos propício ao desenvolvimento da fermentação, originando uma diminuição do seu crescimento ou, por outro lado, levando à paragem do mesmo, referindo-se a um efeito inibitório. Alguns autores, como Thomas (1990) (38) e Cooper (1979) (78) referem a possível interrupção de mecanismos de sinalização para explicar a inibição. Este mecanismo pode explicar o comportamento verificado no mosto Braemar. Desta forma, a presença de aminoácidos das classes B e C, pode ter influenciado negativamente a performance deste mosto, que se apresentou com a maior concentração de FAN (mg/L) do teste mas que não foi aquele que apresentou a melhor performance fermentativa. (28, 38, 50, 78, 79)

## 4. Conclusões

A realização de ensaios de fermentação em tubos EBC com os mostos produzidos na instalação piloto permitiu concluir que, para mostos produzidos com as mesmas especificações, existe variabilidade nos resultados finais de fermentação.

A análise da concentração de iões nos mostos produzidos, com destaque para magnésio, cálcio, zinco e potássio, permitiu concluir que, segundo as referências bibliográficas, não existe um efeito negativo, por inibição ou défice, na performance fermentativa das fermentações realizadas consequente da concentração de iões.

Trabalho posterior pode ser realizado, no que respeita ao aumento do conhecimento do efeito da adição de suplementos ricos magnésio e outros elementos ao mosto. (4) Simultaneamente, a análise das interações entre nutrientes permitirá identificar efeitos sinérgicos ou antagonísticos em termos de performance fermentativa e relativamente a critérios de qualidade do produto final. Este género de abordagem tem o potencial para otimizar o processo fermentativo, de modo a garantir que o aumento da gravidade específica dos mostos utilizados na indústria cervejeira não é acompanhada de quebras na performance fermentativa.

Dado que as fermentações atingiram o seu término verificando-se valores de FAN (mg/L) finais que representavam cerca de metade do valor inicial conclui-se que não ocorreu défice nutricional de azoto. Desta forma, a variabilidade existente entre as performances fermentativas dos diferentes mostos pode ser atribuída às diferenças no perfil de aminoácidos.

A avaliação do coeficiente de produto momento de Pearson permitiu concluir que existe uma relação linear positiva e estatisticamente significativa entre a concentração de aspartato e a concentração de etanol (% v/v) final, verificando também a existência de uma correlação elevada entre o mesmo fator e a concentração de glutamato. A alanina também apresentou uma elevada correlação com um dos parâmetros finais de fermentação, indicando que pelo menos um aminoácido do grupo C pode destacar-se pela sua influência nos resultados finais de fermentação.

A análise do perfil de aminoácidos dos mostos avaliados permitiu concluir que o mosto com melhor performance fermentativa foi aquele que demonstrou a maior percentagem de aspartato e glutamato, verificando-se ainda que o perfil de aminoácidos

deste mosto apresentou uma elevada percentagem de aminoácidos da classe A relativamente aos restantes mostos e a menor percentagem de aminoácidos da classe C.

O mosto com pior performance fermentativa, o mosto Prestige, apresentou um perfil em que as principais diferenças para os outros mostos eram compostas por aminoácidos das classes A e C, o que pode ser indicativo do efeito negativo consequente da presença de uma elevada percentagem de certos aminoácidos da classe C, com destaque para a percentagem de glicina. Apesar deste comportamento, o mosto Prestige apresenta uma performance quase positiva, o que pode indicar que a elevada percentagem de aminoácidos da classe A contribuiu para o equilíbrio desta fermentação.

O mosto com uma concentração de FAN (mg/L) mais elevada, o mosto Braemar, apresentou uma performance fermentativa intermédia relativamente aos restantes mostos. O perfil de aminoácidos deste mosto possui uma percentagem elevada de aminoácidos da classe B e C, que podem ter influenciado a performance fermentativa negativamente. Uma vez mais verifica-se a presença de glicina, verificando-se também uma percentagem elevada de fenilalanina e serina. Dada a existência de poucas correlações entre a concentração inicial de aminoácidos e os parâmetros finais de fermentação, o aumento do número de amostras poderá revelar relações que neste momento não são visíveis. Estas relações podem explicar, por exemplo, o comportamento do mosto Braemar.

O estudo da performance fermentativa do mosto Composto mostrou que, como esperado, as características das matérias-primas utilizadas na sua produção são capazes de influenciar a performance. Dado que a composição de malte deste mosto corresponde a 45% malte Pewter, é possível afirmar que o elevado valor de atenuação real (%), relativamente aos restantes mostos do teste, foi influenciado positivamente por este malte.

Não foi confirmada a relação descrita na literatura entre a concentração de determinados aminoácidos e a concentração final de diacetilo.

Entre os parâmetros indicados pelos fornecedores de matérias-primas verificou-se que a percentagem de proteína solúvel foi o elemento que apresentou a correlação mais elevada e com significância estatística entre parâmetros das matérias-primas e dos mostos. Isto indica que mostos com a maior percentagem de proteína solúvel são os que permitem obter mostos com a maior concentração de azoto fermentável.

A realização de estudos posteriores, com percentagens variáveis das mesmas matérias-primas, permitirá quantificar a forma como a variação das percentagens

influencia a performance. Para tal, as características dos maltes utilizados terão de ser adequadamente descritas, tal como foi realizado neste trabalho, com especial incidência no perfil de aminoácidos, já que foi demonstrado que este tem a capacidade de influenciar a performance fermentativa.

A avaliação prévia do perfil de aminoácidos através da realização de mostos laboratoriais é um elemento diagnóstico que, com o adequado estudo, poderá fornecer informação complementar à concentração de FAN (mg/L) e criar um critério de seleção de matérias-primas otimizado para a melhor performance fermentativa. Este critério poderá consistir na seleção de maltes com uma elevada percentagem de aspartato e glutamato. Estudos complementares deverão consistir em comparações entre os perfis de aminoácidos dos mostos laboratoriais e dos mostos piloto.

A realização de fermentações teste com uma maior variedade de matérias-primas, de modo a variar ao máximo o perfil de aminoácidos e a aumentar a amostra, permitirá a utilização de métodos de análise multivariada no perfil de aminoácidos e aumentar a significância estatística de cada resultado. As técnicas de análise multivariada poderão potenciar o desenvolvimento do perfil ideal de aminoácidos de modo a facilitar a elaboração de lotes compostos de malte e uma melhor capacidade de controlo de fermentações.

O estudo do perfil de aminoácidos do mosto e a resposta da fermentação também poderá contribuir para aumentar o conhecimento dos mecanismos utilizados pela célula para utilizar o azoto no seu desenvolvimento.

A melhoria da performance fermentativa decorrente da continuação deste estudo tem aplicações industriais claras. Uma melhoria do processo industrial com impacto imediato é a redução da utilização de substratos ricos em azoto: a despesa anual de uma unidade produtiva com este género de elementos representa uma soma significativa, pelo que ao reduzir ou eliminar a necessidade de utilização destes elementos é possível obter de imediato ganhos económicos.

A uniformização do perfil de aminoácidos dos lotes de matérias-primas e de procedimentos de seleção de matérias-primas e a uniformização de processos produtivos são consequências da continuação deste estudo. Isto irá permitir que ocorram menos perdas decorrentes da fermentação de mostos não otimizados, pelo que o investimento necessário

para produzir a mesma quantidade de produto final irá diminuir. Assim, existe um aumento do rendimento da unidade produtiva.

## **Capítulo 3**

### **Comparação de escalas**



## **1. Comparação entre escalas**

A UNICER possui um conjunto de instalações que utiliza com fins produtivos, como áreas de desenvolvimento de produtos ou de investigação. Estas instalações são a instalação piloto, a mini fábrica, e a zona de produção industrial (fabrico de mosto e adega). A comparação entre escalas torna-se, assim, um tema importante, já que permite retirar conclusões acerca da performance fermentativa nas diferentes instalações e estabelece uma linha base de conhecimento importante para estudos inter-escalas.

O trabalho realizado por Fumi (2009) (33) serve de exemplo a este projeto, já que mostra como comparações entre equipamentos são essenciais para compreender as diferenças existentes entre performance fermentativa ou critérios organoléticos.

### **1.1 A instalação piloto**

A instalação piloto caracteriza-se por ser uma instalação com alguma automação, na qual é possível realizar a produção de mosto, a fermentação e a filtração do produto fermentado. Os mecanismos de automação encontram-se centralizados num computador com software adequado para o controlo da instalação. Este software, que permite a interface com o operador, regista informações como a temperatura, volume e velocidade de agitação. O operador insere as receitas, estabelecidas de acordo com as especificações das matérias-primas, e de acordo com o produto que se pretende obter, e inicia o processo. Apesar de a instalação não ser completamente automatizada permite reduzir o trabalho manual e aumentar o controlo sobre todas as etapas do processo.

O fabrico de mosto é realizado a partir de três equipamentos principais: duas caldeiras e um vaso, que entre si repartem as várias necessidades do fabrico de mosto, e que possuem um volume de 700L. Os três equipamentos encontram-se representados nas ilustrações 3, 4 e 5.

As matérias-primas são adicionadas manualmente na caldeira de empastagem ou na caldeira de caldas. Cada uma destas caldeiras possui uma dupla função: a caldeira de empastagem recebe matérias-primas e realiza a mistura com os volumes de água indicados, posteriormente a cuba desempenha as funções de filtro, removendo do líquido a matéria sólida insolúvel, ou drêche. A caldeira de caldas, que atinge temperaturas mais elevadas, tem também a função de caldeira de ebulição, passo do fabrico em que o mosto é pasteurizado.

Após a ebulição na caldeira de caldas, o mosto é enviado para o terceiro equipamento, o *whirlpool*. Este equipamento desempenha a mesma função que o decantador desempenha na produção industrial de mosto, no entanto, o processo utilizado é bastante diferente. A Figura 26 mostra o esquema de funcionamento de um *whirlpool*. Este equipamento remove a componente proteica não solúvel do mosto, ou *trub*, através da criação de um fluxo rotacional que transporta o *trub* para o centro do vaso. Desta forma, o mosto clarificado pode ser retirado pelos lados do vaso, evitando-se características indesejáveis no produto final. (2)



**Ilustração 3 – Caldeira de empastagem/cuba filtro**



**Ilustração 4 – Caldeira de caldas/caldeira de ebulição**



**Ilustração 5 - Whirlpool**

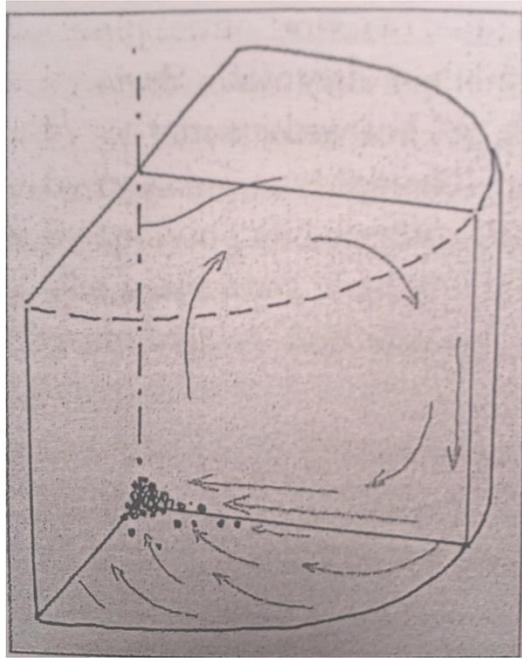


Figura 26 – Esquema das correntes existentes no interior de um equipamento whirlpool. (2)

Antes de ser encaminhado para as cilindro-cônicas, equipamentos de 600L de volume útil e camisas para regulação da temperatura interna, o mosto é encaminhado para o piso inferior da instalação. Neste piso encontra-se um permutador de calor, que reduz a temperatura do líquido de cerca de 90°C para a temperatura indicada na receita de fermentação.

A fermentação, que decorre no interior dos reatores cilindro-cônicos, é monitorizada através de torneiras de amostragem situadas a cerca de 1/5 da altura do recipiente, enquanto a temperatura é regulada com recurso a água glicolada que circula no interior das camisas de arrefecimento.

## 1.2 O processo industrial

O processo produtivo de mosto industrial ocorre numa sala específica dentro das instalações da UNICER. Durante a realização deste trabalho, a sala de fabrico possuía capacidade para produzir 75 000 L de mosto por cada fabrico. Esta sala possui três caldeiras: caldeira de empastagem, caldeira de caldas e a caldeira de ebulição. Associados a estes três equipamentos encontram-se um decantador, que contrasta com o *whirlpool* existente na instalação piloto mas que é homólogo na função, e um filtro horizontal de placas verticais, que é o homólogo da cuba filtro, já que permite remover as partículas sólidas não dissolvidas provenientes da mistura das matérias-primas.

Industrialmente, a empastagem de matérias-primas e a empastagem das caldas ocorrem em simultâneo, pelo que após terminada a empastagem das caldas, que atingem uma temperatura superior, são enviadas para a caldeira de empastagem, de forma a rentabilizar a energia despendida no aquecimento das caldas. No fim da brassagem, a mistura é enviada para o filtro, onde é removida a drêche.

O mosto, depois de filtrado, vai para a caldeira de ebulição para a etapa final de pasteurização. Por fim, o mosto é encaminhado para o decantador onde ocorre a sedimentação da componente proteica não solúvel. O processo de fabrico termina com o envio do mosto ainda quente para as adegas, onde é arrefecido. A componente proteica não solúvel obtida no decantador é reaproveitada no fabrico seguinte, onde sofre novo tratamento térmico e enzimático.



**Ilustração 6 – Filtro horizontal de placas verticais utilizado na produção de mosto na UNICER.**

## 2. Comparação da produção de mosto e fermentação

### 2.1 Materiais e métodos

O primeiro teste realizado tem como objectivo a avaliação das diferenças de escala entre as fermentações realizadas na instalação piloto e as realizadas à escala industrial. De modo a ser possível avaliar e quantificar estas diferenças foi recolhido um volume de 600 litros de mosto standard industrial e transportado para a instalação piloto, onde foi colocado num reator com 600 litros de volume útil. A fermentação deste mosto foi realizada nas adegas, num reator cilindrocónico de 300 000 litros e na instalação piloto. As fermentações foram codificadas como IND0112 e IND0212, respetivamente para a fermentação industrial e para a fermentação piloto.

Para realizar a comparação entre as escalas de produção de mosto foram produzidos dois mostos na instalação piloto. Estes mostos foram produzidos com as mesmas matérias-primas que o mosto industrial, no entanto, a variação na produção destes mostos prende-se com o diagrama de fabrico utilizado. O fabrico codificado MPA0113 utilizou um diagrama de fabrico standard utilizado à escala industrial, enquanto o fabrico codificado MPA0213 foi realizado com recurso a um diagrama standard utilizado na instalação piloto.

Os quatro mostos em teste foram inoculados com o objetivo de 25 milhões de células/mL com recurso a uma estirpe industrial da levedura *Saccharomyces pastorianus* com 4 trabalhos, isto é, utilizada para realizar 4 fermentações industriais.. Esta estirpe foi recolhida nos tanques de armazenamento de levedura na adega da UNICER.

A Tabela 23 resume as características dos mostos utilizados neste teste.

**Tabela 23 – Resumo das características de produção e fermentação dos mostos em estudo**

<b>Mosto</b>	<b>Zona de produção</b>	<b>Fabrico</b>	<b>Fermentação</b>
<b>IND0112</b>	Industrial	Diagrama industrial	Industrial
<b>IND0212</b>	Industrial	Diagrama industrial	Instalação piloto
<b>MPA0113</b>	Instalação piloto	Diagrama industrial	Instalação piloto
<b>MPA0213</b>	Instalação piloto	Diagrama piloto	Instalação piloto

### 2.1.1 Produção de mosto

Os diagramas de fabrico utilizados na produção dos mostos em análise não são apresentados neste trabalho propositadamente, no entanto, a Tabela 24 apresenta as principais diferenças entre ambos os diagramas de fabrico.

**Tabela 24 – Principais diferenças entre os diagramas utilizados para a produção de mosto**

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>	<b>Importância</b>
<b>Empastagem de caldas</b>	O diagrama IP passa por uma etapa longa de aumento de temperatura até atingir uma temperatura máxima superior relativamente ao diagrama Industrial, que inicia a mistura das caldas a uma temperatura superior mas atinge uma temperatura máxima mais baixa.	A temperatura de empastagem das caldas é influente na extração de açúcares fermentescíveis da calda.
<b>Aditivos</b>	De modo a degradar os polissacarídeos provenientes das matérias-primas, são utilizados aditivos. Estes elementos são diferentes, e de diferente especificidade nos dois diagramas.	A utilização de aditivos nas etapas da brassagem permite aumentar o rendimento de extracção de açúcares fermentáveis.
<b>Proteólise</b>	O diagrama industrial realiza a etapa de proteólise a uma temperatura inferior e durante menos tempo relativamente ao diagrama IP.	Atividade máxima de enzimas proteolíticas, contribuindo para o aumento do FAN
<b>Mistura caldas-suspensão de malte</b>	O diagrama IP possui uma maior diferença de temperaturas entre a calda e a suspensão de malte, realizando a junção dos dois líquidos mais lentamente relativamente ao diagrama industrial.	A diferença de temperatura entre as caldas e as restantes matérias-primas pode provocar a desnaturação de enzimas relevantes nas etapas de liquidificação e sacarificação, condicionando o extrato final.
<b>Liquidificação</b>	O diagrama IP e o Industrial realizam este passo à mesma temperatura, no entanto, no diagrama Industrial apresenta-se ligeiramente mais curto.	
<b>Sacarificação</b>	Igual em ambos os diagramas	
<b>Ebulição</b>	Igual em ambos os diagramas	

A Figura 28 apresenta o exemplo de um diagrama de tempo-temperatura utilizado por Fumi e colaboradores (2009) (33) para a produção de mosto no seu trabalho.

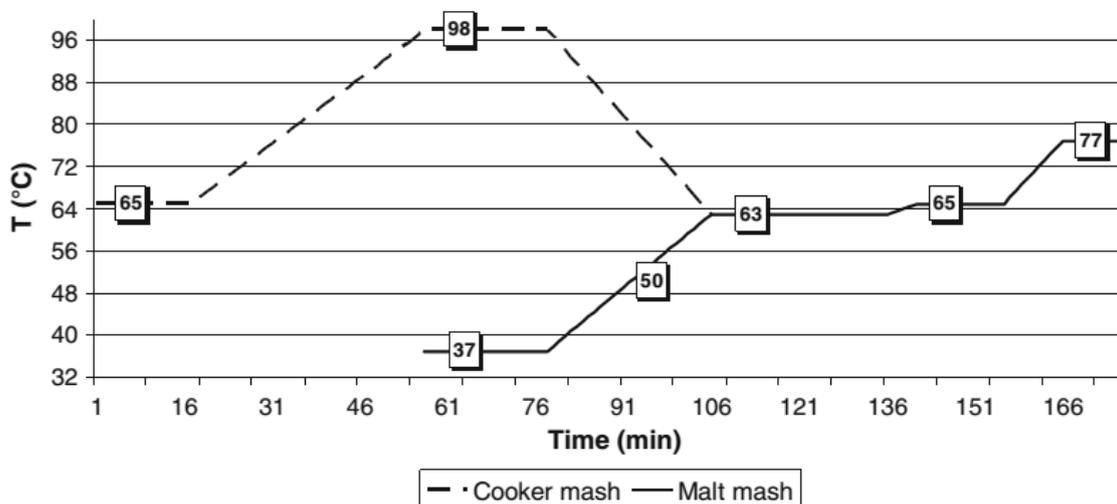


Figura 27 – Gráfico exemplo de um diagrama de produção de mosto. Este diagrama foi utilizado por Fumi e colaboradores (2009) (33). A tracejado encontra-se o processo de empastagem de caldas, enquanto que a completo encontra-se a empastagem de malte e as etapas comuns na produção de mosto. (33)

### 2.1.2 Métodos analíticos

Todas as análises realizadas para a elaboração deste trabalho foram realizadas no Laboratório Central da UNICER. As medições de gravidade (°P) de cerveja e mosto, etanol (% v/v), pH, atenuação (%) e cor foram obtidas usando um equipamento Alcolyzer Plus, Beer Analyzing System da Anton Paar, Austria. A medição de diacetilo foi realizada através de um cromatógrafo de fase gasosa Varia Star 3400, recorrendo ao método descrito em em Analytica – EBC, método 9.24.2. (37) Antes da realização destas análises a biomassa era removida das amostras através da filtração com um filtro Whatman 2V de 0,45µm. Um ajudante de filtração, terra de diatomáceas, foi utilizado na remoção de biomassa para análises realizadas no Alcolyzer Plus.

As análises de atenuação limite (%), e extrato limite (°P), ambos a 24 horas, foram obtidas recorrendo ao método descrito em Analytica – EBC, método 8.6.1. (37)

A análise de FAN foi realizada através de um equipamento Skalar Beer & Malt Analyser, Skalar Analytical B.V., Holanda. As amostras para análise de FAN foram centrifugadas a 1650g durante 15 minutos a uma temperatura de 5°C. Para realizar análises de FAN às matérias primas utilizadas foi utilizado o método recomendado em Analytica – EBC, método 4.5.1. para a produção de mosto laboratorial, ou *congress mash*. (37)

A determinação de biomassa através de contagem de células foi realizada através de um Z1 Coulter Counter, Single Threshold Analyser, Beckman Coulter, E.U.A.. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método do azul de metileno com visualização ao microscópio.

## 2.2 Resultados e discussão

### 2.2.1 Produção de mosto

A Tabela 25 resume os resultados das análises aos mostos produzidos na instalação piloto, codificados como MPA. Os dois dígitos finais de cada codificação referem-se ao ano de produção.

Os resultados relativos às análises realizadas aos mostos produzidos à escala industrial não são diretamente apresentados, sendo realizada uma comparação relativa com os resultados dos mostos produzidos na instalação piloto.

**Tabela 25 – Resultados das análises realizadas aos mostos produzidos na instalação piloto.**

<b>Análise</b>	<b>Unidade</b>	<b>MPA0113</b>	<b>MPA0213</b>
<b>Extrato Aparente</b>	<b>°P</b>	15,06	15,01
<b>pH</b>		5,11	5,20
<b>cor</b>	<b>EBC</b>	9	9,1
<b>Amargor</b>	<b>UA</b>	37	32
<b>Extrato Limite 24h</b>	<b>g/100mL</b>	2,38	2,07
<b>Atenuação Limite 24h</b>	<b>%</b>	68,9	70,5
<b>FAN</b>	<b>mg/L</b>	171	203

Como é possível verificar na Tabela 25, os mostos são semelhantes, apresentando valores de extrato de 15 °P. Os valores de pH e cor são também muito próximos, em que se destaca apenas o valor ligeiramente inferior de amargor do mosto MPA0213. Os mostos produzidos industrialmente apresentam valores aproximados aos verificados na Tabela 25.

Os resultados expressos na Tabela 26 mostram que existe uma diferença clara nos resultados de FAN obtidos entre mostos produzidos na instalação piloto. O mosto MPA0113, obtido replicando o diagrama industrial de fabrico na instalação piloto, apresenta um aumento de 4% relativamente ao mosto laboratorial. Entre os dois mostos obtidos na instalação piloto, o mosto fabricado recorrendo a um diagrama standard da instalação piloto, MPA0213, extraiu mais 20% de azoto fermentável que o mosto

MPA0113. Este resultado mostra que entre dois mostos com as mesmas características, o mosto com o diagrama standard instalação piloto é mais eficiente na obtenção de azoto fermentável.

Ambos os mostos apresentaram uma concentração de FAN (mg/L) superior ao verificado no mosto laboratorial. Este resultado mostra que, apesar de existir proporcionalidade entre o resultado de FAN (mg/L) dos mostos laboratoriais e dos mostos IP, os resultados obtidos serão sempre sujeitos a mudanças que ocorram nos diagramas de fabrico, que podem permitir extrair uma maior ou menor quantidade de compostos azotados das matérias-primas.

**Tabela 26 – Resultados das análises de FAN a mostos laboratoriais das matérias-primas e variação de FAN relativamente à análise das matérias-primas utilizadas. As análises de FAN foram realizadas com uma taxa de recuperação de 91%. O malte MBIS é composto por 85% MB395 e 15% IS445.**

<b>FAN (mg/L)</b>	<b>Mosto laboratorial</b>	<b>MPA0113</b>	<b>MPA0213</b>
<b>MB395</b>	180		
<b>IS445</b>	136		
<b>MBIS (composto)</b>	164	171	203
<b>Variação de FAN (%)</b>		4%	24%

A literatura refere que mostos com um extrato superior a 14°P é recomendada uma concentração de FAN superior a 200 mg/L. Como é possível verificar apenas o mosto MPA0213 preenche este critério. (2, 21, 38, 49)

### **2.2.2 Fermentações**

Os resultados de fermentações dos mostos analisados, encontram-se nas Figuras 28 e 29. Através da análise destas figuras verifica-se que as fermentações tiveram comportamentos semelhantes, isto é, verifica-se um aumento proporcional da concentração de etanol no mosto à medida que o extrato aparente é consumido, comportamento coerente com as características de produto primário da fermentação.

A fermentação do mosto MPA0213 foi interrompida ao sétimo dia. Este problema deveu-se a uma falha eléctrica na instalação piloto que originou uma diminuição súbita da temperatura da fermentação, desta forma afetando de forma irreparável todos os resultados obtidos após o sétimo dia de fermentação.

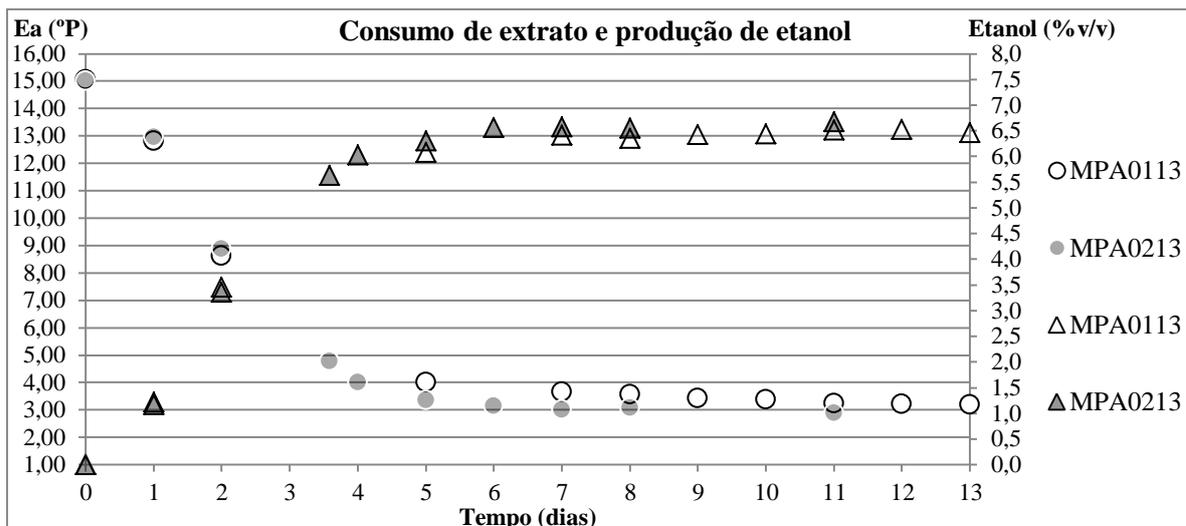


Figura 28 – Resultados do consumo de extrato e de produção de etanol para dois dos mostos analisados. Os círculos representam o extrato aparente e os triângulos representam a concentração de etanol.

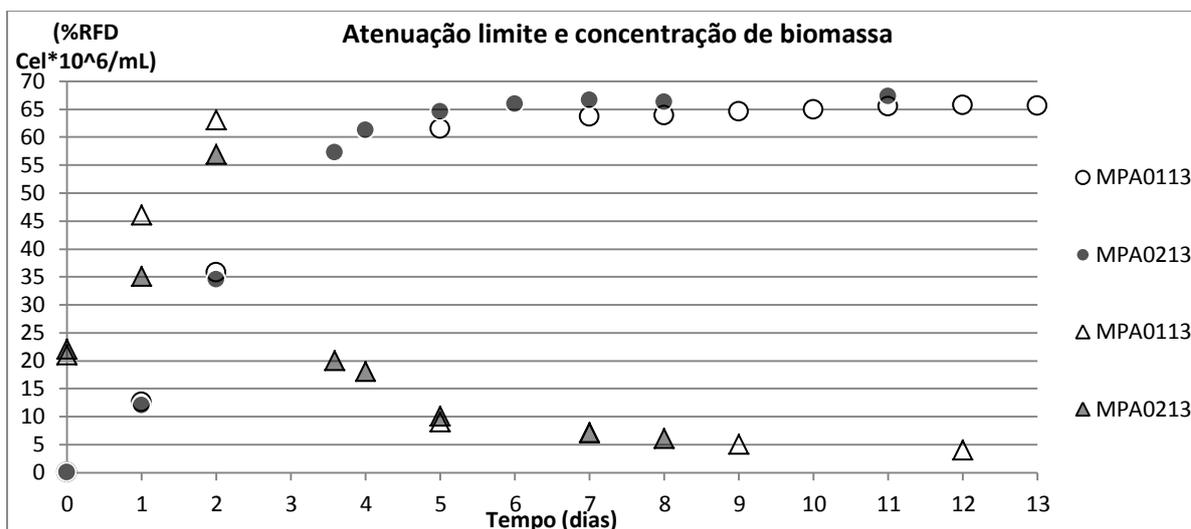


Figura 29 – Dados de variação de percentagem de atenuação e contagem de células nas fermentações dos mostos em análise. Os círculos representam a percentagem de atenuação real e os triângulos representam a contagem de células.

Os mostos produzidos na instalação piloto, MPA0113 e MPA0213, distintos devido à utilização de diferentes diagramas de fabrico na sua produção, apresentam diferenças na performance fermentativa. A Tabela 27 e as Figuras 28 e 29 mostram que, apesar das dificuldades técnicas que ocorreram com a fermentação MPA0213, esta apresenta uma melhor performance que a fermentação MPA0113. Esta afirmação é sustentada pelo facto de a fermentação MPA0213, ao 7º dia, já possuir valores de atenuação, consumo de extrato e produção de etanol superiores aos verificados na

fermentação MPA0113 ao 12º dia, dia em que se verificou o valor mínimo de extrato desta fermentação.

**Tabela 27 – Resultados finais da fermentação dos mostos produzidos**

		<b>MPA0113</b>	<b>MPA0213</b>
<b>Atenuação real (%)</b>	Valor máximo (%)	65,6	66,6
	Tempo (dias)	12	7
<b>Extrato aparente (°P)</b>	Valor máximo	15,06	15,01
	Valor mínimo	3,23	3
	Diferença	11,83	12,01
	% de extrato aparente original consumido	78,55	80,01
	Tempo (dias)	12	7
<b>Etanol (%v/v)</b>	Valor máximo (%v/v)	6,53	6,55
	Tempo	12	7
	% V/V etanol produzido/°P consumidos	0,552	0,545
<b>Diacetilo (mg/L)</b>	Concentração de diacetilo inferior a 0,07ppm (dias)	13	

Verifica-se que a fermentação MPA0213 consumiu uma maior percentagem de extrato até ao 7º dia, do que a fermentação MPA0113 em 12 dias, no entanto, o rácio entre o etanol produzido (%v/v) e o extrato consumido (°P) foi superior na fermentação MPA0113 do que na fermentação MPA0213, indicando que esta fermentação foi mais eficiente na produção de etanol (%v/v). O máximo de biomassa entre estas duas fermentações foi verificado na fermentação MPA0213.

A maturação, ou diminuição da concentração de diacetilo para valores inferiores a 0,07 mg/L, apresenta-se como o fator limitante para a finalização das fermentações na instalação piloto. A fermentação MPA0113 atingiu este valor ao fim de 13 dias de fermentação, no entanto, a concentração de diacetilo da fermentação MPA0213 não atingiu este limite. Desta forma, dadas as restrições nos resultados obtidos nenhuma conclusão pode ser retirada relativamente à velocidade de maturação da fermentação MPA0213.

A diferença de performance fermentativa é consequência da utilização de dois diagramas diferentes. É possível realizar esta afirmação já que esta foi a única diferença na

produção dos dois mostos. Relativamente à diferença entre diagramas, a utilização de diferentes tempos em várias fases do processo de fabrico, com especial destaque para a fase de proteólise, explica a variação de 20% entre o FAN (mg/L) dos dois mostos. A Tabela 24 identifica as variações de tempo existentes.

As variações verificadas no FAN e na performance fermentativa encontram eco nos trabalhos realizados por Lei e colaboradores (2013) (49) e Fumi e colaboradores (2009) (33), que demonstraram como variações na produção podem influenciar os parâmetros e a performance fermentativa de mostos produzidos nas mesmas condições, nomeadamente parâmetros como a atenuação real (%), o etanol (%v/v) e o consumo de extrato (°P). Estes autores realizaram também uma análise aos aminoácidos, verificando-se variações na concentração de aminoácidos e FAN (mg/L) entre testes. (33, 49)

### **2.2.3 Comparação com fermentações industriais**

A análise das fermentações de mosto industrial, IND0112, que foi tomou lugar na zona de fermentação industrial, e IND0212 que foi realizada na instalação piloto, mostraram resultados melhores relativamente aos verificados nas fermentações MPA.

A fermentação IND0112, dados não apresentados, apresentou os melhores resultados de fermentação de todo o teste. Esta fermentação possui os melhores valores de atenuação real (%), etanol produzido (%v/v) e extrato consumido (°P). O seu tempo de maturação foi também mais rápido, atingindo a concentração máxima de diacetilo (mg/L) no menor tempo. De notar que este resultado foi verificado também em comparação com a fermentação IND0212, que foi fermentada na instalação piloto com o mesmo mosto. Desta forma conclui-se que a fermentação à escala industrial é mais eficiente que a fermentação à escala piloto, permitindo obter um líquido pronto para processamento posterior no menor tempo.

Entre as fermentações à escala piloto, o mosto industrial utilizado na fermentação IND0212 apresentou melhores resultados que a fermentação MPA0113. Verificou-se um consumo superior de extrato (°P), um valor de atenuação real final superior (%) e uma maior produção de etanol (%v/v). A concentração máxima de diacetilo (mg/L) foi atingida num intervalo de tempo igual.

Desta forma, é possível concluir que o mosto produzido industrialmente apresenta uma melhor performance que o mosto produzido na instalação piloto, quando utilizadas as

mesmas proporções de matérias-primas, diagramas de fabrico e condições de fermentação (IND0212 e MPA0113).

A comparação das fermentações MPA0213 e IND0212 deve ser realizada com precaução. Verifica-se que estas fermentações apresentam resultados semelhantes, no entanto, devido às limitações existente nos resultados da fermentação MPA0213 não é possível identificar qual das fermentações possui a melhor performance fermentativa. Apesar deste resultado, a melhor performance fermentativa da fermentação MPA0213 relativamente à fermentação MPA0113 permite concluir que a primeira se encontra otimizada para as especificidades da instalação piloto. Esta otimização permite obter resultados de fermentação semelhantes aos verificados com o mosto industrial.

A performance fermentativa superior da escala industrial relativamente à instalação piloto pode ter várias explicações. A automatização e uniformização verificada à escala industrial permite um controlo mais rigoroso dos processos de produção de mosto e de fermentação. A própria escala, com reatores e vasos muito maiores terá influência em todos os parâmetros de produção. A ocorrência de correntes internas de convecção e as dificuldades nas trocas de energia, com influência na temperatura e a pressão interna são um exemplo claro do efeito que o tamanho do reator pode ter na fermentação.

### 2.3 Conclusão da comparação de fermentações

Após análise dos dados é possível afirmar que a fermentação realizada à escala industrial foi, neste teste, mais eficiente do que as realizadas à escala piloto, permitindo aumentar a produção de etanol, o consumo de extrato do mosto e os valores de atenuação limite. O tempo de maturação do produto de fermentação também é menor, o que indica que o produto de fermentação produzido à escala industrial estaria pronto para os passos seguintes de produção mais cedo do que o mesmo produto obtido na instalação piloto. Desta forma confirma-se a teoria existente que os processos industriais conduzem a uma melhor performance fermentativa e maior eficiência nos processos de obtenção de cerveja.

Concluiu-se que a performance fermentativa de um mosto produzido na instalação piloto, obtido com um diagrama industrial, foi inferior a um mosto produzido com as mesmas matérias-primas mas com um diagrama adaptado à escala piloto.

Verifica-se que o mosto industrial fermentado na instalação piloto possuiu uma performance fermentativa semelhante ao mosto produzido na instalação piloto com recurso

a um diagrama otimizado. Este facto indica que a instalação piloto permite obter mostos que apresentam performances fermentativas ao nível do mosto industrial.

A instalação piloto é uma zona de produção que possui um enorme potencial prático para analisar problemas verificados à escala industrial. Desta forma, é relevante prosseguir com estudos comparativos entre instalações, já que a instalação piloto permite alterar as características do mosto e mesmo da fermentação com maior facilidade e menor custo do que a congénere industrial. Isto torna-se ainda mais importante devido aos melhoramentos e alterações que ciclicamente são implementados na instalação produtiva industrial, como foi o caso da produção e fermentação de mostos de elevada gravidade.

A existência de uma base de conhecimento comparativo entre ambas as instalações permite ainda que o desenvolvimento de novos produtos seja mais eficiente no momento de aumento de escala. O conhecimento gerado com este trabalho permite, assim, contribuir para o desenvolvimento desta base de informação.

### 3. Análise de filtrações

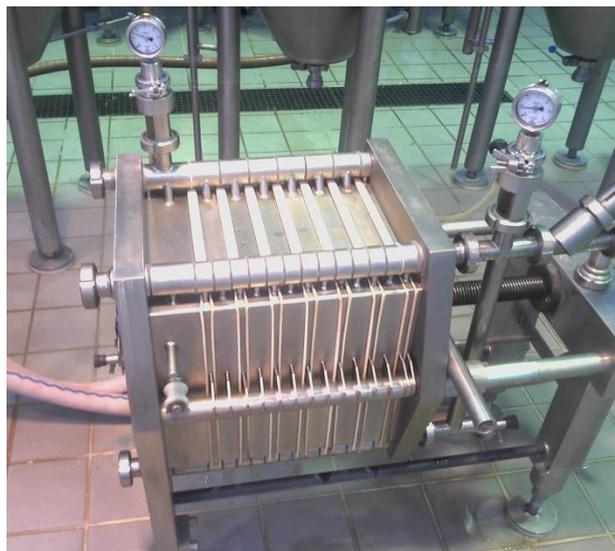
A filtração do produto fermentado é um passo extremamente importante para a produção de cerveja. A filtração permite clarificar o líquido removendo a levedura que ainda se encontra em suspensão e quaisquer outros elementos de maior tamanho. A utilização de coadjuvantes de filtração também permite remover elementos diretamente responsáveis pelo aumento da turbidez do produto final.

A instalação piloto possui um filtro de placas verticais. Este filtro utiliza sete placas verticais, que são adjuvadas por terra de diatomáceas, ou *kieselghur* de diferentes porosidades. A utilização de terra de diatomáceas com diferentes porosidades como meio filtrante permite que ocorra uma pré-filtração do líquido antes de este atingir as placas de filtração. A aplicação da terra de diatomáceas é realizada por ordem decrescente de porosidade (tamanho cada vez menor), garantindo a remoção sequencial de elementos de maiores dimensões até serem atingidos os elementos de menores dimensões. Desta forma, o tempo de vida útil das placas de filtração é maximizado e a filtração adequada da cerveja é garantida. O processo de carbonatação e diluição da cerveja obtida é realizado manualmente.

Industrialmente, a filtração ocorre num processo altamente controlado e automatizado. O líquido passa por várias fase antes de, por fim, ser encaminhado para os tanques de cerveja filtrada, já diluído e carbonatado. A cerveja, arrefecida a uma temperatura entre 0°C e -1,5°C, passa por um filtro de placas, carregado com terra de diatomáceas.

Após esse momento a cerveja passa por outros elementos filtrantes que têm como objectivo impedir a passagem de partículas de terra de diatomáceas e outras partículas que podem provocar a ocorrência de sedimentação e turbidez no produto final. Seguidamente a cerveja é encaminhada para um filtro carregado com polivinilpolipirrolidona (PVPP), um polímero insolúvel em água que permite a remoção de polifenóis da cerveja final. Este polímero permite, através da remoção dos polifenóis, impedir a ocorrência de reacções polifenóis-proteínas que provocam um aumento da turbidez do produto final. Por fim, a cerveja entra para o tanque de cerveja filtrada já carbonatada e diluída. A carbonatação e diluição são realizadas *in-line*, com recurso a sensores de extrato e de dióxido de carbono.

(7, 8)



**Ilustração 7 – Fotografia do filtro horizontal de placas verticais existente na instalação piloto**

### **3.3.1 Materiais e métodos**

O presente teste pretende realizar uma comparação entre o processo industrial de filtração e o filtro existente na instalação piloto. Para realizar esta comparação utilizou-se o produto de final de uma fermentação industrial, IND0112, e o produto final da fermentação do mesmo mosto na instalação piloto, IND0212. As filtrações foram realizadas, nos equipamentos industriais existentes nas adegas UNICER, e no filtro de placas existente na instalação piloto, respetivamente para as fermentações IND0112 e IND0212. Os filtrados foram analisados nos laboratórios centrais da UNICER e foi realizada uma comparação.

O produto final foi submetido a uma análise organolética perante um painel de dez provadores treinados e avaliado em comparação com um produto existente no mercado. Realizou-se ainda uma caracterização de compostos organoleticamente activos recorrendo a um cromatógrafo de fase gasosa Varian Star 3400, segundo os métodos recomendados em Analytica – EBC, método 9.24.2 para análise de dicetonas vicinais, e método 9.39 para álcoois superiores e ésteres. (37) Antes da realização destas análises o líquido foi filtrado com um filtro Whatman 2V de 0,45µm

A análise de SO<sub>2</sub> foi realizada através de um equipamento Skalar Beer & Malt Analyser, Skalar Analytical B.V., Holanda. As amostras para análise de SO<sub>2</sub> foram centrifugadas a 1650g durante 15 minutos a uma temperatura de 5°C.

A análise de turvação foi realizada com recurso a um turbidímetro, calibrado a 560 nm, a 20°C, a 0°C após 24 horas, e a 20°C após 5 dias.

A estabilidade de espuma foi analisada segundo o protocolo estabelecido em Analytica – EBC, método 9.42 (37), através de um equipamento NIBEM-T, produzido por Pentair Haffmans, Venlo, Holanda.

O painel de provadores avaliou o produto final atribuindo classificações de acordo com a Tabela 32 presente no Anexo D1 e descrevendo os principais elementos defeituosos e *off-flavours*, cuja descrição se encontra nas Tabelas 33 e 34, do Anexo D2 e D3, respetivamente.

### 3.3.2 Resultados e discussão

A Tabela 28 representa as análises realizadas aos líquidos antes e depois das filtrações.

**Tabela 28 – Análise pré-filtração e análise pós-filtração. Nesta Tabela encontram-se os valores de diferença entre a análise pré-filtração e o filtrado, em valores absolutos e percentuais.**

Análises	Extrato primitivo (oP)	Extrato aparente (oP)	Etanol (%(v/v))	Atenuação real (%)	pH	Cor (EBC)	Amargor (UA)
Índice final	16,39	2,64	7,51	69,73	4,49	10,8	23,0
Filtrado	15,32	2,46	6,97	69,61	4,93	9,8	20,0
Diferença absoluta	-1,07	-0,18	-0,54	-0,12	0,44	-1,0	-3,0
Diferença percentual	-6,53%	-6,82%	-7,19%	-0,37	9,80%	-9,3%	-13,0%

A análise da Tabela 28 mostra os resultados de filtração verificados na instalação piloto. O único parâmetro em que foi verificado um aumento foi o pH. Este parâmetro, que na filtração piloto sofreu um aumento de 9,80%, é consequência da utilização de terra de diatomáceas na filtração. Este efeito é transversal à variação de escala, já que na zona de produção industrial existe homologia na variação de pH durante a filtração (dados não apresentados). Este é um efeito recorrente em ambas as instalações, no entanto, como os volumes filtrados na instalação industrial são muito superiores, a variação de pH é menor e por isso menos notória nas características químicas do filtrado. O aumento de pH é semelhante ao verificado por Martinovic e colaboradores (2006) (80) no seu teste

industrial. No entanto, verifica-se que este efeito é dependente das características físico-químicas do filtrante em questão.

Os restantes elementos analisados na Tabela 28 sofreram uma diminuição. O amargor sofreu uma diminuição de 13,0%, enquanto o teor de etanol (%v/v) diminuiu em 7,19%. O extrato aparente (°P), que sofreu uma redução de 6,82%, em conjunto com o teor de etanol (%v/v) afetam diretamente o extrato primitivo (°P) e a atenuação real (%). O extrato primitivo consiste num cálculo efectuado a partir do valor de extrato (°P) e do teor de etanol (%v/v) para extrapolar o extrato (°P) no início da fermentação e filtração. A cor sofreu uma diminuição de 9,3% que corresponde a uma perda de 1,0 unidades EBC.

A redução de vários parâmetros entre o índice e o filtrado é explicada pelo efeito de retenção verificado na matriz filtrante, o que demonstra que, mais do que reter partículas não-solúveis e células da levedura, o tipo de filtro e as características da matriz desempenham um papel relevante nas propriedades do filtrado. (7)

A análise dos resultados da filtração industrial (dados não apresentados), mostrou que existe analogia entre os dois processos de filtração existentes, isto é, verificou-se uma diminuição dos parâmetros em análise entre o índice e o filtrado, e aumento do pH.

Apesar da analogia entre escalas, verificou-se que as diferenças entre o índice e o filtrado foram menores na escala industrial. Este fato indica que a filtração industrial tem um efeito menor nas características do produto de fermentação. Desta forma, o produto final irá evidenciar uma menor influência do processo de filtração, contribuindo para uma experiência sensorial autêntica e mais próxima do produto de fermentação.

A análise do produto final obtido após correção de alguns parâmetros, como o amargor e a cor, e a diluição do filtrado permitiu verificar que a cerveja obtida na instalação piloto se encontra dentro dos parâmetros teóricos estabelecidos para uma cerveja de qualidade. De 16 parâmetros teóricos verificou-se que a cerveja obtida na instalação piloto cumpria 11.

Dos elementos que não se encontram dentro dos parâmetros teóricos destaca-se a turvação. A análise dos resultados de turvação a 20°C e a 0°C mostra que a cerveja obtida na instalação piloto possui uma turvação elevada, no entanto, os valores de turvação obtidos após cinco dias encontram-se dentro do parâmetro ideal, o que indica que o desenvolvimento da turbidez no líquido ocorre de forma favorável ao produto. Dadas as diferenças entre os processos de filtração em análise, os valores elevados de turvação

podem ser explicados pela ausência de um passo de filtração na qual é incluída a utilização de PVPP.

A caracterização organolética do produto final da filtração realizada na instalação piloto originou os resultados apresentados na Tabela 29.

**Tabela 29 - Resultados da avaliação e caracterização organolética do produto final.**

<b>Análise</b>	<b>Resultado</b>
<b>Avaliação</b>	-0,7
<b>Descrição de defeitos</b>	Oxidação, acetato de isoamilo e solvente

O produto final da fermentação na instalação piloto obteve uma avaliação de -0,7, que é considerado um valor satisfatório. A descrição dos defeitos, nomeadamente a caracterização como oxidada e solvente, respetivamente informativos da presença de trans-2-nonenal e acetaldeído, são elementos associados à presença de oxigénio no processo de produção. A concentração de SO<sub>2</sub>, um dos parâmetros fora das especificações, não teve reflexo no produto final. (8, 68)

### **3.3.3 Conclusão**

Após a análise aos produtos de fim de fermentação e aos filtrados conclui-se que ocorreu uma maior perda de características durante a filtração realizada na instalação piloto do que na filtração realizada à escala industrial. Verificou-se que a variação do pH associada ao processo de filtração é mais evidente à escala piloto.

A análise físico-química do produto final mostrou que as suas características se encontram maioritariamente dentro de parâmetros adequados a um produto comercial. Destaca-se, entre os elementos fora das especificações, os valores de turvação, que podem ser atribuídos à ausência da utilização de PVPP à escala piloto.

Conclui-se, através da avaliação organolética do produto final, que este obteve uma avaliação satisfatória em relação a um produto comercial, verificando-se, no entanto, defeitos decorrentes da oxidação do produto.

Desta forma conclui-se que, apesar de o produto final obtido ser aceitável para os padrões existentes para um produto comercial, a utilização de medidas adicionais para o controlo de oxigénio permitirá reduzir a presença de elementos organolépticos negativos

no produto final. Um procedimento que pode permitir reduzir os danos oxidativos é a remoção de oxigénio da pré-camada de terra de diatomáceas utilizada na filtração através da utilização de CO<sub>2</sub>. Além disto, a utilização de uma etapa no processo com utilização de PVPP permitirá reduzir os valores de turvação para limites adequados aos standards de qualidade existentes. (7)

A otimização do processo de filtração à escala piloto deverá ter como objectivo a aproximação aos resultados verificados no filtrado do processo industrial. Este objectivo poderá ser atingido através de um doseamento otimizado dos elementos filtrantes de modo a que seja possível manter de forma mais eficiente as características do produto de fermentação.

## **Considerações finais do estágio**

A realização de um estágio em ambiente empresarial é uma experiência bastante diferente daquela proporcionada pela realização de uma tese em ambiente académico. Trata-se de uma experiência que mostra a um jovem, a iniciar a vida profissional, como uma empresa funciona e como os objectivos diários são estabelecidos e cumpridos para garantir que a empresa honra os seus compromissos.

Este estágio permitiu-me entrar em contacto com diversas componentes da empresa, desde a produção até ao engarrafamento industrial. Tratou-se de uma experiência transversal a um conjunto de áreas que permitiu conhecer a indústria de produção de bebidas de uma forma geral e a indústria cervejeira de uma forma específica.

O desempenho de tarefas durante o dia-a-dia foi integrado no Departamento de Inovação e Desenvolvimento. Este departamento, que gere toda a produção de cervejas especiais da empresa, desde a produção de mosto até à rotulagem, é também ele um local de aprendizagem: realizar tarefas na mini-fábrica e na instalação piloto permitem a um estagiário conhecer a produção de cerveja ao nível mais básico, que pode consistir em manusear matérias-primas ou a recolher amostras em reatores de fermentação.

A nível científico, o trabalho no Laboratório Central da UNICER possibilita compreender o funcionamento de um laboratório profissional em todas as vertentes necessárias à indústria cervejeira. Foi também neste âmbito que foi possível realizar trabalho científico de uma forma dedicada, já que as instalações do laboratório possuem um conjunto de ferramentas/equipamentos que permitem não só trabalho de controlo de qualidade mas também de investigação e desenvolvimento.

De uma forma geral considero o estágio realizado um sucesso. Tratou-se de uma oportunidade de aprendizagem e desenvolvimento pessoal excelente e que considero devidamente aproveitada.

Acredito que a empresa obteve retorno do esforço e tempo despendido no treino e desenvolvimento das minhas competências enquanto estagiário, pois permitiu-me estar envolvido no dia-a-dia da empresa e assumindo responsabilidades que, sem qualquer dúvida, beneficiaram a entidade de acolhimento.

## Bibliografia

1. Unicer Bebidas SA. Relatório de sustentabilidade 2011. Porto, Portugal: Unicer Bebidas, S.A.; 2012.
2. Kunze W. Technology Brewing and Malting. 3 ed. Berlin: VLB Berlin; 2004.
3. Sreenivasulu N, Graner A, Wobus U. Barley Genomics: An Overview. *International Journal of Plant Genomics*. 2008;2008.
4. Gibson BR. 125th Anniversary Review: Improvement of Higher Gravity Brewery Fermentation via Wort Enrichment and Supplementation. *Journal of the Institute of Brewing*. 2011;117(3):268-84.
5. Box A. The biology of *Hordeum Vulgare* L. (barley). In: Regulator Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator, editor.: Australian Government; 2008.
6. Kilian R, Kilian W, Hanelt P, Research IPGCP. *Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops: (Except Ornamentals)*: Springer; 2001.
7. Briggs DE, Boulton CA, Brookes PA, Stevens R. *Brewing - Science and practice*. Abington, Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press, LLC; 2004.
8. Esslinger HM. *Handbook of Brewing - Processes, Technology, Markets*. 1 ed. Weinheim, Germany: Wiley-VHC; 2009.
9. Fonseca MMd, Teixeira JA. *Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações*. 1st ed: Lidel - edições técnicas Lda.; 2007.
10. Lodolo EJ, Kock JLF, Axcell BC, Brooks M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*—the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*. 2008;8(7):1018-36.
11. Verbelen PJ, Saerens SMG, Mulders SE, Delvaux F, Delvaux FR. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;82(6):1143-56.
12. Dijken J, Weusthuis R, Pronk J. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1993;63(3-4):343-52.
13. Nie C, Wang C, Zhou G, Dou F, Huang M. Effects of malting conditions on the amino acid compositions of final malt. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(53):9018-25.
14. Jones BL. Endoproteases of barley and malt. *Journal of Cereal Science*. 2005;42(2):139-56.
15. Brányik T, Vicente AA, Cruz JM, Teixeira JA. Fermentação contínua de cerveja utilizando levedura imobilizada em drêche. *IV Encontro Brasileiro de Química Das Bebidas e Alimentos; São Paulo, Brasil2002*. p. 227.
16. Hough JS. *The Biotechnology of Malting and Brewing*: Cambridge University Press; 1991.
17. Rosenfeld E, Beauvoit B, Blondin B, Salmon J-M. Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(1):113-21.
18. ter Schure EG, van Riel NAW, Verrips CT. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000;24(1):67-83.

19. da Cruz SH, Cilli EM, Ernandes JR. Structural Complexity of the Nitrogen Source and Influence on Yeast Growth and Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*. 2002;108(1):54-61.
20. Magasanik B, Kaiser CA. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 2002;290(1-2):1-18.
21. Boulton CM, Quain D. *Brewing Yeast and Fermentation*: Blackwell Science; 2008.
22. Lekkas C, Stewart GG, Hill AE, Taidi B, Hodgson J. Elucidation of the Role of Nitrogenous Wort Components in Yeast Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*. 2007;113(1):3-8.
23. Pierce JS. The role of nitrogen in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*. 1987;93(5).
24. Jones M, Pierce JS. Absorption of amino acids from wort by yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*. 1964(70):307-15.
25. Perpète P, Santos G, Bodart E, Collin S. Uptake of Amino Acids During Beer Production: The Concept of a Critical Time Value. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2004;63(1):23-7. Epub 2005.
26. O'Conner-Cox ESC, Paik J, Ingledew WM. Improved ethanol yields through supplementation with excess assimilable nitrogen. *Journal of Industrial Microbiology*. 1991;8(1):45-52.
27. Inoue T, Kashihara T. The importance of indices related to nitrogen metabolism in fermentation control. *Technical quarterly - Master Brewers Association of the Americas*. 1995;32(2):109-13.
28. Palmqvist U, Ayrappa T. Uptake of aminoacid in bottom fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*. 1969(75):181-90.
29. Regenberg B, Düring-Olsen L, Kielland-Brandt MC, Holmberg S. Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. 1999;36(6):317-28.
30. O'Conner-Cox ESC, Ingledew WM. Wort nitrogenous sources-their use by brewing yeasts: a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1989;47(Fall 1989):102-8.
31. Casey GP, Magnus CA, Ingledew WM. High-Gravity Brewing: Effects of Nutrition on Yeast Composition, Fermentative Ability, and Alcohol Production. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984;48(3):639-46.
32. Lei H, Zhao H, Yu Z, Zhao M. Effects of Wort Gravity and Nitrogen Level on Fermentation Performance of Brewer's Yeast and the Formation of Flavor Volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012;166(6):1562-74.
33. Fumi M, Galli R, Lambri M, Donadini G, Faveri D. Impact of full-scale brewing processes on lager beer nitrogen compounds. *European Food Research and Technology*. 2009;230(2):209-16.
34. Friedman M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(3):385-406.
35. Lewis MJ, Bamforth CW. *Essays in Brewing Science*. 1 ed 2006.
36. Filipe-Ribeiro L, Mendes-Faia A. Validation and comparison of analytical methods used to evaluate the nitrogen status of grape juice. *Food Chemistry*. 2007;100(3):1272-7.
37. Convention EB. *Analytica - EBC: Carl, Getränke-Fachverl.*; 1998.

38. Thomas KC, Ingledew WM. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56(7):2046-50.
39. Priest FG, Campbell I. *Brewing Microbiology*: Springer; 2002.
40. Nakatani K, Takahashi T, Nagami K, Kumada J. Kinetic study of vicinal diketones in brewing (2): theoretical aspect for the formation of total vicinal diketones. *Technical quarterly - Master Brewers Association of the Americas*. 1984b(21):175-83.
41. Nakatani K, Takahashi T, Nagami K, Kumada J. Kinetic study of vicinal diketones in brewing (1): formation of total vicinal diketones. *Technical quarterly - Master Brewers Association of the Americas*. 1984a(21):73-8.
42. Simpson WJ, editor. *Good Malt - Good Beer? 9th Australian Barley Technical Symposium*; 1999; Melbourne, Victoria, Australia.
43. Han F, Romagosa I, Ullrich SE, Jones BL, Hayes PM, Wesenberg DM. Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley. *Molecular Breeding*. 1997;3(6):427-37.
44. Gorinstein S, Zemser M, Vargas-Albores F, Ochoa JL, Paredes-Lopez O, Scheler C, et al. Proteins and amino acids in beers, their contents and relationships with other analytical data. *Food Chemistry*. 1999;67(1):71-8.
45. Jin Y, Du J, Zhang K, Xie L, Li P. Relationship between Kolbach index and other quality parameters of wheat malt. *Journal of the Institute of Brewing*. 2012;118(1):57-62.
46. Noonan GJ. *New Brewing Lager Beer: The Most Comprehensive Book for Home and Microbrewers*: National Book Network; 2003.
47. Agu RC. Some Relationships Between Malted Barleys of Different Nitrogen Levels and the Wort Properties. *Journal of the Institute of Brewing*. 2003;109(2):106-9.
48. Lekkas C, Hill AE, Taidi B, Hodgson J, Stewart GG. The Role of Small Wort Peptides in Brewing Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*. 2009;115(2):134-9.
49. Lei HJ, Zheng LY, Wang CX, Zhao HF, Zhao MM. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast. *International Journal of Food Microbiology*. 2013;161(2):76-83.
50. Thorne RSW. Nitrogen metabolism of yeast: a consideration of the mode of assimilation of amino acids. *Journal of the Institute of Brewing*. 1949;55(4):201-22.
51. Hernández-Orte P, Ibarz MJ, Cacho J, Ferreira V. Addition of amino acids to grape juice of the Merlot variety: Effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation. *Food Chemistry*. 2006;98(2):300-10.
52. Comrie AAD. Brewing liquor - a review. *Journal of the Institute of Brewing*. 1967;73(4):335-46.
53. Rees EMR, Stewart GG. The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. *Journal of the Institute of Brewing*. 1997;103(5):287-91.
54. Chandrasena G, Walker GM, Staines HJ. Use of response surfaces to investigate metal ion interactions in yeast fermentations. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1997.
55. Walker GM. *Yeast Physiology and Biotechnology*: Wiley; 1998.
56. De Nicola R, Walker GM. Zinc Interactions with Brewing Yeast: Impact on Fermentation Performance. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2011;69(4):214-9.

57. De Nicola R, Walker GM. Accumulation and cellular distribution of zinc by brewing yeast. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009;44(4):210-6.
58. Nelson DL, Osgood M, Cox MM, Ocorr K. *Lehninger Principles of Biochemistry 4e + Absolute, Ultimate Guide*: Macmillan Higher Education; 2004.
59. Jones RP, Greenfield PF. A review of yeast ionic nutrition. I. Growth and fermentation requirements. *Process biochemistry*. 1984;19(2):48-52.
60. Brudzyński A, Salamon A. The Oxalic Acid Content in Selected Barley Varieties Grown in Poland, as well as in their Malts and Worts. *Journal of the Institute of Brewing*. 2011;117(1):67-73.
61. Steiner E, Becker T, Gastl M. Turbidity and Haze Formation in Beer — Insights and Overview. *Journal of the Institute of Brewing*. 2010;116(4):360-8.
62. Vivar HE, McNab A. Breeding Barley in the New Millenium: Proceedings of an International Symposium Held on 13-14 March 2000 in Ciudad Obregon, Sonora, Mexico: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas; 2001.
63. You KM, Rosenfield C-L, Knipple DC. Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(3):1499-503.
64. Smart K. *Brewing Yeast Fermentation Performance*: Wiley; 2008.
65. Dombek KM, Ingram LO. Nutrient limitation as a basis for the apparent toxicity of low levels of ethanol during fermentation. *Journal of Industrial Microbiology*. 1986;1(4):219-25.
66. Ma M, Liu ZL. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;87(3):829-45.
67. Verstrepren KJ, Derdelinckx G, Dufour J-P, Winderickx J, Thevelein JM, Pretorius IS, et al. Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003;96(2):110-8.
68. Hazelwood LA, Daran J-M, van Maris AJA, Pronk JT, Dickinson JR. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(8):2259-66.
69. Guido LF, Rodrigues PG, Rodrigues JA, Gonçalves CR, Barros AA. The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. *Food Chemistry*. 2004;87(2):187-93.
70. Hazelwood LA, Daran JM, van Maris AJA, Pronk JT, Dickinson JR. The ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(8):2259-66.
71. Derrick S, Large PJ. Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *Journal of General Microbiology*. 1993;139(11):2783-92.
72. Boulton C, Box W. Formation and Disappearance of Diacetyl During Lager Fermentation. *Brewing Yeast Fermentation Performance*: Blackwell Science; 2008. p. 181-95.
73. Boulton CA, Quain DF, Molzahn SW. Vicinal diketone reduction as a measure of yeast vitality. *Technical quarterly - Master Brewers Association of the Americas*. 2001;38(2):89-93.
74. Watson TG. Amino-acid pool composition of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of growth rate and amino-acid nitrogen source. *Journal of General Microbiology*. 1976;96(2):263-8. Epub 1976/10/01.

75. Fix GJ. Principles of Brewing Science, Second Edition: A Study of Serious Brewing Issues: Brewers Publications; 2000.
76. Barton-Wright EC. Some aspects of the nitrogen metabolism of yeast. Journal of the Institute of Brewing. 1951;57(6):415-26.
77. Willey JM, Sherwood L, Woolverton CJ. Prescott's Microbiology: McGraw-Hill Higher Education; 2011.
78. Cooper TG, Britton C, Brand L, Sumrada R. Addition of basic amino acids prevents G-1 arrest of nitrogen-starved cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology. 1979;137(3):1447-8.
79. Sumrada R, Cooper TG. Basic Amino Acid Inhibition of Cell Division and Macromolecular Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology. 1978;108(1):45-56.
80. Martinovic S, Vlahovic M, Boljanac T, Pavlovic L. Preparation of filter aids based on diatomites. International Journal of Mineral Processing. 2006;80(2-4):255-60.
81. Samaras TS, Camburn PA, Chandra SX, Gordon MH, Ames JM. Antioxidant Properties of Kilned and Roasted Malts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005;53(20):8068-74.

## Glossário

<b>Álcoois superiores</b>	Conjunto de álcoois produzidos durante o processo fermentativo através do mecanismo de Ehrlich que possuem influência nas propriedades organolépticas do produto final. Neste trabalho consistem em n-propanol, isobutanol e álcoois amílicos.
<b>Ale</b>	Denominação da cerveja obtida através de um processo de fermentação alta.
<b>Amargor</b>	Critério quantitativo da presença de iso- $\alpha$ -ácidos no produto final. Estes conferem o sabor amargo, sendo indicados segundo unidades de UA (unidades de amargor), que correspondem a mg/L. Neste trabalho é utilizada a convenção EBC.
<b>Analytica, EBC</b>	Compêndio de métodos laboratoriais para a indústria cervejeira e de maltagem produzido pelo Comité de Análise da <i>European Brewery Convention</i>
<b>Atenuação</b>	Parâmetro calculado a partir do extrato real (podendo também ser utilizado o extrato aparente), em função da gravidade específica do líquido. É utilizado como indicador do estado da fermentação, sendo apresentado como percentagem (%).
<b>Atenuação aparente</b>	Parâmetro obtido com o extrato aparente em função da gravidade específica do líquido. Indica o estado da fermentação sem a realização de correções para a presença de etanol e conseqüente diminuição da gravidade específica.
<b>Atenuação limite</b>	Teste laboratorial para avaliar a capacidade fermentativa de um mosto. Uma alíquota de mosto é inoculada com uma grande quantidade de levedura de modo a atingir a concentração mínima de extrato num intervalo de tempo pequeno. O extrato assim obtido é utilizado para calcular a atenuação limite do mosto.
<b>Atenuação real</b>	Parâmetro de atenuação que utiliza o extrato real em vez do extrato aparente para determinar a percentagem de atenuação do líquido em fermentação. Desta forma, o resultado possui correção para a influência do etanol na gravidade específica.
<b>Calda</b>	Suspensão rica em açúcares produzida pela mistura entre o adjunto e a água quente. Geralmente é adicionado à calda algum elemento que fornece enzimas, de modo a ser possível degradar os polissacarídeos. Após a formação da suspensão, de acordo com o diagrama de fabrico do mosto, é misturada com a suspensão proveniente da empastagem do malte.
<b>Congress marsh</b>	Mosto obtido realizando o processo de produção de mosto laboratorialmente, incluindo a moagem. Este procedimento permite avaliar as características das matérias-primas que lhe deram origem.
<b>Crabtree, Efeito</b>	Efeito em que uma célula, quando exposta a um meio com uma elevada concentração de açúcares, produz energia quase exclusivamente através da glicólise originando a produção de etanol. Mesmo na presença de

oxigénio, a fosforilação oxidativa não é realizada até ultrapassado um determinado intervalo de tempo.

<b>Diacetilo</b>	Dicetona vicinal, 2,3-butanodiona, que confere ao produto final um sabor intenso a "manteiga", ou lípidos. Tem uma concentração máxima permitida no produto final de 0,07 mg/L.
<b>Diazotrofia</b>	Capacidade de alguns microrganismos de fixar azoto atmosférico (azoto não orgânico) em formas mais fáceis de utilizar (amónia) pelos organismos. Um organismo não-diazotrófico não possui esta capacidade.
<b>Dicetonas vicinais</b>	Conjunto de moléculas que possuem dois grupos cetona. São subprodutos da síntese de valina e isoleucina. Os elementos deste grupo mais relevantes na indústria cervejeira são o diacetilo (2,3-butanodiona) e a 2,3-pentanodiona, devido às suas características organoléticas: conferem ao produto um sabor a "manteiga", ou lípidos.
<b>Drêche</b>	Componente sólida não solúvel que é filtrada do líquido antes da ebulição. Esta componente consiste principalmente nos invólucros dos grãos de malte, sendo posteriormente utilizada para alimentação animal.
<b>European Brewery Convention</b>	Organização que representa os interesses técnicos e científicos da indústria produtora de malte e de cerveja na Europa. Esta organização produziu, mantém e atualiza o compêndio de métodos laboratoriais para a indústria, denominado <i>Analytica</i> .
<b>Ésteres</b>	Neste trabalho, a referência a ésteres refere-se aos importantes elementos organoleticamente ativos que podem influenciar o produto final. Estes possuem aromas e sabores frutados/solvente e compreendem as moléculas de acetato de etilo e acetatos amílicos.
<b>Extrato</b>	Relação estabelecida empiricamente entre a densidade do mosto, ou líquido e a concentração de açúcares. Esta relação encontra-se tabelada e é indicada em unidades de gramas de sacarose por 100 gramas de solução (g/100g), denominado grau Plato (°P).
<b>Extrato aparente</b>	Extrato que é calculado diretamente a partir da leitura de densidade de um líquido em fermentação, pelo que é influenciado pela presença de etanol.
<b>Extrato limite</b>	Extrato obtido em g/100mL, que é referente ao teste laboratorial do mosto. Trata-se da menor concentração de extrato que pode ser obtida, em função do extrato original do mosto. Este parâmetro permite calcular a atenuação limite.
<b>Extrato primitivo</b>	Extrato teórico original do líquido, obtido após a conversão da densidade original. Esta é obtida após a determinação do conteúdo em álcool e do extrato real.
<b>Extrato real</b>	Extrato calculado através da densidade de um líquido, de volume conhecido, à qual foi retirado o etanol por destilação, ou com uma quantidade determinada de etanol.

<b><i>Free amino nitrogen (FAN)</i></b>	Azoto aminado livre. Determinado em mg/L, o FAN expressa a quantidade de azoto que se encontra disponível para ser fermentado pelo microrganismo. O método de quantificação de FAN permite avaliar a quantidade de grupos amina livres em aminoácidos e péptidos, bem como quantificar a amónia presente no meio.
<b>Grau Plato</b>	Unidade de massa de sacarose por 100 gramas de solução. É utilizado como indicador da presença de açúcares no líquido através da relação empírica existente entre a concentração destes e a densidade do líquido.
<b>Gritz de milho</b>	Matéria-prima não maltada, rica em açúcares fermentáveis, utilizada como adjunto ao malte. Tem o objetivo de aumentar a gravidade específica do mosto. É utilizado na calda, que depois é junto à mistura proveniente da empastagem do malte.
<b>Índice de Kahlbach</b>	Rácio entre componente proteica solúvel e componente proteica não solúvel, ou entre o azoto solúvel e o azoto total. Trata-se de uma medida que se relaciona com a modificação do malte, particularmente as modificações nas proteínas.
<b><i>Kieselguhr</i></b>	Também denominado terra de diatomáceas, é um vestígio fossilizado de organismos unicelulares microscópicos. As suas características, como a porosidade, tornam este recurso fóssil um excelente adjunto de filtração.
<b><i>Lager</i></b>	Denominação da cerveja obtida através de um processo de fermentação baixa.
<b>Maltagem</b>	Processo de transformação da cevada, ou outros cereais, em malte. O objetivo do processo é transformar as substâncias de reserva dos grãos em nutrientes que sejam facilmente metabolizados pela levedura que realiza a fermentação. Para isso, a cevada passa por um processo de germinação e secagem.
<b>Malte</b>	Matéria-prima obtida após a ocorrência de um processo de maltagem.
<b><i>Stuck fermentation</i></b>	Fermentação em que a levedura é incapaz de prosseguir com o processo fermentativo, mesmo quando ainda existe uma quantidade elevada de nutrientes fermentáveis, como os açúcares, no meio de cultura. Existe um grande número de fatores que podem ser responsáveis pela paragem de uma fermentação, no entanto destaca-se a exaustão nutricional de azoto.
<b><i>Trub</i></b>	Componente proteica não solúvel do mosto que se encontra em suspensão. Esta precipita após a ebulição durante o processo de produção de mosto.
<b>Turbidez</b>	Alteração nas propriedades óticas do produto final causada por partículas em suspensão. Estas partículas podem ter origem orgânica ou inorgânica, variando em dimensões desde partículas coloidais até sólidos de dimensões macroscópicas.



## Anexos

### Anexo A

#### A.1

Tabela 30 – Características dos estudos do consumo de aminoácidos. (24, 25, 28)

	<b>Pierce e Jones (1964)</b>	<b>Palmqvist e Ayrapaa (1969)</b>	<b>Perpète (2005)</b>
<b>Estirpes</b>	Saccharomyces cerevisiae Guinness 4200	S. carlsbergensis U15	S. cerevisiae BRAS 291, 212 e 12 Co-culturas industriais de 3 estirpes de fermentação alta
<b>Agitação</b>	Agitado (Erlenmeyers e recipientes industriais)	Agitado e não agitado	Agitado (Erlenmeyer) e não agitado (tubos EBCe recipiente industrial)
<b>Temperatura</b>	15,5 e 23°C	8-9°C	22 e 28°C
<b>Meio</b>	10-12°P	10°P	12°P
<b>Grupo A</b>	Glutamato, glutamina, aspartato, asparagina, serina, treonina, lisina e arginina	Asparagina, glutamina, serina, treonina	Aspartato, glutamato, serina, treonina, lisina e metionina
<b>Grupo B</b>	Valina, metionina, leucina, isoleucina e histidina	Metionina, lisina, aspartato, leucina, glutamato, isoleucina e arginina	Valina, arginina, leucina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina e triptofano
<b>Grupo C</b>	Glicina, fenilalanina, tirosina, triptofano e alanina	Valina, histidina, fenilalanina, alanina, tirosina, triptofano, glicina e prolina	Valina e alanina
<b>Grupo D</b>	Prolina		Prolina

## B.1

SILO		PEWTER E 11	PEWTERE 11	PEWTERE 11	PRESTIGE E 11	BRAEMAR P 11	ESTEREL E 11
VARIEDADE							
Mistura (%)							
HUMIDADE (%)	4,5	4,2	4,3	4,9	4,9	4,9	4,2
EXTRACTO S.M.S. (%)	82,3	82,7	82,4	81,8	81,8	82,7	81,3
DIFE. fino-grosso (%)	0,8	1,3	1,1	2,3	2,3	1,7	1,1
SACARIFICAÇÃO (minutos)	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
FILTRACÃO (minutos)	60,0	60,0	60,0	60,0	60,0	60,0	60,0
COR DISCOS E.B.C.	3,8	4,1	3,7	3,1	3,1	4,5	3,6
COR ESPECTOFO							
PROTEINA TOTAL (%)	9,65	9,46	9,64	9,75	9,75	12,25	10,76
PROTEINA SOLUVEL (%)	4,18	4,30	4,32	3,71	3,71	4,99	4,51
INDICE DE KOLBACH	43,4	45,4	44,8	38,1	38,1	40,7	41,9
VISCOSIDADE (cp)	1,49	1,46	1,48	1,53	1,53	1,60	1,56
HARTONG 45 °C	42,9	43,5	43,6	36,2	36,2	47,2	38,6
pH	6,11	6,15	6,11	6,10	6,10	6,01	6,19
PODER DIASTÁSICO (WK)	251	273	262	240	240	374	396
F.A.N. ( mg/100 g.)	131	143	135	112	112	153	139
BETA GLUCANAS (mg/L)	151	60	99	235	235	209	161
ANALISIS FISICOS							
DESAGREGAÇÃO (%)	95	95	95	90	90	98	94
HOMOGENEIDADE (%)	77	77	77	69	69	86	76
CRIVO >2,8 mm. (%)	71,6	75,0	70,2	62,3	62,3	76,5	75,6
CRIVO >2,5 mm. (%)	21,2	18,9	20,8	30,0	30,0	14,4	20,0
CRIVO >2,2 mm. (%)	4,2	3,3	5,4	5,1	5,1	4,6	2,4
CRIVO <2,2 mm(resíduos)/%	1,6	1,6	2,2	1,5	1,5	2,9	0,8
GRÃOS PARTIDOS (%)	1,4	1,2	1,4	1,1	1,1	1,6	1,2
FRIABILIDADE (%)	93,1	95,7	94,4	87,4	87,4	92,2	83,8
SEMI-VITREOS (%)	0,3	0,0	0,1	1,0	1,0	1,2	2,7
VITREOS (%)	0,2	0,0	0,0	0,2	0,2	0,8	0,7

Figura 30 - Especificações para malte de uma empresa produtora

## B.2

Specification	Justification	Useful?
Moisture	Key parameter. Breakage of malt at low moisture. Risk of spoilage at high moisture. Financial implications too as malt sold on weight basis.	Yes
Extract (fine grind)	Key parameter. Aim is to predict extract yield from the brewhouse.	Yes
Extract (coarse grind)	Important parameter. Gives information relating to malt modification.	Yes
Fine-coarse difference	Important parameter. Gives information relating to malt modification.	Yes
Cold water extract	Gives information relating to malt modification.	Sometimes
Total nitrogen (TN)	Key parameter. Malts with high total nitrogens are unsuited to beer production, giving problems with microbiological stability, colloidal stability, beer flavour, and beer flavour stability.	Yes
Total soluble nitrogen	Key parameter. Malts with high total soluble nitrogens are unsuited to beer production, giving problems with microbiological stability, colloidal stability, beer flavour, and beer flavour stability.	Yes
Kolbach index	Key (and often maligned) parameter which relates to malt modification, particularly with respect to protein modification.	Yes
Free amino nitrogen	Relates to protein modification.	Sometimes
Dextrinizing power (DP)	Relates to enzyme potential of malt.	Yes
DP/TN ratio	Corrects apparent enzymes level for amount of protein present.	Sometimes
Amylase activities	Relates to levels of saccharifying enzymes.	Sometimes
Friability	Key parameter. Relates to modification and milling potential.	Yes
Attenuation limit	Crude indication of brewery fermentation performance.	Sometimes
Wort viscosity	Useful predictor of wort run-off.	Yes
Beta-glucan content	Useful predictor of wort run-off and, when done by staining of grain, gives information on pattern of modification.	Yes
S-Methyl-methionine	Indicator of DMS potential.	Yes
Acrospire length	Indication of grain growth and modification. Can be difficult to assess.	Sometimes
Wort pH	Screen for defects.	Sometimes
Wort taste	Screen for defects.	Yes
Colour	Key parameter. Aim is to predict wort colour.	Yes
Homogeneity	Key parameter. Methodology is a problem.	Yes
Chloropropanols	Screen for harmful substances in coloured malts.	Yes
N-Nitrosodimethylamine	Screen for harmful substance.	Yes
Appearance	Key parameter. Absence of infestation; level of stones <i>etc.</i>	Yes
Pesticide residues	Screen for defects.	Yes

Figura 31 - Tabela com especificações utilizadas para seleção de malte. (42)

### B.3

amino acid	green malt	lager malt	pale malt <sup>b</sup>	cara malt	crystal malt	black malt	chocolate malt	roasted barley
aspartic acid	5.35	5.25	2.10	2.13	nd	nd	nd	nd
hydroxyproline	nd <sup>c</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
threonine	2.68	4.20	2.10	1.60	0.52	0.51	0.51	0.51
serine	4.01	4.20	2.10	1.60	0.52	nd	nd	nd
glutamic acid	4.01	6.30	3.14	1.07	1.05	nd	nd	nd
asparagine	8.03	10.49	3.14	4.26	2.10	nd	nd	nd
glutamine	14.72	15.74	6.29	2.67	0.52	0.51	0.51	0.51
proline	16.05	30.43	9.43	9.06	3.67	0.51	nd	nd
glycine	1.34	2.10	1.05	0.53	0.52	0.51	0.51	0.51
alanine	4.01	5.25	3.14	1.60	1.57	0.51	nd	nd
valine	6.69	7.35	3.14	2.67	1.57	0.51	0.51	0.51
cystine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
methionine	1.34	2.10	1.05	0.53	0.52	0.51	0.51	0.51
isoleucine	4.01	4.20	2.10	0.53	0.52	0.51	0.51	0.51
leucine	8.03	8.39	4.19	1.60	0.52	0.51	0.51	0.51
tyrosine	4.01	6.30	3.14	1.60	0.52	0.51	0.51	0.51
phenylalanine	6.69	8.39	4.19	2.13	1.05	nd	nd	1.03
$\gamma$ -aminobutyric acid	5.35	4.20	2.10	1.07	nd	nd	nd	nd
ornithine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
lysine	5.35	5.25	3.14	0.53	0.52	nd	nd	0.51
tryptophan	2.68	3.15	1.05	1.07	0.00	nd	nd	nd
histidine	2.68	4.20	1.05	0.53	0.52	nd	nd	nd
arginine	4.01	9.44	4.19	2.13	1.05	1.03	nd	1.03
total	111.04	146.90	61.84	38.91	17.29	6.18	4.12	6.68

Figura 32 – Comparação da concentração de aminoácidos entre maltes com diferentes níveis de cor. A cor dos maltes é crescente da esquerda para a direita. (81)

## Anexo C

### C.1

Tabela 31 – Lotes de malte utilizados no projecto MPA.

Nº	Cevada	Tipo	Plantação	Composição
1	<b>Pewter</b>	Dística	Primavera	
2	<b>Braemar</b>	Dística	Primavera	
3	<b>Esterel</b>	Hexástica	Inverno	
4	<b>Prestige</b>	Dística	Primavera	
5	<b>Composto</b>			45% Pewter, 15%Prestige, 15% Braemar, 20%Esterel

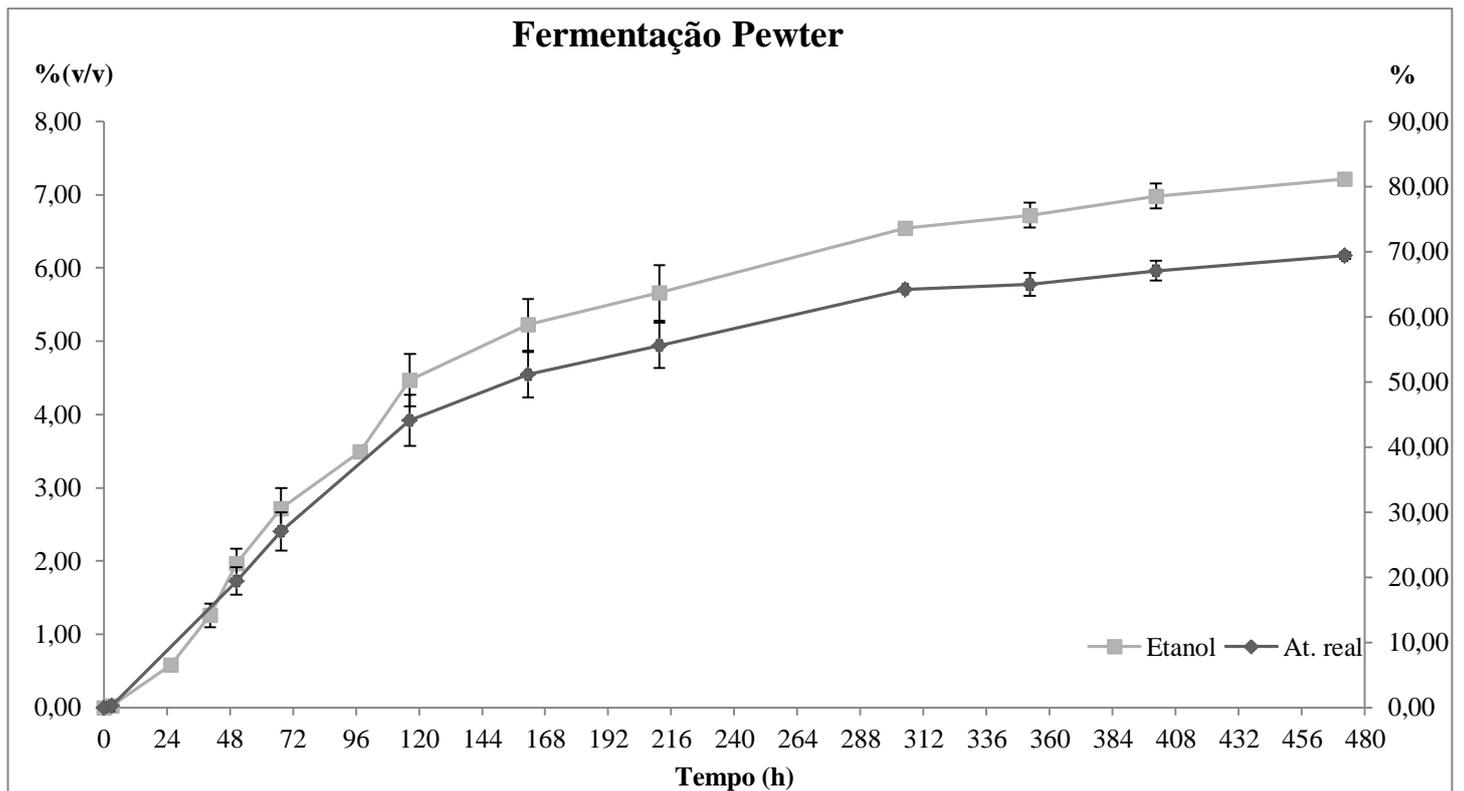


Figura 33 - Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (%v/v) verificados na fermentação Pewter.

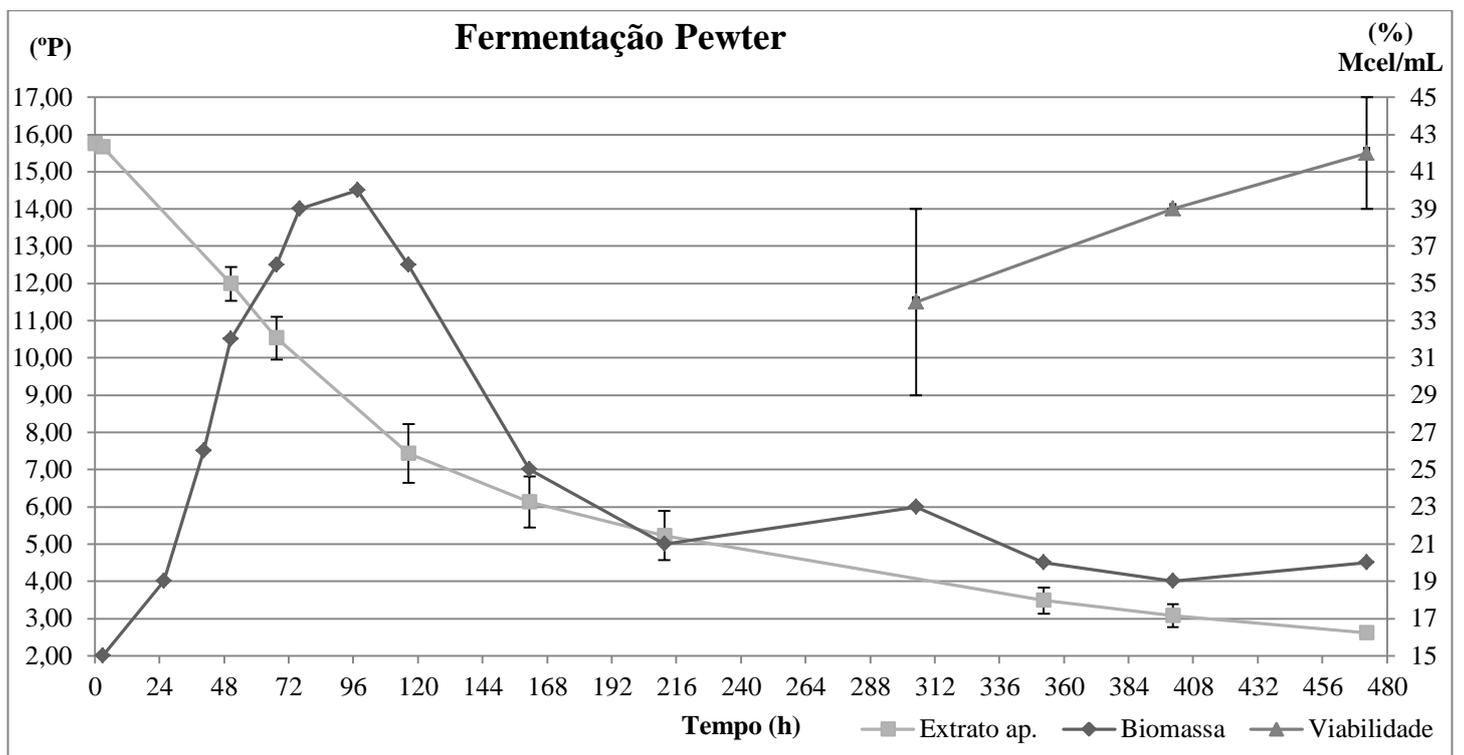


Figura 34 - Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Pewter.

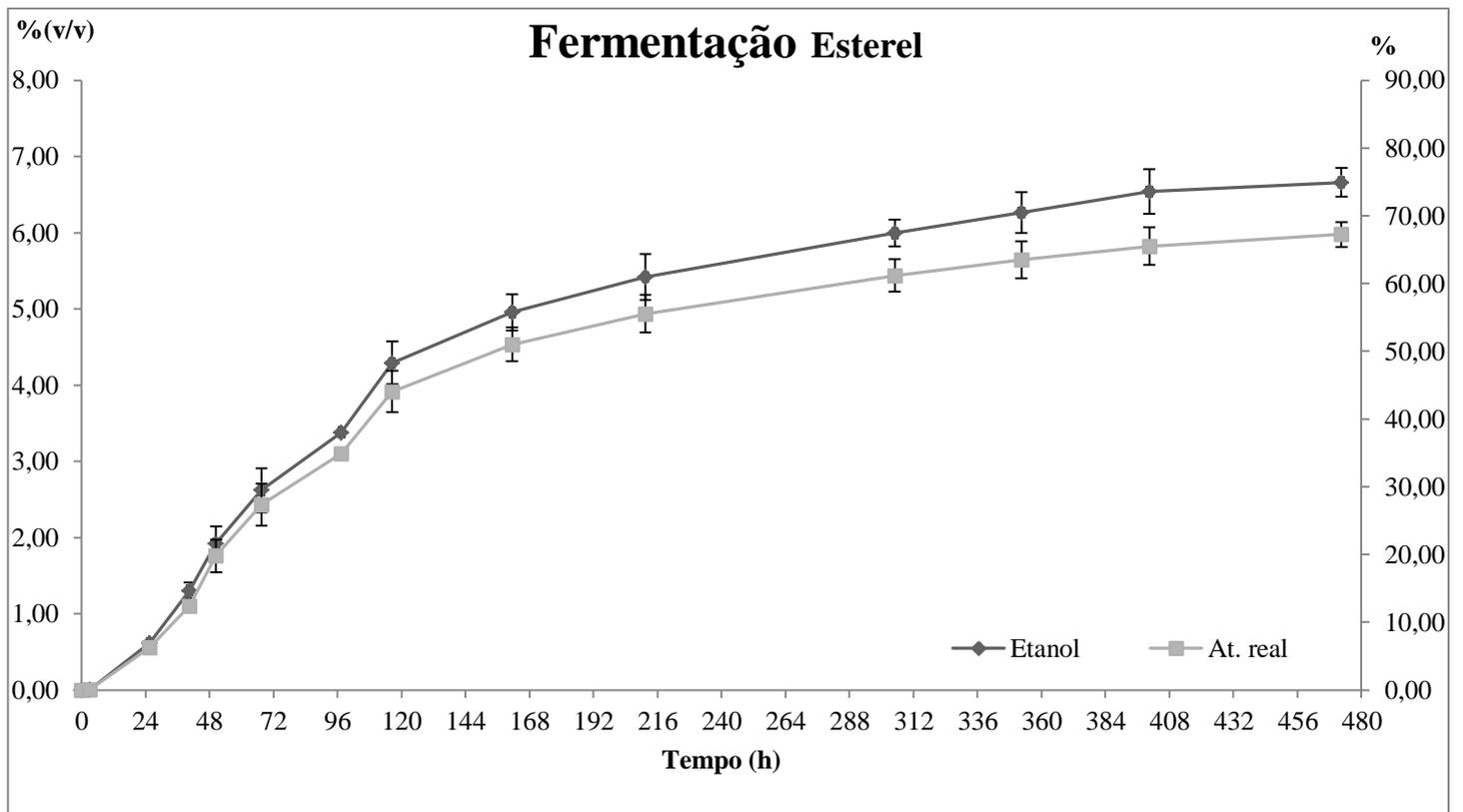


Figura 35 - Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (%v/v) verificados na fermentação Esterel.

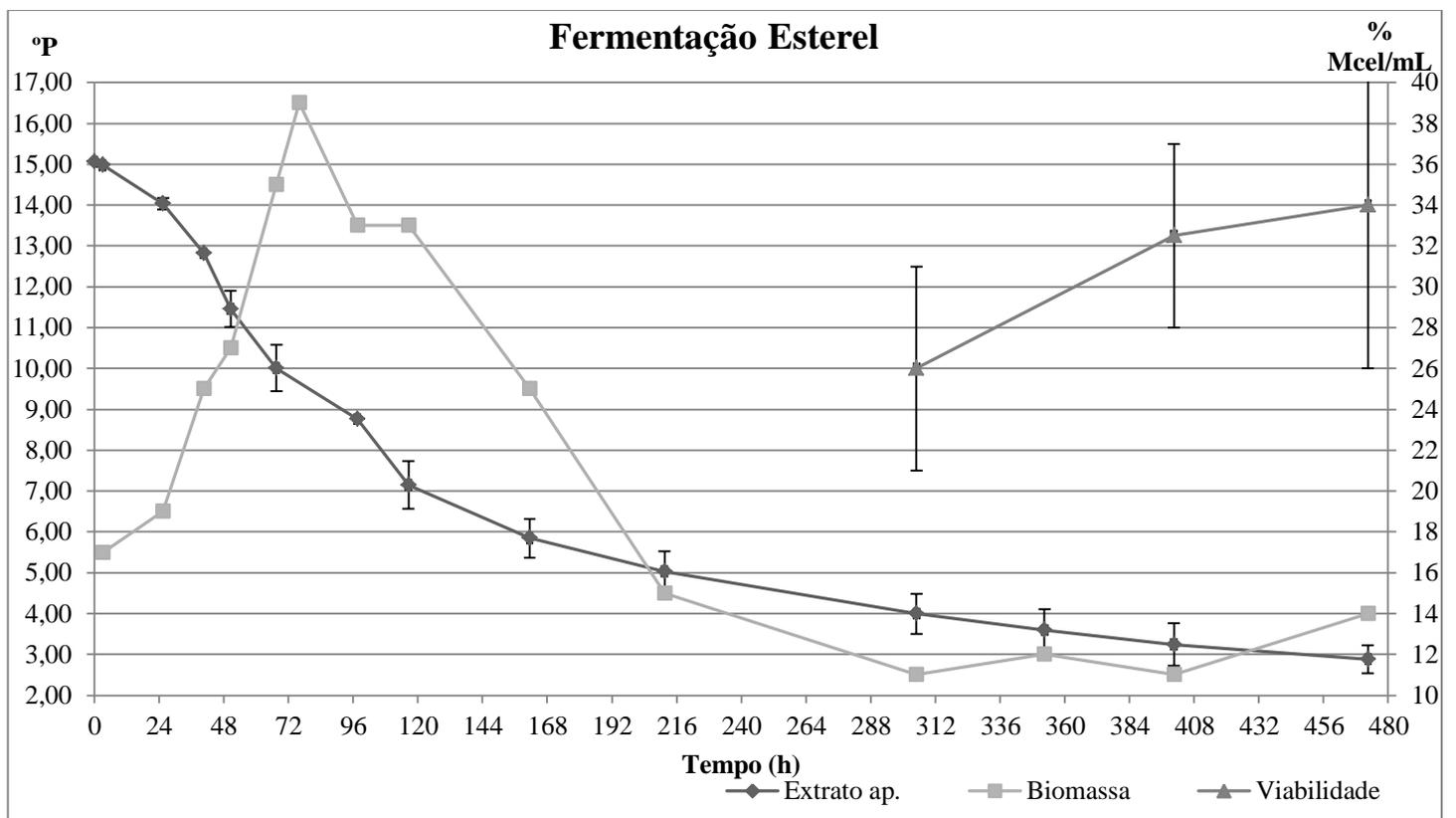


Figura 36 - Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Esterel.

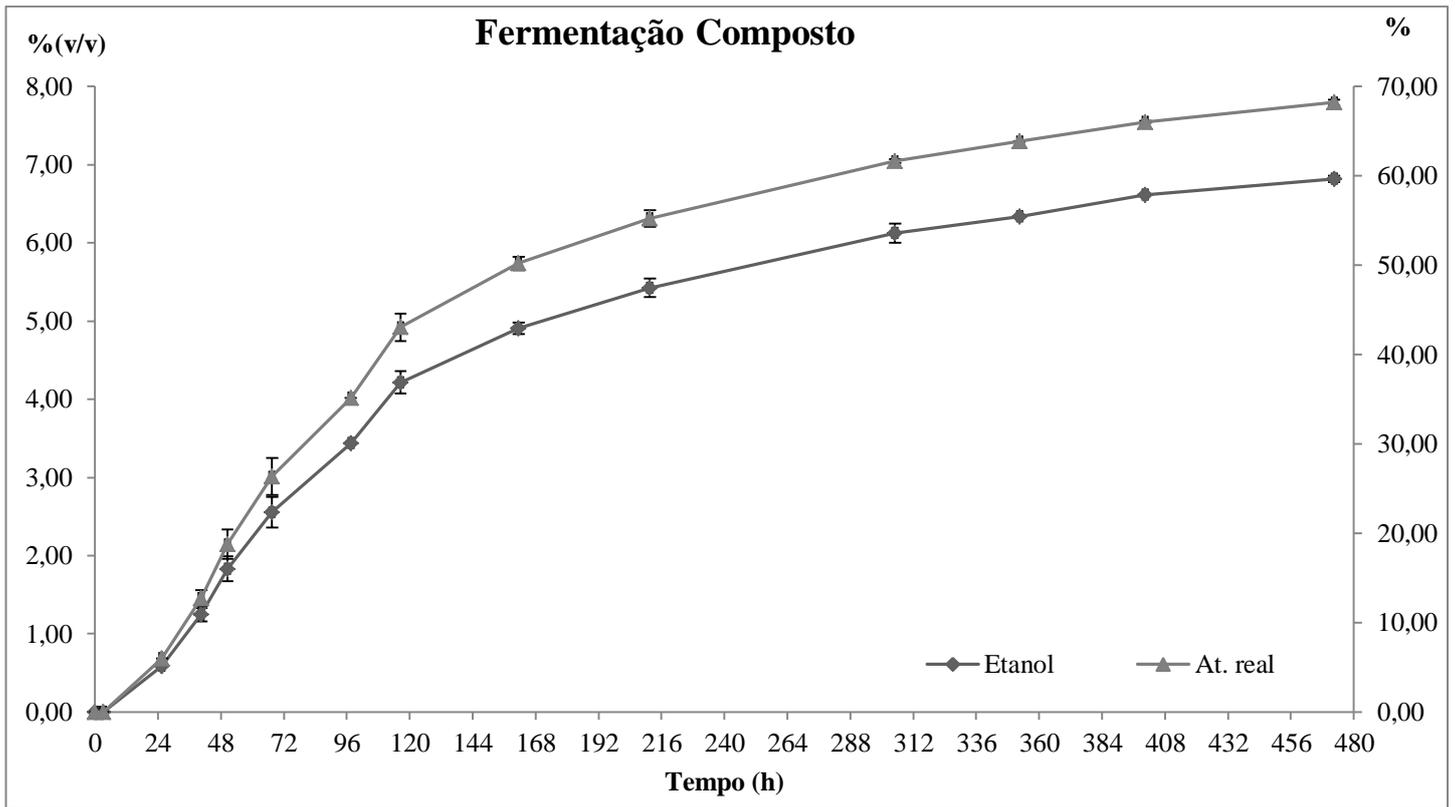


Figura 37 - Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (%v/v) verificados na fermentação Composto.

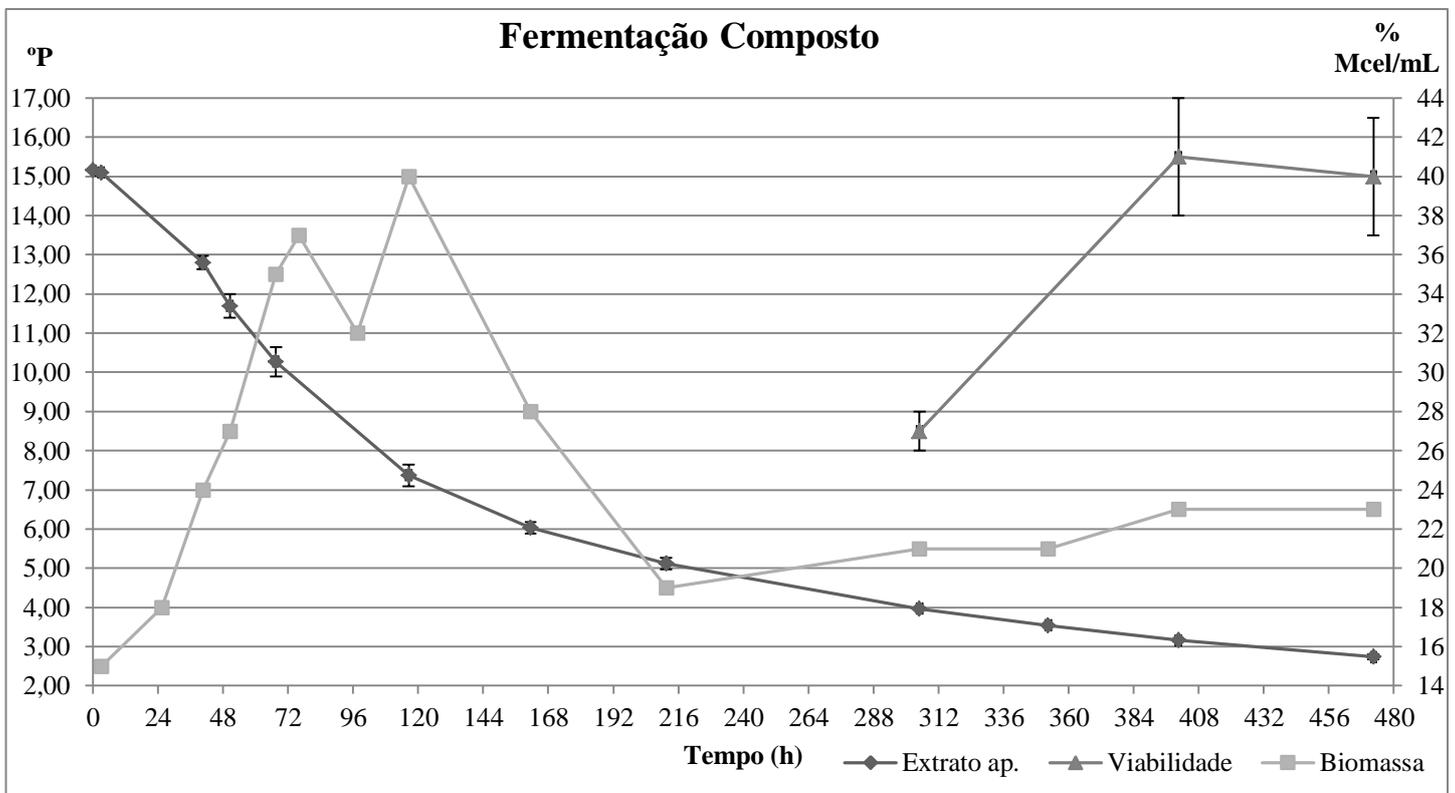


Figura 38 - Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Composto.

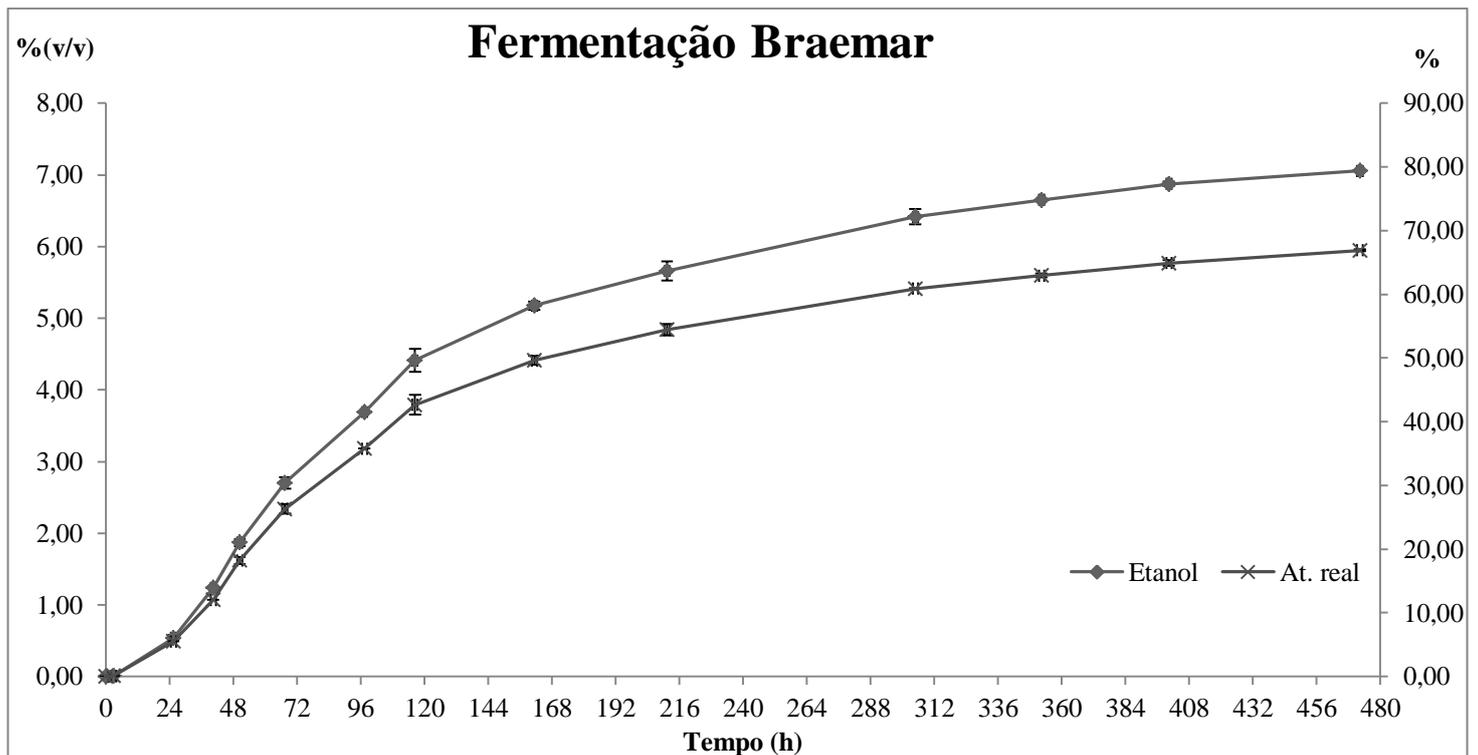


Figura 39 - Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (%v/v) verificados na fermentação Braemar.

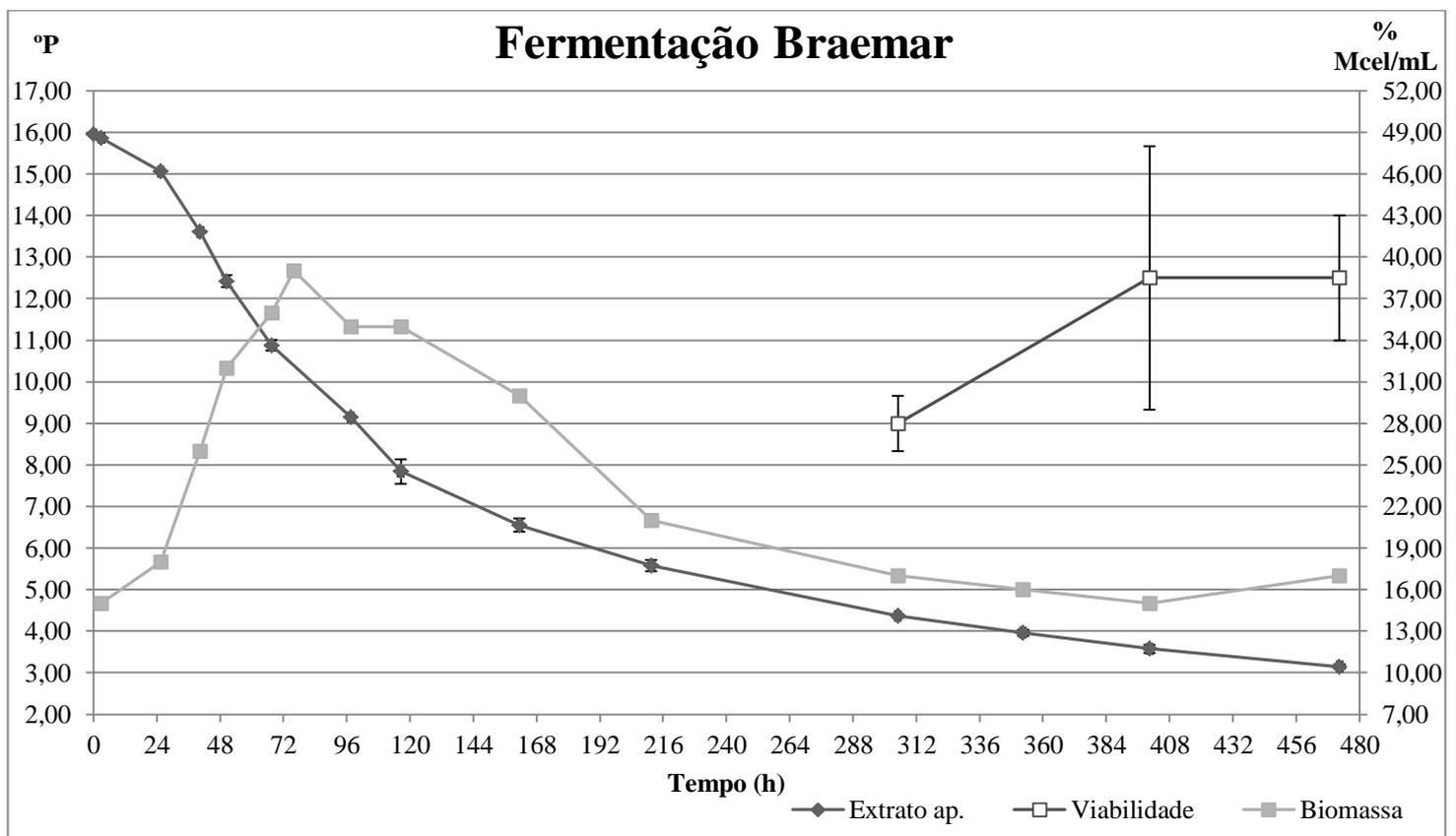


Figura 40 - Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Braemar.

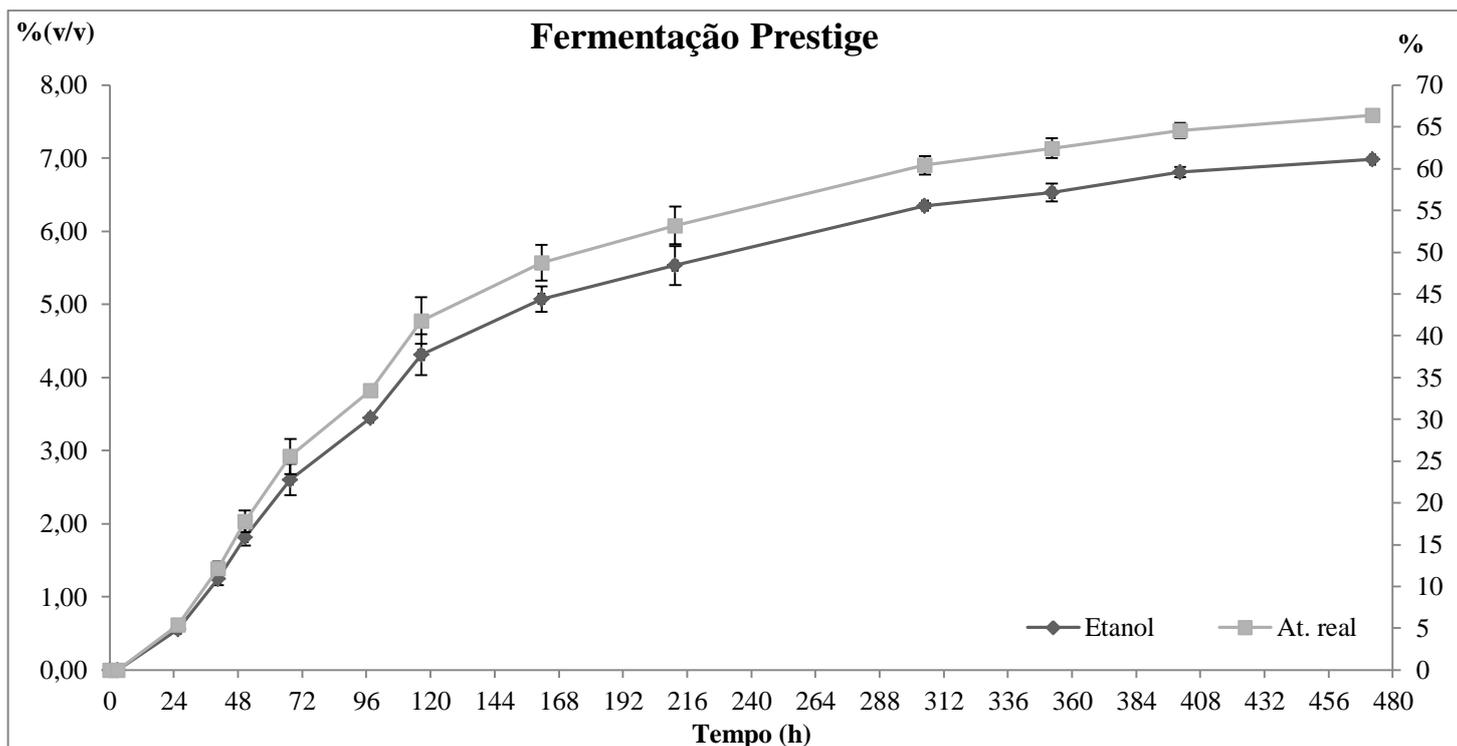


Figura 41 – Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (%v/v) verificados na fermentação Prestige

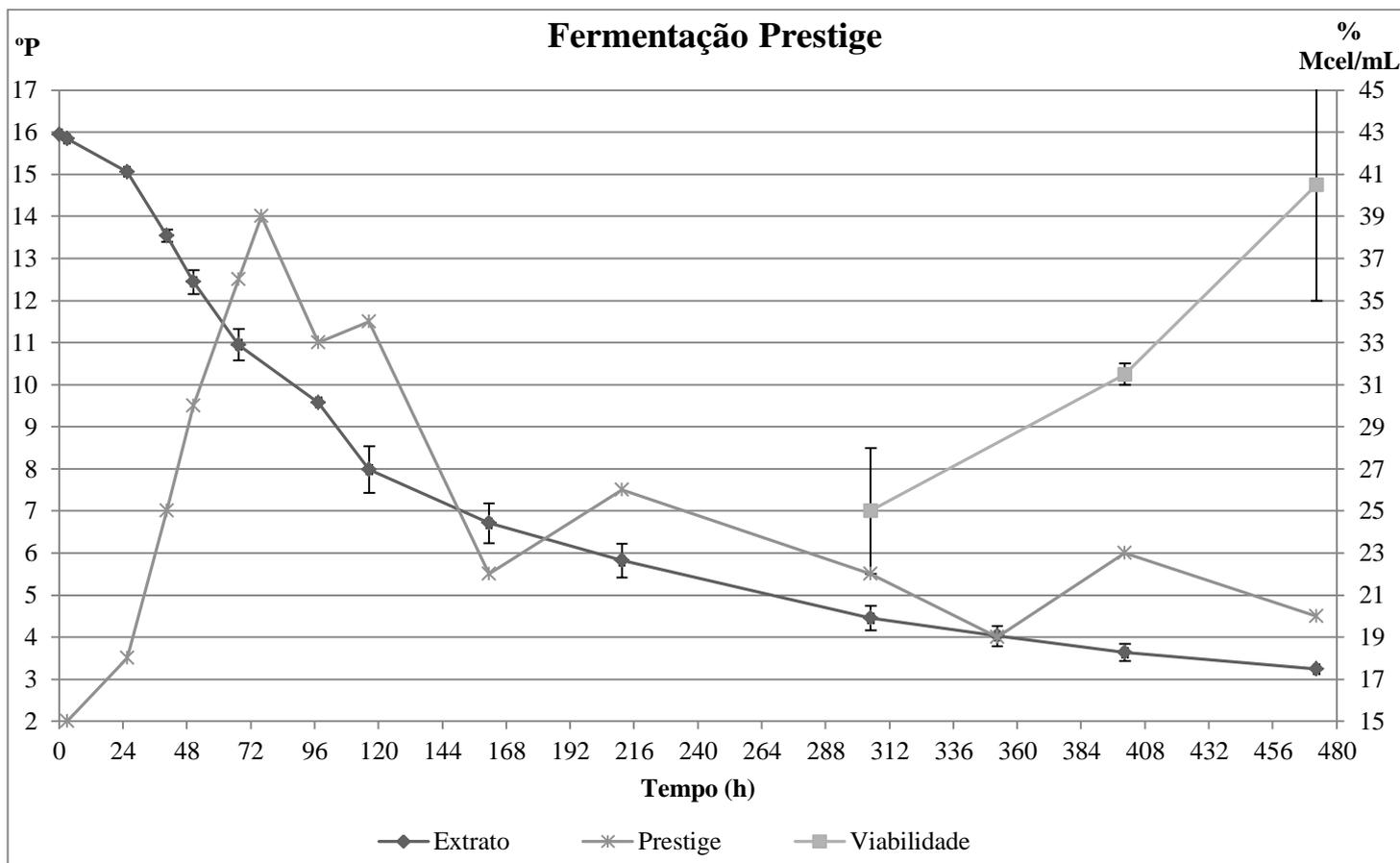


Figura 42- Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Prestige

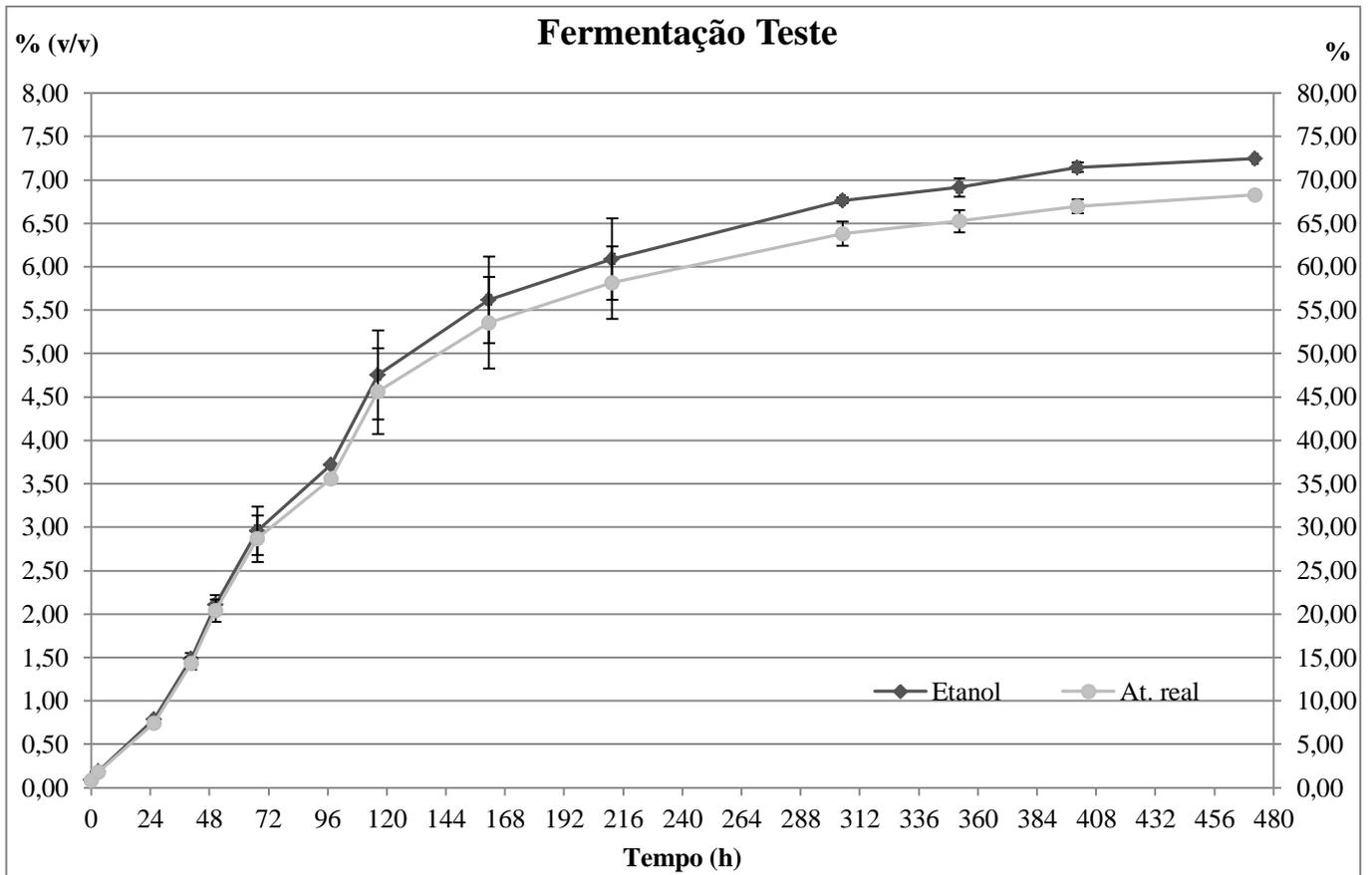


Figura 43 – Resultados de atenuação real (%) e concentração de etanol (% v/v) verificados na fermentação Teste

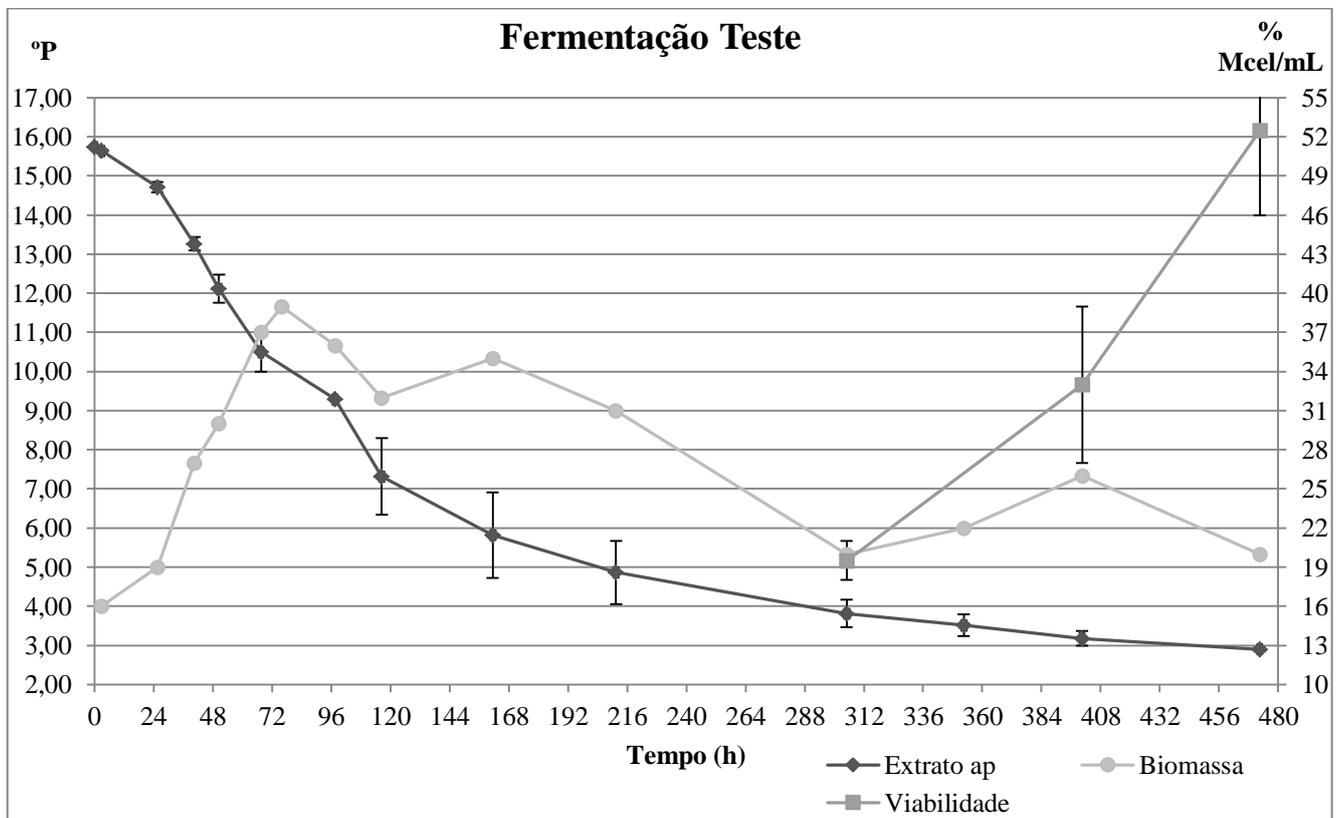


Figura 44 – Variação de extrato aparente (°P), Biomassa (Mcel/mL) e percentagem de células inviáveis verificadas na fermentação Teste

D.1

**Tabela 32 – Descrição da avaliação numérica atribuída pelo painel de provadores**

<b>Avaliação</b>	<b>Descrição</b>
<b>1</b>	Produto sem sabores e aromas defeituosos e com características ótimas
<b>0</b>	Produto adequado, sem defeitos críticos, aceitável para comercialização
<b>-1</b>	Produto defeituoso com presença de elementos indesejáveis. Não aceitável para comercialização
<b>-2</b>	Produto com defeitos graves, impróprio para consumo

Tabela 33 – Tabela com a terminologia recomendada pela EBC para descrever sensações de aroma/gosto

2.00.0. AROMA		TERMINOLOGIA RECOMENDADA PELO EBC E ASB PARA DESCREVER IMPRESSÕES DE AROMA/GOSTO				RELATIVO:	FUC009.02
2.00.0. AROMA	2009 Aromas insuficientes	03 CEREJAS	02 ENXOBE	03	02	0 = AROMA; T = GOSTO M = IMPRESSÃO NA BOCA W = REQUENTADO; Af = "Amêre-gol"	
2.10.0	Espectrais	0310 A. GRÃOS	0700 A. ENXOFRE	OT	0700	DOCE	
2.106	Baurilha	0311A casca/ fibra celulose	0710 SULFÍTICO	OT	1001A	DOCE	
2.107	Cravo da Índia	0312 A. griz de milho	0720 SULFIDRICO	OT	1002 A	DOCE	
2.108	Canela	0313 A. farinha	0721H2S	OT	1003 Baurilha	DOCE	
2.120	QUÍMICO	0320 A. MALTE	0722 Mercaptanas	OT	1004 "Printing"	DOCE	
2.121	Plástico	0330 A. MOSTO	0723 A. alho	OT	1005 X. amole	DOCE	
2.122	Sintético		0724 Luz	OT	1006 Demasiado doce	DOCE	
2.123	Acetaldeído	04 CARAMELIZADO, TORRADO, GRELHADO	0725 Autólise	OT			
2.124	Hidrocarbonetos		0726 Borracha queimada	OT	SALGADO		
2.125	Verriz	0410 CARAMELO	0727 A. camarões	OT			
2.140	FRUTOS ESTRANHOS AO PRODUTO	0411M. diago	0729 Cebola	OT	1100	SALGADO	
2.142	M. açú	0412 Algaçuz	0730 LEGUMES COZIDOS	OT			
2.143	Banana	0420 QUEIMADO	0731Algo	OT			
2.144	Grossolha preta	0421 Crosta de pão	0732 DM S	OT			
2.145	Melão	0422 Cevada torrada	0733 Couves cozidas	OT			
2.146	Pera	0423 A. fumo	0734 Milho doce cozido	OT	1200	AMARGO	
2.147	Framboesa		0735 Tomate cozido	OT	1201 Demasiado amargo	AMARGO	
2.148	Morango		0736 Cebola cozida	OT	1202 Insuficiente amargo	AMARGO	
2.149	Ananás		0740 LEVEDURA	OT	1218 Duro, Aspero	AMARGO	
2.151	Demascó		0741A. carne	OT	1219 "Amêre-gol"	AMARGO	
2.152	Priseço			OT			
2.153	Toranja		08 ENVELHECIDO, OXIDADO, A. MOFO	OT		SENSAÇÃO NA BOCA	
2.154	Tangerina			OT			
2.155	Lima		0800 ENVELHECIDA	OT	1310	ALCALINO	
2.156	Limão		0810 A. GATO	OT	1320	"M. DELEUX"	
2.157	Laranja		0820 A. PAPEL	OT	1330	METÁLICO	
2.160	FLORES		0826 Oxidada	OT	1340	ADSTRINGENTE	
2.163	Perfume		0828 A. pão	OT	1341	Seco	
2.180	FRESCO		0829 Sobreaparelizado	OT	1350	A. PÓ	
2.190	SINTÉTICO			OT	1360	CARBONATAÇÃO	
2.191	Ribupado		0830 A. COURO	OT	1361	Carbonatado insuficiente	
2.192	Estaladas		0840 A. MOFO	OT	1362	Sobrecarbonatado	
2.193	Casca fruta		0841A. terra	OT		REQUENTADO	
2.20.0	RESINA, NOZES, VERDURA, ERVAS		0842 A. bolores	OT	1370		
2.210	RESINA		09 ÁCIDO, ACRE	OT			
2.220	NOZES		0900 ÁCIDO	OT	1410	CORPO	
2.221	Noz		0910 ACETICO	OT	1411	Aquado	
2.222	Noz de Cobo		0920 ACRE	OT	1412	Sem característicos	
2.223	Fava			OT	1413	Que enfria	
2.224	Amêndoas			OT	1414	Incorporado (espesso)	
2.230	ERVA S			OT	1477	Agridulce	
0231	Erva recentemente cortada			OT	1478	Equilibrado	
0232	Tipo palha			OT	1479	Desquilibrado	
				OT	1480	INCARACTERIZÁVEL	

Tabela 34 – Tabela com a terminologia simplificada para descrever as sensações de aroma/gosto.



Unicer - Novembro 2010



Unicer - Novembro 2010

		Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	0111	Especiarias	Tapar / agitar copo Longos 'Sniff'	Spicy Especiarias
	0130	Butirato de etil	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Frutos Tropicais Ananás
	0131	Acetato de isoamila	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Isoamyl acetate Banana
	0132	Hexanoato de etil	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Ethyl hexanoate Maçã / Anis
	0150	Acetaldeído	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Acetaldehyde Maçã verde / Maçã esmagada / Solvente
	0162	Geraniol	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Geraniol Rosas / Flores
	0171	Lúpulo em caldeira	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Nettle hop Lupulagem tardia Especiarias
	0173	Óleo de lúpulo	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Hop oil Lúpulo
	0224	Amêndoas	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Almond Maspapan / Amêndoas Amargas
	0231	Erva	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Freshly cut grass Relva cortada de fresco Folhas verdes esmagadas
	0310	Grãos	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Grainy Malte 'verde' / Áspero
	0423	Fumado	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Smoky Fumo / Bacon fumado / Carne fumada



Unicer - Novembro 2010

Pág 1 de 2



Unicer - Novembro 2010

		Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	0500	Fenólico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Phenolic Especiarias - cravinho Herbal / Alho
	0501	Bromofenol	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Bromophenol Jato / Curto Giroto / TV
	0504	Clorofenol	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Chlorophenol Antisséptico / Hospital
	0611	Caprílico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Caprylic Queijo de cabra
	0613	Isovalérico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Isovaleric Lúpulo velho / Queijo Suor / Chulé
	0614	Butírico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Butyric Vômito de bebê
	0620	Diacetilo	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Diacetyl Manteiga rançosa
	0710	Sulfúrico	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Sulphuric Dióxido de enxofre Fósforos queimados
	0721	H <sub>2</sub> S	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	H <sub>2</sub> S Ovos podres / Sulfúrico
	0722	Mercaptano	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Mercaptan Esgoto / Lixo / Vegetais podres
	0724	Luz	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Lightstruck Daninha
	0732	DMS	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	DMS Milho cozido / Vegetais cozidos



Unicer - Novembro 2010

Pág 1 de 2



Unicer - Novembro 2010

		Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	0736	Cebola	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Onion Cebola cozida / Tipo alho
	0810	Gato	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Catty Urina gato
	0820	Papel	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Papery Cartão / Oxidado
	830	Couro	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Leathery Couro
	0841	Terra	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Earthy Terra húmida
	0842	Mofo	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Musty - tobores Cave húmida / Mofo
	0910	Acético	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Acetic Vinagre
	0920	Ácido	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Sour - Azre Adidez do limão
	930	Láctico	Tapar / agitar copo Longos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	
	1003	Baunilha	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Vanilla Leite creme Creme de nata / Gelado
	###	Indol	Tapar / agitar copo Longos 'Sniffs'	Indole Fralda de Bebê / Fezes

		Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	1100	Sal	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Salty Sal
	1310	Alcalino	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Alkaline Detergente alcalino / Cláustico
	1330	Metálico	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Metallic Ferro / Sangue

