



Universidade de Aveiro
Ano 2020

Departamento de química

Maria João Alves Rocha

**Otimização da utilização de matérias-primas
do processo de produção de cerveja**



Maria João Alves Rocha

**Otimização da utilização de matérias-primas
do processo de produção de cerveja**

Monografia apresentada à Universidade de Aveiro, no âmbito do mestrado em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica do Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e sob coorientação de Tiago Filipe Marujo e Moreira , Coordenador dos Serviços Técnicos, Super Bock Group S.A.

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o esforço e apoio ao longo do meu percurso académico.

o júri

presidente Prof. Ana Maria Rebelo Barreto Xavier

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. José Maria Marques Oliveira

professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade do Minho

agradecimentos

Quero começar por agradecer à Universidade de Aveiro e ao Super Bock Group, pela oportunidade de realizar o projeto de dissertação em ambiente empresarial. Foi sem dúvida um dos melhores momentos do meu percurso académico.

Agradeço à Professora Silvia Rocha pela disponibilidade, atenção e orientação científica deste projeto.

À Rita Antunes, ao Tiago Marujo e ao Pedro Rodrigues agradeço todo o carinho, atenção, apoio e orientação ao longo deste estágio.

A toda a equipa de produção (Adega e Fabrico), à Verónica Rodrigues e ao Serafim Sales, que tornaram todos os ensaios possíveis.

A toda a equipa da Qualidade, em especial ao laboratório central, pela prontidão e ajuda nas análises necessárias para esta dissertação.

À minha família, ao Leandro e aos meus amigos agradeço toda a compreensão e apoio, sem eles nada disto tinha sido possível.

palavras-chave cerveja, Sanette, malte, *dry-hopping*, *spent hops*

resumo

A presente dissertação foi realizada em ambiente empresarial no Super Bock Group e teve como objetivos principais a integração na empresa e a aprendizagem do processo produtivo, de forma a adquirir conhecimentos e ferramentas necessárias ao desenvolvimento do tema de trabalho proposto “Otimização da utilização de matérias-primas do processo de produção de cerveja”.

As matérias-primas utilizadas no fabrico de cerveja - malte, lúpulo, água e levedura - deverão permitir às indústrias cervejeiras a obtenção de um produto consistente e de qualidade. Assim, aquando a alteração ou introdução de matérias-primas, torna-se fundamental a avaliação da sua performance ao longo do processo cervejeiro, de forma a garantir a consistência e qualidade do produto final.

No âmbito do tema da tese a presente dissertação teve como principais objetivos:

1. A avaliação da integração de uma nova variedade de cevada, dística e de primavera, denominada Sanette, no *mix* de maltes utilizados pela empresa. Após os ensaios industriais o malte Sanette demonstrou resultados satisfatórios de rendimento em extrato ($\geq 100\%$), tempos médios de ocupação do filtro com duração habitual (106 minutos – Controlo; 103 minutos – Ensaio), performance da fermentação satisfatória, tempo de redução médio de diacetilo dentro dos valores normais (~200 horas), bem como a obtenção de um produto final com características organoléticas consistentes.
2. A alteração do malte tipo A pelo malte tipo B nas percentagens de ~ 25 e 50% no fabrico de cerveja X. Após a análise dos parâmetros físico-químicos do mosto frio e do produto acabado, para ambas as cubas com introdução de malte tipo B, notou-se uma diminuição dos valores de extrato e cor e um aumento dos valores pH, contudo, ainda dentro dos valores especificados. Sensorialmente a cuba com 50% malte tipo B foi diferenciada, o que significa que a cerveja produzida demonstra diferenças significativas - nível de significância 99% - do controlo (100% malte tipo A).

Ainda na cerveja X, procurou-se controlar os desvios físico-químicos do processo, com maior foco na atenuação real, através da modificação dos patamares do diagrama de brassagem. Esta alteração demonstrou ser eficiente, uma vez que as cubas ensaio apresentam 70% de atenuação real, comparativamente a 67% do controlo.

3. A reutilização dos resíduos de *dry-hopping*, os *spent hops* (SH), como fonte de compostos de amargor na ebulição de um mosto *standard*. Verificou-se uma percentagem de retenção de 60% dos α -ácidos nos *spent hops*, o que evidencia que o processo de *dry-hopping* é ineficiente na extração destes compostos, ficando eles retidos em concentrações consideráveis. Mediante a análise dos resultados de amargor do mosto frio, dos parâmetros físico—químicos e sensoriais do produto acabado, conclui-se que os *spent hops* podem ser reutilizados como fonte de compostos de amargor, permitindo diminuir os custos e o impacto ambiental destes resíduos.

As alterações introduzidas pela realização do presente trabalho relativamente às matérias-primas malte e lúpulo, demonstraram ser eficazes quer pela aprovação da utilização do malte Sanette na produção de Super Bock quer pela na produção da cerveja X com 25% de malte B. O trabalho permitiu melhorar a atenuação real final da cerveja X e ainda comprovar a possibilidade e potencialidade da reutilização dos *spent hops* como fonte de compostos de amargor, na obstante, verifica-se a necessidade de otimizar o processo atual de forma a melhorar os resultados alcançados.

Perante a conclusão do estágio curricular com todos os pontos de trabalho finalizados e com resultados satisfatórios, conclui-se que a integração, a aprendizagem do processo produtivo e o desenvolvimento do tema proposto foram bem-sucedidos.

keywords beer, Sanette, malt, dry-hopping, spent hops

abstract This dissertation was carried out in a industrial environment at the Super Bock Group and had as main objectives the integration in the company and the learning of the production process, in order to acquire the requirements and tools for the development of the proposed work theme “Optimization of the use of materials- of the beer production process”.

The raw materials used in the manufacture of beer - malt, hops, water and yeast - must allow the brewing industries to obtain a consistent and quality product. Thus, when changing or introducing raw materials, it is essential to evaluate their performance throughout the brewing process, in order to guarantee the consistency and quality of the final product.

Within this scope, the present work had as main objectives:

1. The evaluation of the integration of a two row, spring barley, called Sanette, in the mix of malts used by the company. After industrial trials, Sanette malt showed satisfactory results in extract yield ($\geq 100\%$), average filter occupation times within the normal duration (106 minutes - Control; 103 minutes - Test), satisfactory fermentation performance, reduction time diacetyl within normal values (~ 200 hours), as well as obtaining a final product with consistent organoleptic characteristics.

2. The alteration of type A malt by type B malt in the percentages of ~ 25 and 50% in the manufacture of beer X. After analyzing the physical-chemical parameters of the cold wort and the finished product, for both vat with the introduction of malt type B, there was a decrease in extract and color values and an increase in pH values, however, still within the specified values. Sensorially, the vat with 50% type B malt was differentiated, which means that the beer produced shows significant differences - 99% significance level - from the control (100% type A malt). Still in beer X, we sought to control the physical-chemical deviations of the process, with a greater focus on real attenuation, by modifying the levels of the brewing diagram. This change proved to be efficient, since the test tanks have 70% real attenuation, compared to 67% of the control.

3. The reuse of dry-hopping residues, spent hops (SH), as a source of bitterness compounds in the boiling of a standard wort. A 60% retention

percentage of α -acids was found in spent hops, which shows that the dry-hopping process is inefficient in the extraction of these compounds, which are retained in considerable concentrations. By analyzing the bitterness results of the cold wort, the physical chemical and sensory parameters of the finished product, it is concluded that spent hops can be reused as a source of bitterness compounds, allowing to reduce the costs and the environmental impact of these residues.

The changes introduced by this work in relation to the raw materials malt and hops, proved to be effective both for the approval of the use of Sanette malt in the production of Super Bock and for the production of beer X with 25% of malt B. The work allowed improve the final real attenuation of beer X and also prove the possibility and potential of reusing spent hops as a source of bitterness compounds, however, there is a need to optimize the current process in order to improve the results achieved.

In view of the conclusion of the curricular internship with all the work points completed and with satisfactory results, it is concluded that the integration, the learning of the productive process and the development of the proposed theme were successful.

Índice

1	ENQUADRAMENTO.....	1
1.1	A empresa - Super Bock Group	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1	Matérias-Primas	2
2.1.1	Cevada	2
2.1.2	Lúpulo.....	5
i.	Resinas.....	5
ii.	Óleos essenciais.....	7
iii.	Polifenóis	8
2.1.3	Água.....	9
2.1.4	Levedura	10
2.1.5	Adjuntos	12
3	PROCESSO CERVEJEIRO.....	13
3.1	Produção de malte – Maltagem.....	13
3.1.1	Molha	14
3.1.2	Germinação e Secagem	14
3.1.3	Formação de compostos de cor e sabor	16
3.1.4	Formação do precursor DMS, DMS livre e nitrosaminas	17
3.1.5	Tipos de malte	18
	Malte Base - <i>Pilsner</i>	18
	Maltes Especiais.....	18
3.1.6	Parâmetros de qualidade do malte	19
3.2	Produção de Mosto	21
	22
3.2.1	Moagem e Brassagem	22
	Processos de degradação enzimática	24
3.2.2	Acidificação do empaste.....	27
3.2.3	Filtração do mosto.....	27
3.2.4	Ebulição do mosto.....	28
3.2.5	Decantação – Clarificação do mosto	29
3.2.6	Arrefecimento e arejamento do mosto	30
3.3	Fermentação.....	31
3.3.1	Fermentação Primária	31

3.3.2	Fermentação Secundária.....	34
3.4	Dry-hopping (DH).....	34
3.5	Filtração da cerveja.....	36
4	OBJETIVOS DE TRABALHO	38
5	MÉTODOS ANALÍTICOS DE CONTROLO DE QUALIDADE	40
5.1	Controlo de qualidade do malte, griz de milho e cevada	40
5.1.1	Triagem do malte e da cevada (Método 3.11 da <i>Analytica – EBC⁶³</i>).....	41
5.1.2	Friabilidade (Método 4.15 da <i>Analytica - EBC⁶³</i>).....	41
5.1.3	Humidade (Método 4.2 do <i>Analytica – EBC⁶³</i>).....	42
5.1.4	Rendimento dos cereais maltados e não maltados (Método 4.5.1 da <i>Analytica-EBC⁶³</i>).....	43
	Cereais não maltados.....	44
	Empastagem	44
	Cereais maltados.....	44
	Empastagem	44
	Filtração	45
5.1.5	Matérias gordas do griz de milho (Método 6.10 da <i>Analytica- EBC⁶³</i>).....	46
5.2	Controlo de qualidade do processo e do produto acabado	46
5.2.1	Características físico-químicas	47
5.2.2	Cálcio e Zinco (Método 9.20 e 9.11 <i>Analytica-EBC⁶³</i>).....	48
5.2.3	Azoto Aminado Livre (FAN) (Método 8.10 e 9.10 da <i>Analytica-EBC⁶³</i>).....	49
5.2.4	DMS (Método 9.39 da <i>Analytica-EBC⁶³</i>).....	50
5.2.5	Amargor (Método 9.8 da <i>Analytica-EBC⁶³</i>).....	50
5.2.6	Dióxido de enxofre (SO ₂)	51
5.2.7	Diacetilo e Pentanodiona (Método 9.24.2 do <i>Analytica–EBC⁶³</i>)	52
5.2.8	Contagem de células de levedura	53
5.2.9	Turvação.....	54
5.2.10	Estabilidade da espuma (Método 9.42 do <i>Analytica EBC⁶³</i>)	55
5.2.11	Dióxido de Carbono	56
5.2.12	Análise Sensorial.....	56
	Controlo organolético (Método 13.13 do <i>Analytica EBC⁶³</i>)	56
	Estabilidade organolética (Método 13.10 do <i>Analytica EBC⁶³</i>).....	57
	Teste Triangular (Método 13.7 do <i>Analytica EBC⁶³</i>)	57
6	UTILIZAÇÃO DE UMA NOVA VARIEDADE DE CEVADA “SANETTE”	59
6.1.1	Descrição do ensaio industrial.....	60
6.1.2	Análise de qualidade dos cereais utilizados	62
	Malte ensaio e controlo.....	62

<i>Gritz</i> de Milho e Cevada.....	65
6.1.3 Controlo do processo de produção de cerveja	68
i. Parâmetros analisados durante a brassagem	68
ii. Parâmetros avaliados durante a ebulição do mosto.....	71
iii. Parâmetros físico-químicos do mosto frio	73
iv. Rendimento	76
v. Acompanhamento Fermentação.....	79
vi. Cerveja Filtrada	84
vii. Produto Acabado.....	84
6.1.4 Conclusão	87
7 ALTERAÇÃO DO TIPO DE MALTE E REFORMULAÇÃO DO DIAGRAMA DE BRASSAGEM NA CERVEJA X	89
7.1.1 Descrição ensaio industrial.....	90
Previsão da cor.....	91
7.1.2 Análise comparativa dos parâmetros de qualidade dos cereais utilizados.....	92
7.1.3 Controlo do processo de produção de cerveja	93
i. Produção de Mosto	93
ii. Acompanhamento Fermentação	95
iii. Produto Acabado	98
7.1.4 Conclusão e trabalho futuro.....	101
8 REAPROVEITAMENTO DOS <i>SPENT HOPS</i> COMO FONTE DE COMPOSTOS DE AMARGOR.....	102
8.1.1 Descrição do ensaio industrial.....	103
8.1.2 Avaliação da reutilização dos <i>spent hops</i> como fonte de compostos de amargor	105
8.1.3 Taxa de utilização	108
8.1.4 Impacto da reutilização na fermentação e nas características organolépticas do produto acabado	109
8.1.5 Conclusão e trabalho futuro.....	112
9 CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO.....	113
ANEXO A – TABELA DE NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA.....	115
ANEXO B – IMAGENS ENSAIO <i>SPENT HOPS</i>	116
10 BIBLIOGRAFIA.....	117

Lista de Figuras

Figura 1 – a) Cevada dística b) Cevada hexástica	3
Figura 2- Representação esquemática da semente de cevada (A) e da células do endosperma (B).	3
Figura 3- Cadeia de amilose (A) e de amilopectina (B)	4
Figura 4- Estrutura da flor do lúpulo	5
Figura 5- A) Estrutura Química Ácido- α B) Estrutura Química Ácido- β	6
Figura 6 – Reação de Isomerização dos α -ácidos	6
Figura 7- Classificação dos óleos essenciais	7
Figura 8 – Compostos oxigenados linalol e geraniol	8
Figura 9- Esquema do processo de floculação	12
Figura 10 - Visão geral do processo cervejeiro.....	13
Figura 11- Modificação do grão de cevada	14
Figura 12 – Reações de Maillard	17
Figura 13 – Reação da conversão do precursor SMM em DMS, por ação de calor	17
Figura 14- (A) Malte Pilsner (B) Malte Chocolate (C) Malte Caramelo	19
Figura 15- Diferentes passos da produção de mosto.....	22
Figura 16 – Método dupla brassagem. A linha a tracejado representa a transferência do empaste. (A) Mistura dos adjuntos das caldeiras das caldas com o malte na caldeira de empastagem (B) Mistura finalizada e enviada para o filtro	24
Figura 17- Degradação do amido pelas enzimas amiolíticas.....	25
Figura 18 - Imagem esquemática do filtro prensa cheio com mosto. Adaptado de ⁴⁴ ..	28
Figura 19 - Visão global da fermentação alcoólica e formação de subprodutos da fermentação	31
Figura 20- Formação e conversão do diacetilo.	33
Figura 21 – Esquema reutilização dos <i>spent hops</i> no início de ebulição.	39
Figura 22 – Friabilómetro presente no laboratório central nas instalações do Super Bock Group.....	42
Figura 23 - Empastagem dos cereais (em cima) e Filtração (em baixo).....	44
Figura 24 - Alkolyzer Plus Beer Analysis System da Anton Paar, presente no laboratório central nas instalações do Super Bock Group.	47
Figura 25 - Equipamento de cromatografia gasosa, presente no laboratório central das instalações do Super Bock Group.....	52

Figura 26- Cromatograma tipo com picos de diacetilo e pentanodiona, obtido através de cromatografia gasosa.	53
Figura 27 - Equipamento utilizado para contagem de células de levedura, presente no laboratório central das instalações do Super Bock Group.	54
Figura 28- Equipamento utilizado para a leitura da turvação presente no laboratório central das instalações do Super Bock Group.	55
Figura 29 - Aparelho utilizado para a medição da estabilidade de espuma segundo o método NIBEM, presente no laboratório central das instalações do Super Bock Group.	56
Figura 30 – Avaliação dos diversos parâmetros de qualidade, na utilização do novo malte, ao longo do processo cervejeiro.	60
Figura 31 – Descrição esquemática do ensaio industrial.	61
Figura 32 – Esquema de utilização de lotes nos diferentes pares de cubas.	66
Figura 33 – Esquema dos parâmetros controlados ao longo do processo de fabrico de mosto para o máximo rendimento em extrato.	68
Figura 34 - Acompanhamento fermentativo através da redução do extrato aparente ($^{\circ}P$), produção de álcool $\%(v/v)$ e contagem do número de células em suspensão (milhões/mL).	81
Figura 35 – Evolução do pH ao longo da fermentação primária.	82
Figura 36 – Gráfico de redução do diacetilo (mg/L).	83
Figura 37 – Descrição esquemática do ensaio industrial (C) – controlo, (n ^o 1) cuba n ^o 1 e (n ^o 2) cuba n ^o 2.	90
Figura 38 – Evolução da redução do extrato aparente ($^{\circ}P$), produção de álcool $\%(v/v)$ e atenuação.	96
Figura 39 – Evolução da cor e pH ao longo da fermentação primária.	97
Figura 40 – Descrição esquemática do ensaio industrial.	104
Figura 41 – Perfil da fermentação primária.	109
Figura 42 - Contentor de recolha dos spent hops.	116

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Enzimas amilolíticas, local de ação enzimática, temperatura e pH ótimos ¹ .	26
Tabela 2 - Métodos analíticos utilizados em cada capítulo.	40
Tabela 3 - Certificado de análise do fornecedor, lote 100% malte Sanette, malte controlo 1,2 e 3.	64
Tabela 4- Resultados da análise interna dos parâmetros físico-químicos dos lotes de maltes utilizados.	65
Tabela 5 – Resultados da análise interna aos lotes de cevada e <i>gritz</i> de milho utilizados nos três pares de cubas.	67
Tabela 6 – Valores de pH da empastagem do malte, do <i>gritz</i> de milho e tempo de ocupação do filtro em minutos, com respetiva média e desvio padrão (σ).	70
Tabela 7 – Valores de pH do início e fim de ebulição, com respetiva média e desvio padrão (σ).	72
Tabela 8- Resultados da análise dos parâmetros físico-químicos do mosto frio, atenuação real limite (ARL) e extrato aparente limite de todas as cubas com respetiva média e desvio padrão (σ).	73
Tabela 9 -Resultados DMS, cálcio, zinco e azoto aminado livre (FAN) no mosto frio, com respetiva média e desvio padrão (σ).	76
Tabela 10- Percentagem do rendimento de todas as cubas ensaio e controlo e respetiva média e desvio padrão (σ).	78
Tabela 11 – Resultados da análise de viabilidade e do estado microbiológico das leveduras utilizadas.	79
Tabela 12 – Resultados da análise das características físico-químicas do produto final.	85
Tabela 13 - Resultados da análise sensorial ao produto acabado.	86
Tabela 14 -Cálculo de <i>MCU</i> (unidades de cor do malte) e conversão em cor final da cerveja (EBC) para a cuba nº 1 e cuba nº 2 e controlo.	92
Tabela 15 –Resultados do certificado do fornecedor dos parâmetros físico-químicos do malte tipo A e B utilizados no controlo, cuba nº1 e cuba nº2.	93
Tabela 16 - Valores de pH da empastagem do malte, início e fim de ebulição, e tempo de ocupação do filtro em minutos e desvio padrão (σ) entre controlo e as respetivas cubas.	94

Tabela 17 – Resultados da análise dos parâmetros físico-químicos do mosto frio e desvio padrão (σ) entre controlo e as respetivas cubas.....	94
Tabela 18 - Resultados da análise das características físico-químicas do produto final.	99
Tabela 19 - Resultados da análise sensorial ao produto acabado.	100
Tabela 20 – Comparação da % de humidade e da concentração % (p/p) de ácidos- α e β nos pellets de lúpulo adicionados no DH com os <i>spent hops</i> resultantes desses pellets.	105
Tabela 21 – Quantidade de SH em kg, mediante a quantidade adicionada (L) e a % de humidade com a respetiva quantidade de α -ácidos adicionados (g).	105
Tabela 22- Resultados da análise dos parâmetros físico-químicos do mosto frio.....	107
Tabela 23- Taxa de utilização do extrato de resina não isomerizado, do extrato de resina em conjunto com os <i>spent hops</i> e da taxa de utilização individual <i>spent hops</i> e extrato de resina do 1º ensaio.	109
Tabela 24 – Percentagem de perda de amargor para o ensaio preliminar, 1º ensaio e controlo.	110
Tabela 25 - Resultados da análise sensorial ao produto acabado.	111

Lista de Abreviaturas

Sigla da abreviatura	Português	Inglês
°P	Graus Plato	Degrees Plato
ATP	Adenosina trifosfato	Adenosine triphosphate
DH	-	Dry-hopping
DMS	Dimetilsulfureto	Dimethyl sulfide
DMSO	Dimetilsulfóxido	Dimethyl sulfoxide
EBC	Convenção Europeia da Produção de Cerveja	European Brewery Convention
FAN	Azoto aminado livre	Free amino nitrogen
HGB	Produção de mosto de extrato elevado	High gravity brewing
KG	Terra diatomácea	Kieselguhr
<i>MCU</i>	Unidades de cor de malte	Malt color units
PVPP	Polivinilpolipirrolidona	Polyvinylpolypyrrolidone
S.M. S	Sobre a matéria seca	-
S.M.T. Q	Sobre a matéria tal e qual	-
SH	-	Spent Hops
SMM	S-metilmetionina	S-methylmethionine
<i>UA</i>	Unidades de amargor	-

1 Enquadramento

1.1 A empresa - Super Bock Group

A génese do Super Bock Group remonta a 7 de março de 1890 com a constituição da CUIFP-Companhia União Fabril Portuense das Fábricas de Cerveja e Bebidas Refrigerantes. Esta união fabril, entre seis fábricas da zona do Porto e uma da Ponte da Barca, teve como principal objetivo reunir capacidades financeiras e técnicas de forma a desenvolver este setor de atividade em Portugal ¹.

Desde a sua fundação até à atualidade, a Super Bock Group tem vindo a sofrer diversas alterações nas suas fábricas e marcas, tendo a década de 60 do século passado, ficado marcada pela mudança de instalações para a Via Norte em Leça do Balio. Na sequência do 25 de Abril deu-se a nacionalização do setor cervejeiro e a transformação da CUIFP em Unicer - União Cervejeira E.P. Durante os anos 80 a Unicer E.P. passa a chamar-se Unicer S.A. fruto da privatização da empresa. Em 1992 lança a marca dinamarquesa Carlsberg, em Portugal.

Com o início do século XXI e com a aquisição do grupo Vidago, Melgaço e Pedras Salgadas (VMPS) e a Caféeira a empresa passa a designar-se Unicer, Bebidas de Portugal S.A. Ao longo da primeira década deste século, foram lançadas a Super Bock Stout, Green, Mini e Abadia aumentando assim a gama de produtos da marca. Em 2011 lança em Portugal a marca de sidra Somersby e em 2016 a Super Bock Seleção 1927 com uma gama de quatro cervejas de carácter permanente no mercado ¹.

Em 2017 a empresa passa a Super Bock Group e é atualmente a maior empresa portuguesa de bebidas, cuja principal atividade é a produção de cerveja e de águas engarrafadas. Contudo também está presente nos setores dos refrigerantes, dos vinhos, do malte e do turismo com a detenção dos Parques Lúdico-Termas de Vidago e Pedras Salgadas. Apresenta um capital maioritariamente português em que 56% pertencem ao grupo VIACER e os restantes 44% ao grupo Carlsberg ¹.

2 Revisão Bibliográfica

A presente revisão bibliográfica sistematiza todas as temáticas relacionadas com a produção de cerveja, permitindo ter uma visão mais abrangente e profunda sobre as matérias-primas e o processo cervejeiro.

2.1 Matérias-Primas

Para a produção de cerveja são necessárias quatro matérias-primas essenciais: cevada, lúpulo, água e levedura. A qualidade das matérias-primas selecionadas é de grande importância para garantir a qualidade e as características do produto final ².

A cevada é a principal matéria-prima, uma vez que é a fonte de amido para a produção de cerveja. Antes de ser utilizada no processo cervejeiro têm de ser convertida em malte. O lúpulo é o ingrediente responsável pelo sabor amargo e aroma da cerveja. A água é a matéria-prima gasta em maior quantidade, sendo essencial em vários passos do processo. Por fim, e para que ocorra fermentação alcoólica, onde os açúcares são convertidos em etanol e CO₂, é necessário a intervenção da levedura.

2.1.1 Cevada

As partes da planta da cevada (*Hordeum vulgare*), com interesse para o processo cervejeiro são sementes, usualmente denominadas por grãos ^{3,4}. A cevada pode ser plantada no outono - cevada de inverno - ou plantada durante a primavera – cevada de primavera ⁵. As variedades de primavera apresentam melhor qualidade para o processo de maltagem. As cevadas de inverno como têm um tempo de crescimento mais longo, apresentam colheitas mais produtivas, contudo características menos favoráveis para o processo de maltagem. No entanto, ao longo dos últimos anos tem-se verificado melhorias significativas desta variedade, com conseqüente aumento da sua utilização no fabrico de cerveja.

Ainda diferem entre si na forma como os grãos se distribuem na espiga: cevada dística (duas fileiras de grãos) ou cevada hexástica (seis fileiras de grãos) (**Fig.1**). Os grãos de cevada dística são maiores, mais uniformes e apresentam a casca mais fina, o que permite extrair de forma mais eficiente o seu conteúdo ³. Desta forma, as variedades de primavera e com duas fileiras de grãos são as mais utilizadas na maltagem.



Figura 1 – a) Cevada dística b) Cevada hexástica. Adaptado de ⁶

A semente de cevada (**Fig.2 - A**) é formada pelo embrião, pelo endosperma e pelas camadas protetoras – casca, pericarpo e testa. O endosperma está envolvido na camada de aleurona que é rica em proteínas – de grande importância para a produção de enzimas durante a maltagem – e é constituído por células onde se encontram armazenados os grânulos de amido. Os grânulos de amido podem ser do tipo A - maior tamanho e menor temperatura de gelatinização (61-62 °C) – constituindo 10% dos grânulos ou do tipo B – menor tamanho e maior temperatura de gelatinização (75-80 °C) sendo os 90 % restantes dos grânulos (**Fig.2 - B**). A quantidade de grânulos pequenos influencia a qualidade do malte e é dependente da variedade de cevada.

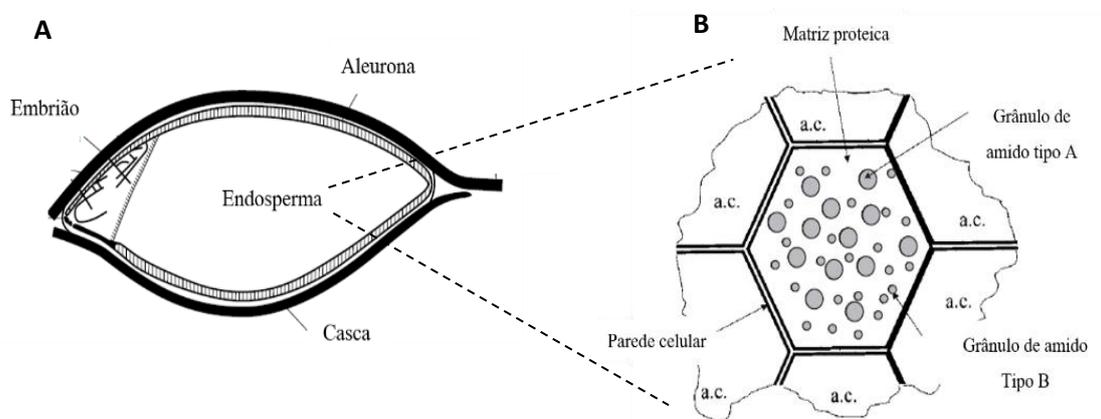


Figura 2- Representação esquemática da semente de cevada (A) e da células do endosperma (B). Adaptado de ⁷

Segundo Baik e Ullrich ⁸ a constituição, aproximada, do grão de cevada é de 65-68 % de amido, 8-17 % proteína, 3,6-9 % β -glucanas, 2-3 % de lípidos e 1,5-3 % de minerais. Os polímeros de glucose - amilose, amilopectina e β -glucanas – em conjunto representam a maior parcela de carbono incorporado no grão de cevada ⁹. As α -glucanas, amilose e amilopectina, são os principais componentes dos grânulos de amido, encontrando-se em percentagens de, aproximadamente, 20 % e 80 %, respetivamente

^{2,9}. Estes polímeros (**Fig.3**) são formados por resíduos de glucose e apresentam diferenças entre si ao nível da sua organização estrutural e do seu peso molecular. A amilose é um polímero linear, em que os resíduos de glucose (~2000) estão ligados entre si, por ligações glicosídicas em α (1-4) ². A amilopectina apresenta esta mesma configuração de resíduos de glucose (~40 000) ligados em α (1-4), mas com ramificações em α (1-6) a, aproximadamente, cada 24-30 resíduos de glucose ^{2,10}. A amilopectina é menos solúvel, comparativamente à amilose.

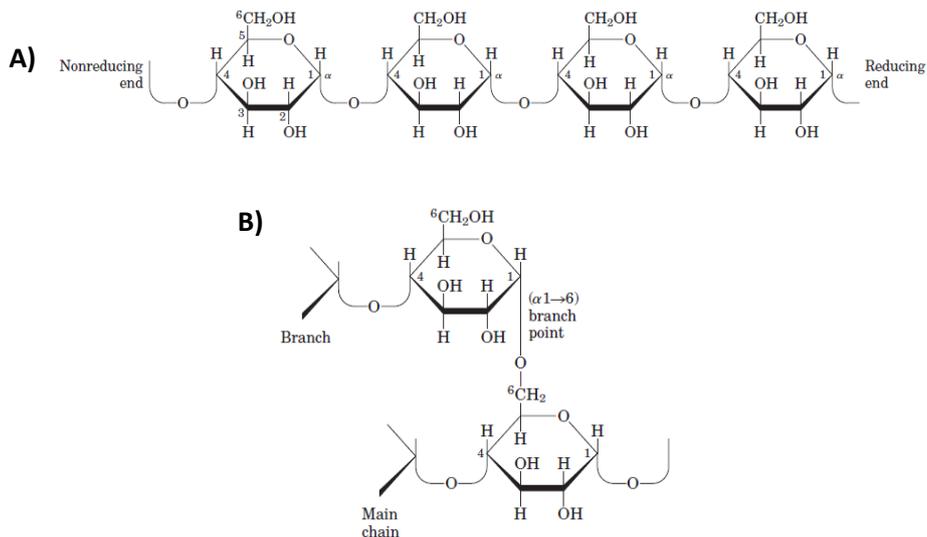


Figura 3- Cadeia de amilose (A) e de amilopectina (B) Adaptado de ¹⁰

As paredes celulares do endosperma são maioritariamente constituídas por hemicelulose – β -glucanas e pentosanos - composição que corresponde a requisitos funcionais, e não de suporte, para uma fácil despolimerização dos substratos de amido e proteína, pelas enzimas hidrolíticas na camada de aleurona⁹. As β -glucanas em solução associam-se entre si por pontes de hidrogénio formando micelas. A sua degradação é de maior importância para o processo de maltagem, uma vez que podem causar problemas de turvação e filtração durante o processo.

Do teor proteico da cevada apenas um terço acaba na cerveja finalizada². As proteínas do grão, sendo as hordeínas as mais abundantes (40% a 50%), têm um papel importante na formação e na estabilidade da espuma da cerveja assim como na produção de aminoácidos e péptidos¹¹. Os aminoácidos são essenciais ao metabolismo da levedura, por conseguinte, a cevada selecionada tem de garantir níveis de azoto assimilável – FAN (azoto aminado livre) - em quantidades suficientes ².

Os polifenóis identificados no grão de cevada incluem: antocianidinas, flavonóis, ácidos fenólicos, catequinas e proantocianidinas¹¹. Cerca de 80% dos compostos fenólicos presentes na cerveja, derivam do malte de cevada e são amplamente reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes ¹¹. Por outro lado, ao interagirem com as proteínas do mosto podem causar problemas de turvação.

A fração lipídica está presente em menor quantidade nas sementes, contudo é essencial para a estrutura celular das leveduras. Durante o processo pode ocorrer a sua oxidação conferindo rancidez à cerveja.

O conteúdo mineral da cevada inclui principalmente, fosfatos (35%), silicatos (25%) e sais de potássio (20%). Os fosfatos são essenciais para o bom funcionamento do metabolismo da levedura, não ocorrendo a fermentação alcoólica na sua ausência ².

2.1.2 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta pertencente à família da *Cannabaceae*, e é a fonte primária de compostos de amargor para o fabrico de cerveja.

No processo cervejeiro apenas as inflorescências femininas (cones) (**Fig.4**) têm interesse, uma vez que são ricas em resinas e em óleos essenciais, responsáveis pelo amargor e aroma típico a cerveja, respetivamente.

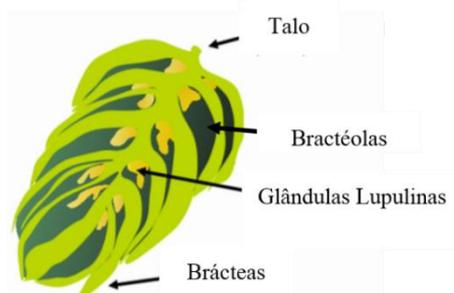


Figura 4- Estrutura da flor do lúpulo. Adaptado de ¹²

i. Resinas

O amargor é o atributo derivado do lúpulo, com grande impacto no produto final. As substâncias responsáveis por este atributo estão presentes nas resinas, que podem ser caracterizadas consoante a sua extração em diferentes solventes: *soft resins* são solúveis em hexano e as *hard resins* insolúveis em hexano ². Do ponto de vista do processo cervejeiro, as *soft resins* são consideradas mais relevantes, uma vez que

contêm os precursores do sabor amargo da cerveja, designados de α -ácidos e ácidos- β (Fig.5).

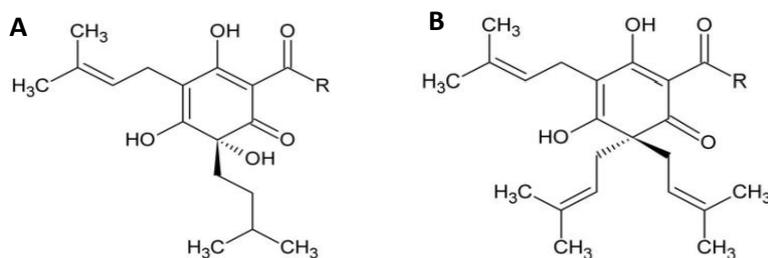


Figura 5- A) Estrutura Química Ácido- α B) Estrutura Química Ácido- β . Adaptado de ¹³

Os ácidos- β (Fig.5 – B) apresentam na sua estrutura, uma cadeia extra no carbono 6 o que os torna muito pouco solúveis em água¹⁴. Por este motivo, são perdidos durante a ebulição do mosto, não apresentando contributo para o amargor da cerveja¹⁵. O amargor da cerveja, advém principalmente da isomerização dos α -ácidos. Os principais α -ácidos são: a humulona (35-70%), a cohumulona (20-55%) e adhumolona (10-15%)¹³. A baixa solubilidade destes ácidos no mosto (aproximadamente 60 mg/L a 100 °C e a pH 5), limita a sua extração, o que se reflete numa menor conversão em iso- α -ácidos¹⁶. Durante a ebulição do mosto são termicamente convertidos nos iso- α -ácidos (Fig.6) correspondentes, através de uma reação de isomerização – compostos mantêm a sua fórmula molecular, ocorrendo apenas alteração na fórmula estrutural^{2,17}. Os iso- α -ácidos formados apresentam maior amargor e solubilidade, comparativamente aos α -ácidos, podendo ser encontrados na cerveja finalizada em concentrações entre os 15 a 80 mg/L¹⁸.

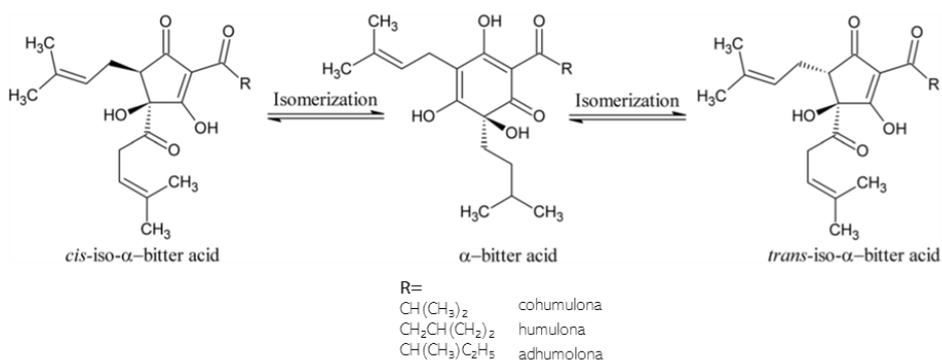


Figura 6 – Reação de Isomerização dos α -ácidos. Adaptado de ¹³

Durante o processo ocorre a oxidação dos α -ácidos e β originando humulonas e huluponas, respetivamente. Estudos recentes demonstram que as humulonas e as huluponas são mais amargas que as iso-humulonas ¹⁹.

Em geral, no processo cervejeiro e após a ebulição do mosto, utilizando *pellets* ou extrato de lúpulo não isomerizado, apenas 50% dos ácidos disponíveis ficam em solução. Com perdas posteriores no *trub* (proteínas e polifenóis complexados) e na superfície da levedura a utilização total destes ácidos raramente excede os 40% ¹⁶.

ii. Óleos essenciais

Os óleos essenciais (**Fig.7**) responsáveis pelo aroma característico a lúpulo, incluem os hidrocarbonetos (50-80%), os compostos oxigenados (20-50%) e os compostos de enxofre (< 1%) ²⁰.

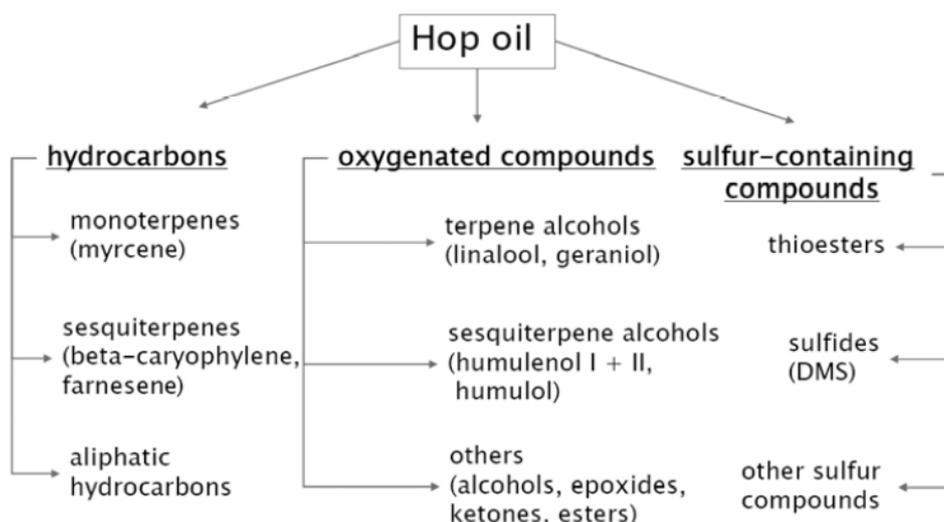


Figura 7- Classificação dos óleos essenciais. Adaptado de ²¹

Os hidrocarbonetos pertencem maioritariamente à classe de compostos designados por terpenos ²². Estes compostos são voláteis, não polares e apenas são perceptíveis na cerveja acabada, quando adicionados numa fase tardia da ebulição ou após a fermentação ²⁰.

No lúpulo fresco, o composto maioritário é o monoterpeno mirceno ²³. Os sesquiterpenos (humuleno e cariofileno) surgem numa fase posterior, durante o envelhecimento do cone ²². Durante este envelhecimento vão se formando os terpenos oxigenados - terpenóides - tendo maior relevância para o processo cervejeiro o linalol e o geraniol (**Fig.8**). Os compostos oxigenados apresentam um aroma mais intenso e

maior solubilidade, dissolvendo-se mais facilmente no mosto, motivo pelo qual se encontram em maior quantidade no produto final ²⁰. Os compostos de enxofre, são uma pequena porção dos óleos essenciais, contudo possuem baixos limiares de detecção, podendo influenciar positiva ou negativamente o aroma da cerveja ²⁰.

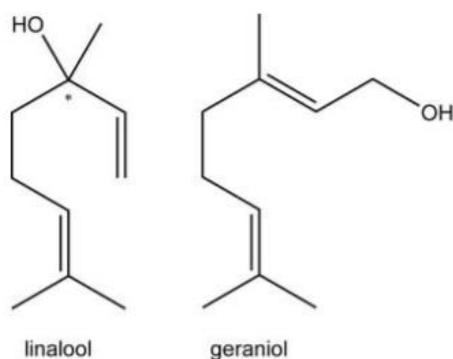


Figura 8 – Compostos oxigenados linalol e geraniol. Adaptado de ²⁴.

iii. Polifenóis

Entre 20 e 30% dos polifenóis encontrados no mosto provêm do lúpulo. Estes podem ser de baixo peso molecular (ácido gálico, ácido p-cumárico e ácido cafeico) ou de elevado peso molecular, com maior relevância para as proantocianidinas/taninos condensados que são flavonoides oligoméricos ^{24,25}. Os primeiros são antioxidantes naturais e evitam a formação de compostos derivados de reações de oxidação-redução, contribuindo positivamente para a estabilidade do sabor. Por sua vez, as proantocianidinas reagem com as proteínas do mosto quer durante a ebulição, levando à sua precipitação como *hot break (trub)*, quer durante o arrefecimento formando o *chill break*, promovendo problemas de turvação ^{26,5}. As proantocianidinas são precursores das antocianidinas, sendo que estas últimas apresentam coloração castanha podendo fornecer uma ligeira cor à cerveja.

O conteúdo em polifenóis do lúpulo é tipicamente suficiente para apresentar impactos significativos na estabilidade física da cerveja e por vezes no sabor, contribuindo para a adstringência, amargor e corpo da cerveja ²⁷. Estes são encontrados maioritariamente na parte exterior que rodeia as glândulas lupulinas, o que faz com que lúpulos de baixo teor de α -ácidos (aromáticos) possuam mais polifenóis. A utilização de pellets reduz a quantidade destes compostos, sendo que a eliminação total pode ser obtida com a utilização de extratos de resina.

2.1.3 Água

A grande maioria das cervejas é composta por 90 a 95% de água. A composição química e biológica da água utilizada tem um grande impacto na qualidade do produto final. A água utilizada tem de corresponder a requisitos legais (potável) e ainda a critérios adicionais de qualidade: uma vez que os iões presentes na água influenciam o pH da empastagem, do mosto e finalmente da cerveja, interferindo com as reações enzimáticas e não enzimáticas do processo ⁵.

A composição iónica da água utilizada para a preparação do mosto, tem uma influência crucial na qualidade da cerveja produzida. Para este processo é importante a dureza da água, que diz respeito às propriedades dos iões cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) dissolvidos, e a alcalinidade que é o resultado do ião bicarbonato do bicarbonato de cálcio^{2,5,28}. O bicarbonato ao reagir com os iões de hidrogénio (H^+), provenientes do malte, produz ácido carbónico (CO_2 dissolvido). Devido às temperaturas utilizadas durante a brassagem ocorre a sua volatilização, e, portanto, ocorre um gasto dos iões de hidrogénio na reação descrita anteriormente, o que se traduz no aumento dos valores de pH. A alcalinidade do mosto afeta a cor da cerveja, em virtude de uma maior solubilidade dos compostos fenólicos. Uma maior solubilização destes compostos, têm igualmente, efeitos no sabor - adstringência. A ação das enzimas também é afetada - α -amílase fica mais estável, contudo a atividade da β -amílase e das proteases é menor – refletindo-se num menor rendimento do extrato obtido ²⁸. A coagulação das proteínas ocorre, preferencialmente a pHs mais baixos, desta forma a utilização de água alcalina poderá causar problemas ao nível da filtração. Outro efeito é a isomerização dos α -ácidos, que ocorre em maior extensão em ambientes alcalinos, podendo aumentar o amargo da cerveja em demasia.

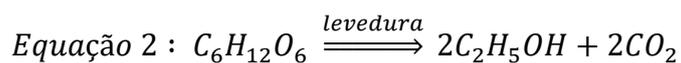
Os iões de cálcio são importantes para a estabilização da α – amílase, durante a brassagem, e para a interação com os fosfatos (**Equação 1**), proteínas e polipéptidos em reações onde há a produção de iões de hidrogénio, contribuindo para a diminuição dos valores de pH ^{28, 29}.



A diminuição do pH causada pelos íons de cálcio, torna a sacarificação mais eficiente e favorece a proteólise, aumentando assim os níveis de FAN. O cálcio contribui de forma positiva para a formação do *trub* e para a floculação da levedura, após o processo fermentativo ⁵. O oxalato de cálcio (CaC₂O₄) deposita-se durante a fermentação, sendo que níveis adequados de íons de cálcio asseguram uma deposição quase completa. A formação de cristais de oxalato de cálcio, na cerveja embalada, pode causar problemas de *gushing* - saída abundante de espuma após a abertura de uma garrafa.

2.1.4 Levedura

A função primária da levedura, durante a fermentação, é a conversão dos açúcares do malte em etanol e CO₂ (**Equação 2**). São também produzidos diversos compostos, com influência positiva no sabor e aroma da cerveja, como álcoois superiores e ésteres.



A estirpe de levedura a ser utilizada, irá depender do tipo de cerveja pretendido: cervejas lager, produzidas por leveduras de baixa fermentação e cervejas ale produzidas por leveduras de fermentação alta ^{30,31}. As leveduras utilizadas para cada tipo de cerveja são tradicionalmente referidas como *S.pastorianus* e *S.cerevisiae*, respetivamente. A fermentação das cervejas *lager* ocorre a temperaturas entre os 6-15 °C e têm uma duração de 2 a 7 dias. Estas leveduras tendem a flocular e a sedimentar no fundo da cuba de fermentação, de onde podem ser recolhidas e reutilizadas em fermentações subsequentes. As cervejas *ale* são produzidas com temperaturas de incubação entre os 18-27 °C, durante 5 a 7 dias ^{30,31}. As leveduras de fermentação alta tende a formar agregados celulares que são transportados para o topo da cuba pelas bolhas de CO₂ ³¹. Podem também ser recolhidas e reutilizadas posteriormente.

O mosto é uma fonte rica de nutrientes para a levedura contendo: açúcares fermentescíveis, azoto assimilável, minerais, vitaminas e fatores de crescimento ¹⁵. Atualmente é possível obter mostos com os nutrientes essenciais em quantidades elevadas, com exceção do zinco (grande parte é perdida durante a filtração do mosto). Situações de défice de nutrientes, podem ocorrer no fabrico de HGB (*High Gravity*

Brewing), devido à utilização de elevadas quantidades de cereais não maltados ou açúcar ¹⁵. Neste caso, o problema pode ser ultrapassado com a utilização de suplementos comerciais para a levedura.

Os açúcares presentes no mosto são maioritariamente: glucose, maltose, maltotriose e dextrinas. A glucose entra para a célula por difusão facilitada, com o auxílio de transportadores celulares. Logo após, ocorre a assimilação da maltose, que é o açúcar mais abundante no mosto, e por fim da maltotriose. As leveduras cervejeiras não conseguem utilizar as dextrinas do mosto, contudo, contribuem para o corpo da cerveja ²⁹. A glucose é o substrato preferencial da levedura, e quando presente no meio, reprime os transportadores celulares dos restantes açúcares – repressão catabólica da glucose.

No mosto, as principais fontes de azoto para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos azotados, são os aminoácidos, iões amónio e alguns di- e tripéptidos ^{5,32}. A maioria do FAN, que é a soma dos aminoácidos individuais, iões amónio e péptidos pequenos, é utilizado para a síntese proteica (estrutural e enzimática) sendo vitais para o crescimento e viabilidade da levedura ^{30,32}.

No processo cervejeiro, o oxigénio dissolvido é essencial para o crescimento e desenvolvimento ótimo da levedura. Além da maioria das vias respiratórias estarem bloqueadas devido ao efeito *Crabtree* (em quantidades elevadas de glucose, e na presença de oxigénio, a levedura desvia o seu metabolismo para fermentação) a levedura necessita de oxigénio na fase inicial da fermentação, para a biossíntese de ergosterol e de ácidos gordos insaturados ^{32,15}. Estes são incorporados na membrana plasmática das células em crescimento. Leveduras que crescem em limitação de oxigénio, tendem a possuir membranas com capacidade reduzida de transporte e de resistência face ao stress osmótico e a elevados níveis de etanol exterior, como em mostos HGB ³².

No que respeita aos minerais necessários ao correto desempenho da levedura na fermentação, podemos enumerar o potássio, magnésio, zinco e cálcio. O cálcio é fundamental para uma correta floculação da levedura – processo reversível e dependente de cálcio onde as células aderem umas às outras formando flóculos. A floculação envolve proteínas do tipo lectinas, denominadas por floculinas, que aderem às paredes celulares das células floculantes através de ligações seletivas aos resíduos de

manose das células adjacentes (**Fig.9**). O cálcio no meio é necessário para ativar as floculinas ³³.

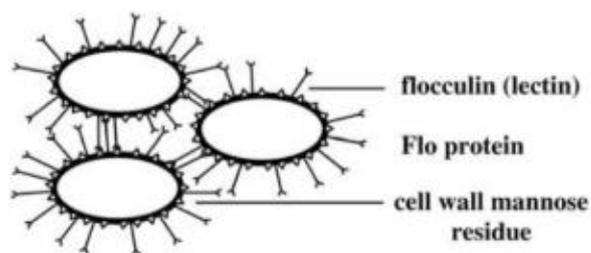


Figura 9- Esquema do processo de floculação. Adaptado de ³³

2.1.5 Adjuntos

Em determinados tipos de cervejas, são utilizados cereais não maltados – trigo, arroz, milho e cevada – como adjuntos ^{34,35}. Estes adjuntos são utilizados para aumentar o rendimento do extrato, sem a adição de proteínas ou taninos, e para reduzir a cor da cerveja com um menor custo económico para o processo associado ⁴. Para além destes benefícios, o uso de adjuntos pode ter consequências negativas, como a diluição das proteínas do mosto, reduzindo o FAN para níveis incompatíveis com a crescimento e função da levedura ³⁶. O uso destes cereais não maltados – baixo poder enzimático – só é possível em maltes com capacidade enzimática suficiente para hidrolisar o amido adicional (p.e. Malte Pilsener) ^{2,4}. A adição de enzimas comerciais pode ser uma opção aquando a utilização de uma elevada proporção de adjuntos ³⁷. A viscosidade do mosto pode ser mais elevada devido à elevada presença de β -glucanas.

O tipo de adjunto, é classificado consoante a temperatura de gelatinização do amido – processo em que a água penetra nos grânulos de amido modificando a sua estrutura. Se a gelatinização ocorrer a uma temperatura, em que as enzimas do malte continuam ativas (ex. farinha de trigo, cevada) o adjunto não precisa de ser pré-aquecido. No entanto, se o amido tiver uma temperatura de gelatinização elevada, como é o caso do milho, deverá ser aquecido numa caldeira à parte para garantir a gelatinização, sendo posteriormente adicionado ao malte ⁸. No caso do milho procede-se à remoção da gordura para evitar a sua introdução no processo cervejeiro.

Os adjuntos podem ser também adicionados à caldeira de ebulição, como é o caso do açúcar (sacarose) e dos xaropes de glucose.

3 Processo cervejeiro

O processo cervejeiro (Fig.10) envolve a extração e a hidrólise dos hidratos de carbono presentes no malte, com o objetivo de criar uma solução rica em açúcares, denominada de mosto, que contém os nutrientes essenciais ao crescimento da levedura. A levedura utiliza estes nutrientes no seu metabolismo fermentativo, formando etanol (C_2H_5OH) e dióxido de carbono (CO_2).

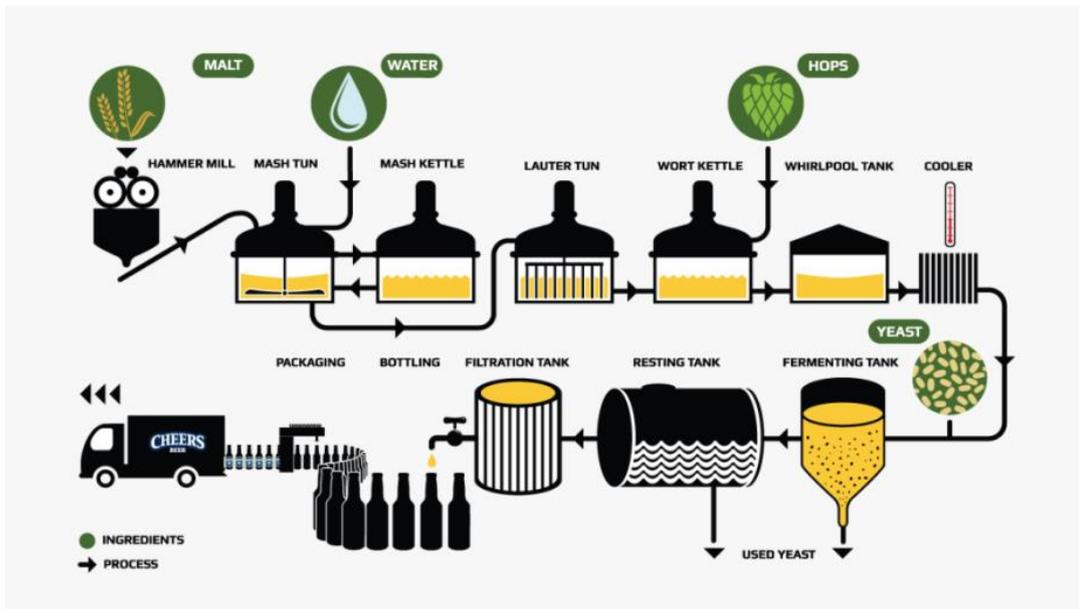


Figura 10 - Visão geral do processo cervejeiro. Adaptado de ³⁸.

3.1 Produção de malte – Maltagem

Para a produção de malte - fonte de açúcares fermentescíveis e de poder enzimático - a partir da semente de cevada procede-se à maltagem. A cevada necessita de ser maltada, uma vez que as leveduras não possuem enzimas amilolíticas.

Este processo é essencial para:

- Induzir a degradação enzimática das paredes celulares do endosperma (modificação do endosperma) causando a libertação dos grânulos de amido;
- Produção de enzimas responsáveis pela conversão do amido em açúcares fermentescíveis e para a hidrólise de proteínas em aminoácidos e péptidos;
- Desenvolvimento de compostos de cor, sabor e aroma através de reações de Maillard.

A maltagem pode ser dividida em três passos : (1) molha, onde o grão é imerso em água para hidratar o embrião e o endosperma; (2) germinação, passo em que as enzimas são sintetizadas, ativadas e mobilizadas e o embrião inicia o seu desenvolvimento; (3) secagem, onde a utilização de calor interrompe a germinação e reduz o teor de humidade garantindo a estabilidade do produto ³⁹.

3.1.1 Molha

A primeira etapa da maltagem, têm como principal objetivo aumentar a humidade dos grãos de 12 para 42-47%, para o início da germinação. Esta etapa contribui, de igual forma, para a lavagem dos grãos. O processo de molha consiste entre duas a quatro imersões dos grãos em água a temperatura controlada, sendo cada imersão seguida por um período de repouso ao ar, garantindo a correta oxigenação e distribuição da água pelo endosperma ³⁹.

A água flui em primeiro lugar para o embrião, estimulando a sua atividade respiratória através da utilização do oxigénio dissolvido na água, com conseqüente produção de hormonas – giberelinas - que se difundem para a camada de aleurona induzindo a produção de enzimas hidrolíticas (**Fig.11**).

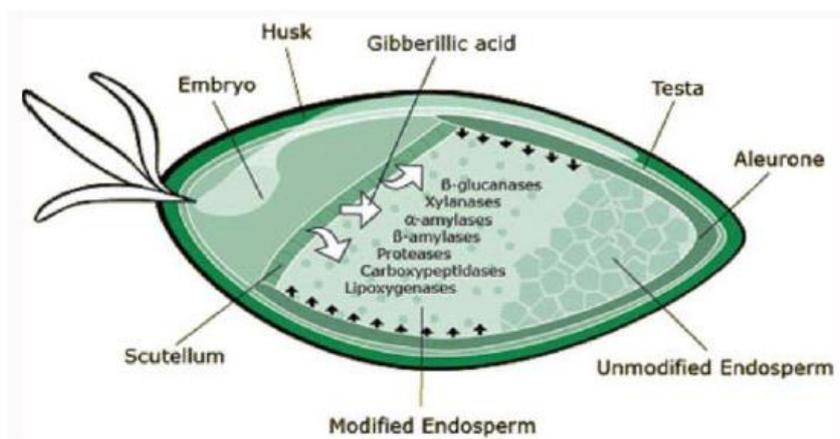


Figura 11- Modificação do grão de cevada. Adaptado de ⁴⁰

3.1.2 Germinação e Secagem

Para que os grãos possam germinar, é fundamental uma correta hidratação com fornecimento adequado de oxigénio e a temperatura controlada (16-20 °C) ^{3,41}. Aqui

reside o principal papel da maltagem: a produção de enzimas essenciais para a brassagem.

As enzimas citolíticas, como é o caso das glucanases, são as primeiras a ser produzidas, para que degradação das paredes celulares possa ocorrer. Estas são seguidas das proteolíticas e por último são produzidas as amilolíticas.

As β -glucanases vão digerir as paredes celulares do endosperma, facilitando acessibilidade aos grânulos de amido. A enzima responsável pelo primeiro passo da degradação das paredes celulares é a β -glucano solubilase, uma vez que liberta as β -glucanas aí contidas. As endo- β -glucanases são sintetizadas nas células da camada da aleurona e durante a germinação e expandem-se para o endosperma, onde degradam as β -glucanas que foram libertadas das paredes celulares por ação da β -glucano solubilase. A hidrólise das β -glucanas durante a germinação tem um impacto significativo na qualidade do malte ⁴².

Durante a germinação 36-42% da proteína é degradada em péptidos pequenos e aminoácidos. As enzimas envolvidas neste processo são: carboxipeptidases, dipeptidases, aminopeptidases e endopeptidases. Desta forma, o embrião tem à sua disposição aminoácidos para o seu metabolismo. No final da germinação as paredes celulares do endosperma devem estar uniforme e totalmente degradadas, com a mínima utilização do amido para os processos metabólicos do embrião.

A secagem interrompe a germinação dos grãos, com o cessar das reações bioquímicas, fixando as características do malte. O conteúdo de água diminuí de 40 para 5%, num período de 24h, tornando o malte mais estável para o armazenamento ².

Inicialmente ocorre a remoção rápida da água à superfície do grão, com recurso a temperaturas baixas (50-60 °C), minimizando a utilização do amido. No entanto, para a obtenção de maltes escuros é essencial a formação de açúcares simples, aminoácidos e péptidos para o desenvolvimento de melanoidinas. Para esse efeito a remoção da água é feita de forma mais lenta - a remoção lenta com o aumento da temperatura promove a ação das enzimas amilolíticas e proteolíticas. Segue-se a fase intermédia, onde a temperatura é aumentada lentamente durante várias horas atingindo-se valores finais de humidade de 12%.

Na última fase, denominada de *curing*, mediante o tipo de malte pretendido, as temperaturas poderão variar entre os 50 e 110 °C. Nesta fase a humidade é reduzida

para 4%. A secagem é realizada com aumento progressivo da temperatura, para assegurar uma maior preservação das enzimas formadas durante a germinação.

3.1.3 Formação de compostos de cor e sabor

Durante a secagem aquando a utilização, de forma prolongada, de temperaturas acima dos 90 °C são promovidas as reações de Maillard: responsáveis por vários compostos de aroma, sabor e cor. Estas reações (**Fig.12**) iniciam-se com a condensação do grupo carbonilo de um açúcar redutor com o grupo amina livre de um aminoácido. Desta reação há a formação de glicosilaminas N-substituídas que após rearranjos, e dependendo da natureza do açúcar, dão origem a produtos de Amadori (aldose) ou a produtos de Heyns (cetose). A próxima fase desta reação é dependente da temperatura, da atividade da água e do pH. Temperatura e teores de água elevados favorecem estas reações. A pH neutro ou ácido há formação de furfural (pentoses envolvidas) ou hidroximetilfurfural (hexoses envolvidas); a pH básico são formadas as redutonas e vários produtos de fissão. Nesta segunda etapa surgem compostos dicarbonílicos que ao reagir com aminoácidos formam aldeídos – compostos de degradação de Strecker^{36,43}. A última fase das reações de Maillard corresponde à polimerização destas substâncias em melanoidinas – pigmentos castanhos. Alguns destes compostos de baixo peso molecular são importantes para o aroma e sabor enquanto que as melanoidinas são importantes para a cor do malte⁴¹.

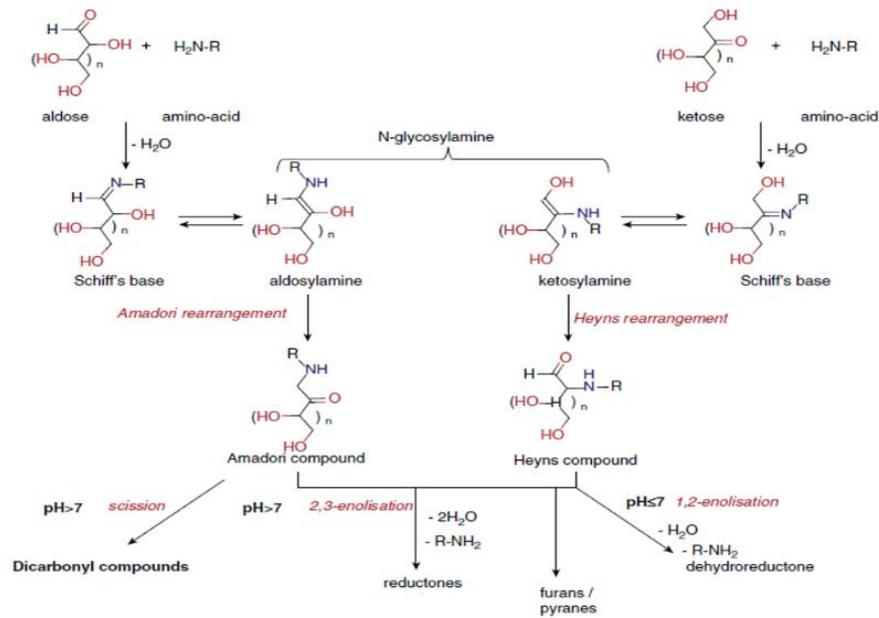


Figura 12 – Reações de Maillard. Adaptado de ⁴³

3.1.4 Formação do precursor DMS, DMS livre e nitrosaminas

Durante a germinação é formado o precursor inativo do sulfureto de dimetilo (DMS), sendo a quantidade deste precursor dependente da variedade de cevada. O precursor SMM (S-metilmetionina) sofre degradação a elevadas temperaturas convertendo-se em DMS (**Fig.13**), sendo este último um *off-flavour* da cerveja. O DMS devido à sua volatilidade é perdido durante os processos de secagem e também durante a ebulição do mosto. Assim, maltes com temperaturas de secagem superiores, irão conter menos DMS. Outro composto, o dimetil sulfóxido (DMSO) é formado por oxidação do DMS e do precursor inativo SMM. O DMSO não é volátil e pode ser reduzido a DMS pela levedura, não sendo possível a sua remoção nesta fase ².



Figura 13 – Reação da conversão do precursor SMM em DMS, por ação de calor. Adaptado de ⁴⁴

As nitrosaminas são substâncias carcinogénicas formadas a elevadas temperaturas a partir de aminas e de óxidos de azoto. Com a utilização do aquecimento

indireto, nesta etapa, a quantidade de nitrosaminas produzidas diminuiu significativamente.

3.1.5 Tipos de malte

Em geral os maltes são divididos em dois grandes grupos: maltes base e maltes especiais. Os maltes base são caracterizados por um elevado poder diastático, isto é, possuem uma elevada quantidade de enzimas responsáveis pela conversão do amido em açúcares mais simples. Estes maltes são utilizados como fonte primária de açúcares fermentescíveis e de azoto na produção do mosto. Por sua vez, os maltes especiais são utilizados maioritariamente para conceder cor, aroma e sabor. Desta forma, não necessitam de ter poder diastático ⁴².

Malte Base - *Pilsner*

O malte *Pilsner* é obtido pelo processo de secagem convencional. Na produção deste malte é fundamental evitar condições que favoreçam a formação de melanoidinas, para isso recorre-se à utilização de cevada com teores proteicos e níveis de molha baixos ². Este malte apresenta coloração pálida (2,5-3,5 EBC), sabor suave e excelente poder enzimático sendo utilizado na produção da maioria das cervejas lager.

Maltes Especiais

A partir dos maltes base, é possível produzir uma enorme variedade de maltes especiais controlando três variáveis: humidade, temperatura e tempo de secagem. Ao contrário dos maltes base, os maltes especiais apresentam baixo potencial enzimático e só podem ser utilizados em baixas proporções nas receitas. Contudo, contribuem para a singularidade de sabores, aromas e cores da cerveja.

Malte Chocolate

Para a obtenção de malte chocolate, parte-se de maltes pouco modificados que já tenham passado pelo passo de secagem, a baixas temperaturas, e que apresentem um teor de humidade entre 4-6%. Este malte sofre posterior torrefação com a utilização de temperaturas entre 215 e 220 °C ⁴⁵. Devido às temperaturas praticadas, não possuem enzimas ativas. A sua percentagem nas receitas de mosto varia entre 3-5% e são utilizados essencialmente para conferir cor à cerveja, sabor e aroma. A cor dos maltes

chocolate pode variar entre 900-1200 EBC, enquanto que os maltes escuros apresentam coloração entre os 1200-1400 EBC ⁴¹.

Malte Caramelo

O malte de caramelo é utilizado para conceder cor, corpo e sabor à cerveja. A sua preparação, parte de um malte verde bem modificado e com teores de humidade entre os 45-48%. O malte, após a germinação, é sujeito a temperaturas entre os 45 e 50 °C, maximizando a atividade enzimática, com consequente produção de compostos de azoto e açúcares de baixo peso molecular ². Deste modo, o grão ao ser submetido a um aumento de temperatura no patamar de *curing* faz com que o grão adquira uma textura caramelizada. Em geral, quanto mais escura for a coloração do malte menor será o extrato e o pH do mosto resultante ³⁹. Os diferentes maltes de caramelo são o *carapils* (3,5-5,0 EBC), *carahell* (20-40 EBC), *carared* (40 e 60 EBC) e *caramunch* (80-160 EBC) de entre outros.

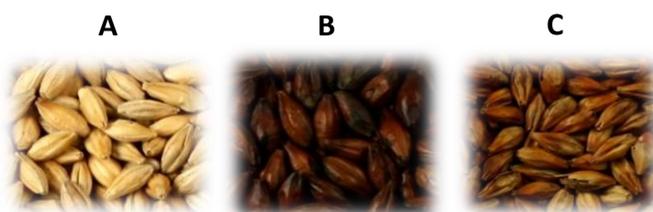


Figura 14- (A) Malte Pilsner (B) Malte Chocolate (C) Malte Caramelo. Adaptado de ⁴⁶

3.1.6 Parâmetros de qualidade do malte

No final do processo de secagem pretendem-se maltes base com as seguintes características: elevado poder diastático; baixa teor em β -glucanas; baixa viscosidade do mosto; baixo teor de humidade; elevada friabilidade; teores baixos de nitrosaminas e do precursor SMM.

A qualidade do malte é avaliada com recurso à análise das três modificações que ocorrem durante o processo de maltagem: citólise, proteólise e degradação do amido. A citólise descreve a degradação dos componentes estruturais das paredes celulares do endosperma – proteínas estruturais e polissacarídeos (em especial as β -glucanas). Uma correta degradação destes compostos, permite um melhor acesso aos grânulos de amido, o que se traduz num maior rendimento ao nível da produção de extrato ¹⁵. Contrariamente, uma modificação pouco extensa leva a perdas e à transferência para o

meio de β -glucanas de elevado peso molecular que tendem a formar de géis, aumentando a viscosidade do mosto.

A viscosidade deve manter-se entre 1,5 e 1,6 mPA s. A concentração de β -glucanas deve ser inferior a 200 mg/L, de forma a não causar problemas durante a filtração do mosto e da cerveja.

Após as modificações citolíticas, o grão encontra-se mais friável. A análise à friabilidade determina a fração do malte que é facilmente triturada durante a moagem^{47,48}. Grãos bem modificados são facilmente triturados e não apresentam extremidades rígidas, contrariamente aos grãos pouco modificados⁴². Valores ótimos de friabilidade encontram-se acima de 87%². Valores baixos correspondem a uma filtração lenta, problemas de brassagem e baixo rendimento.

O índice de Hartong é determinado a 45 °C, temperatura onde a atividade das enzimas proteolíticas e citolíticas é máxima. Valores entre 36 e 40 são considerados satisfatórios.

A proteólise consiste na degradação das proteínas presentes no grão e a sua solubilização. Uma proteólise pouco extensa não providencia compostos azotados em quantidades necessárias para o desenvolvimento da levedura. Contudo, se proteólise for demasiado extensa, a quantidade de proteína de elevado peso molecular diminui, com efeitos negativos para a estabilidade da espuma¹⁵. Nesta situação, contudo, há uma maior disponibilidade de aminoácidos o que contribui para a formação de produtos de Maillard, durante a fase de secagem.

O teor de azoto, o índice de Kolbach (indicador de modificação das proteínas) e o FAN são os parâmetros mais utilizados para avaliar a extensão da proteólise. O teor de azoto divide-se em teor de azoto total que deve ser inferior a 10,8% (valores mais elevados causam problemas de turvação) e em teor de azoto solúvel que deve estar compreendido entre 3,9 e 4,7%. O índice de Kolbach (rácio entre azoto solúvel e azoto total) mede a percentagem de proteína total do malte que foi dissolvida durante o processo de maltagem, com valores ótimos entre 35 e 41%². O FAN deve corresponder a 21% do azoto solúvel, com concentrações no mosto compreendidas entre 120 e 200 mg/L.

A degradação do amido é avaliada pelo extrato, atenuação final e poder diastático. O extrato é referente à quantidade de açúcares fermentescíveis e não

fermentescíveis, extraídos a partir do malte, durante a brassagem. O valor de extrato varia consoante as variedades e tipos de malte: maltes pálidos (79-82% do peso seco) e maltes escuros (75-78% do peso seco) ^{2,15}. A atenuação final - conversão dos açúcares em álcool - providencia informações sobre a qualidade do mosto e a sua utilização pela levedura. Os valores de atenuação final devem estar entre 70-80% ². O poder diastático diz respeito à ação da α -amílase, β -amílase e dextrinase limite, e é essencial para a conversão do amido em açúcares fermentescíveis. Este é expresso em unidades Windisch-Kolbach (WK). Os valores para maltes pálidos encontram-se entre 240-260 WK e para maltes escuros entre 150-170 WK.

A humidade do malte e a cor do mosto são igualmente parâmetros de qualidade. Em primeiro lugar, quanto maior o conteúdo de humidade presente no grão, maior será o peso em malte necessário para um dado rendimento de extrato. Em segundo lugar, a qualidade do malte é prejudicada, com problemas na moagem, perda de aromas e contaminações com microrganismos durante o armazenamento ⁴¹. A humidade difere consoante o tipo de malte: malte pálido entre 3-3,5% e malte escuro entre 1-4,5% ². A cor do mosto está relacionada com a cor do malte, dependendo este fator da intensidade da secagem. Um mosto mais escuro geralmente revela um menor nível de açúcares fermentescíveis e de aminoácidos o que contribui para uma menor quantidade de extrato conseguido ⁴⁹.

A presença do precursor S-metilmethionina (SMM) não deverá exceder os 5 mg/L ¹.

Assim, para a escolha de determinado malte a introduzir no processo cervejeiro, é necessária a avaliação do conjunto anterior de parâmetros de qualidade.

3.2 Produção de Mosto

O fabrico do mosto (**Fig.15**) compreende as seguintes etapas: ensilagem das matérias-primas, limpeza e moagem do malte e de alguns cereais não maltados, brassagem, filtração, ebulição do mosto, decantação, arrefecimento e arejamento. O processo de fabrico do mosto inicia-se com a receção e ensilagem das matérias-primas. Estas matérias-primas são conduzidas para silos, onde são armazenados e acondicionados separadamente.

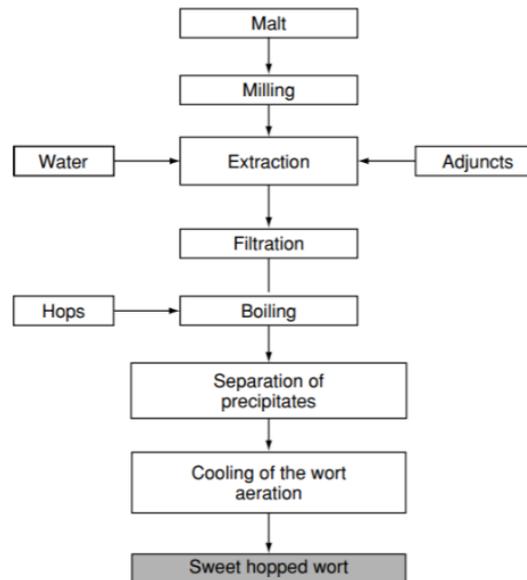


Figura 15- Diferentes passos da produção de mosto. Adaptado de ⁵⁰

3.2.1 Moagem e Brassagem

A produção de mosto inicia-se com a moagem, em farinha, do malte e dos adjuntos de forma a aumentar a superfície de contacto entre estes e a água. Este processo torna o endosperma amiláceo mais acessível às enzimas do malte, permitindo uma extração mais eficiente dos componentes ⁵¹.

Durante o processo de brassagem, a água a uma determinada temperatura é adicionada ao malte moído, numa fase denominada por empastagem. Com a hidratação do malte ocorre a ativação das enzimas. No decurso da brassagem por ação de processos químicos, físicos e enzimáticos ocorre a extração e a solubilização dos compostos do malte. Os açúcares, as dextrinas, determinadas substâncias inorgânicas e algumas proteínas, são solúveis. No entanto, o mesmo não é verdade para o amido, para a celulose e para as proteínas de elevado peso molecular, sendo assim necessário convertê-los nas suas formas solúveis. Todas as substâncias em solução são designadas por extrato ². O principal objetivo da brassagem é a degradação completa do amido em açúcares mais simples ³⁵.

O processo de brassagem envolve o aumento da temperatura do empaste para temperaturas ótimas de atividade enzimática, seguido de períodos de estabilização, permitindo que a atividade enzimática possa decorrer a essa temperatura durante um determinado período:

- 45-50 °C: Ação das proteases e das β -glucanases;

- 50-65 °C: Ação predominante da β -amílase com produção de maltose e dextrinas limite;
- 70-75 °C: Ação dominante da α -amílase, com hidrólise total do amido (sacarificação);
- 78 °C: temperatura utilizada para a inativação das enzimas amilolíticas, fixando a quantidade de açúcares fermentescíveis.

A grande maioria das indústrias cervejeiras, utiliza temperaturas de empastagem entre os 60-64 °C, tratando-se da temperatura ótima de ação da β -amílase. O patamar de temperatura entre os 45-50 °C é evitado aquando a utilização de maltes bem modificados, para garantir uma perda menor de proteínas de elevado peso molecular (estabilidade da espuma). A desvantagem de eliminar este patamar do diagrama de brassagem é o conteúdo de β -glucanas de elevado peso molecular que ficam por dissolver, devido à inatividade das β -glucanases a temperaturas mais elevadas ². Desta forma, devem ser utilizados maltes com baixo teor de β -glucanas e com um grau de modificação citolítico elevado.

A brassagem pode ser realizada por infusão, onde o empaste é todo aquecido com períodos de estabilização específicos, até se atingir a temperatura final do processo. Este método apresenta a vantagem de a brassagem ser realizada numa só caldeira, evitando a entrada de ar ⁵¹.

Quando realizada por decocção, o empaste não é todo aquecido à mesma temperatura. Uma parte (1/3) é removida e aquecida, separadamente, até à temperatura de ebulição. Após este passo é novamente adicionado ao interior da caldeira, promovendo o aumento da temperatura total da caldeira para o próximo patamar de temperatura ^{2,51}. Esta técnica é amplamente utilizada na produção de cervejas tipo lager e em maltes com um menor grau de modificação e que, portanto, necessitam de uma ação enzimática mais extensa. Neste método, com a ebulição do empaste, a eficiência das enzimas na degradação do amido é maior, as reações de Maillard são favorecidas e a coagulação das proteínas torna-se mais completa permitindo obter cerveja mais límpida ^{2,51}.

O método de brassagem de infusão dupla (**Fig.16**), utilizado na produção de cervejas com elevado teor de adjuntos, pode ser visto como uma combinação do método de infusão e decocção e envolve duas caldeiras em separado: caldeira de empastagem do malte, bem modificado, e a caldeira de caldas onde são adicionados os

adjuntos com uma pequena porção de malte moído ou uma fonte externa de α -amílase. O conteúdo da caldeira de caldas (p.e. milho) é aquecido até 70 °C, mantendo-se nesta temperatura durante um determinado tempo para que ocorra a gelatinização e liquefação do amido. Após esta fase é aquecido até 100 °C e adicionado à caldeira de empastagem aumentando a temperatura desta para 65-75 °C, durante 30-40 minutos, promovendo a fase de sacarificação. Após a sacarificação a temperatura é aumentada para 75-77 °C para a inativação das enzimas ^{2,50,52}.

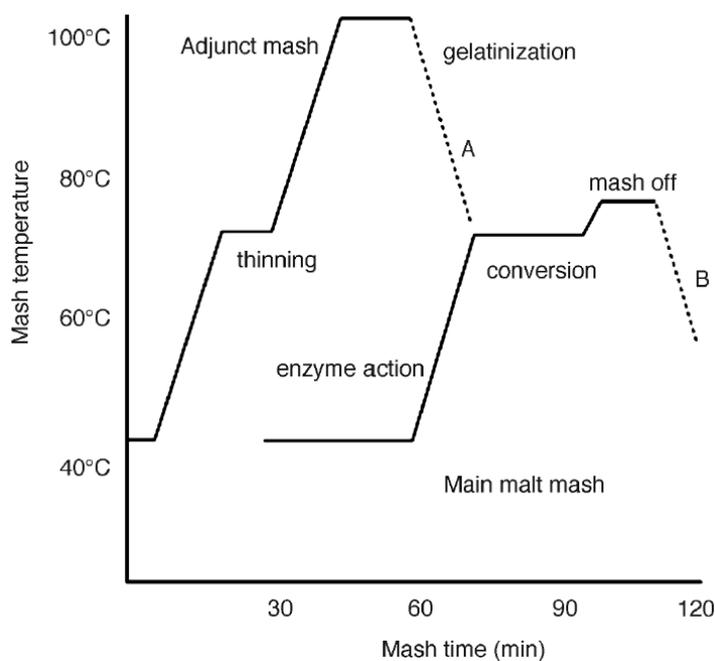


Figura 16 – Método dupla brassagem. A linha a tracejado representa a transferência do empaste. (A) Mistura dos adjuntos das caldeiras das caldas com o malte na caldeira de empastagem (B) Mistura finalizada e enviada para o filtro. Adaptado de ⁵³

Processos de degradação enzimática

Degradação do amido

A dissolução do amido ocorre em três passos: (1) gelatinização; (2) liquefação e (3) sacarificação. O amido é em parte cristalino e amplamente insolúvel em água, assim para que seja possível a sua solubilização é necessário interromper a sua estrutura granular. A gelatinização do amido ocorre com a adição de água a temperaturas progressivamente mais elevadas, provocando a dissociação das regiões helicoidais da amilose e a quebra da estrutura cristalina da amilopectina. Após esta fase os grãos absorvem água, aumentando de tamanho até um certo limite. Quando este limite é excedido, os grãos rompem formando uma solução viscosa ^{2,51}. A gama de temperatura

utilizada durante brassagem deve ser elevada o suficiente para garantir a gelatinização do amido, uma vez que as enzimas degradam mais eficientemente o amido na sua forma gelatinizada, mas baixa o suficiente para que a β -amílase permaneça ativa ⁵⁴. A viscosidade da solução diminui através da hidrólise parcial das cadeias de amilose e de amilopectina, por ação da α -amílase, num processo denominado por liquefação. A degradação completa do amido em maltose e dextrinas, por amílases, é a etapa de sacarificação. Esta etapa é essencial para a formação de açúcares fermentescíveis. A percentagem de açúcares fermentescíveis no extrato determina a atenuação limite, que estabelece o potencial teor alcoólico da cerveja.

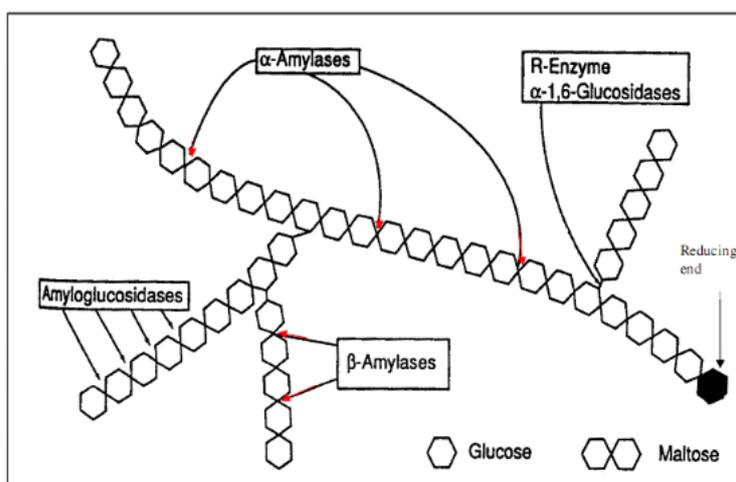


Figura 17- Degradação do amido pelas enzimas amilolíticas. Adaptado de ⁸⁸

O efeito das enzimas, referidas anteriormente, está intimamente dependente do pH (ácido) da mistura (água malte e cereais não maltados), assim como com os intervalos de temperatura e tempo seguidos ao longo do processo. Na **Tabela 1** é possível observar as temperaturas e pH ideais para a atuação das enzimas mais importantes no fabrico de mosto

Tabela 1 – Enzimas amilolíticas, local de ação enzimática, temperatura e pH ótimos ².

Enzima	Local de ação enzimática	Temperatura ótima	pH ótimo
α -amílase	endo-enzima (α -1,4)	70-74 °C	5,6 e 5,8
β -amílase	exo-enzima (α -1,4)	62-64 °C	5,4-5,5

Para monitorizar a sacarificação procede-se ao teste de iodo, que é realizado no mosto arrefecido. Este teste baseia-se no facto do iodo na presença de dextrinas de elevado peso molecular e de amido, à temperatura ambiente, formar um complexo azul a vermelho. Assim, a sacarificação está completa quando nenhuma cor é formada.

Degradação proteica

Cerca de um terço da proteína do malte torna-se solúvel durante a brassagem, passando para o mosto. Neste processo são essenciais as endopeptidases (temperatura ótima 45-50 °C) responsáveis pela hidrólise das proteínas em péptidos (proteases) e as exopeptidases (temperatura ótima 50 °C) que removem os aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica (carboxipeptidases) ⁵⁴. Os aminoácidos livres presentes no mosto, são essenciais para o correto funcionamento da levedura. Contudo, se o malte utilizado se tratar de um malte bem modificado a maioria desta hidrólise já ocorreu durante a maltagem. Nestas circunstâncias um patamar demasiado longo a 45 °C pode não ser vantajoso, como referido anteriormente. As proteínas de elevado peso molecular são importantes para a estabilidade da espuma em particular a *lipid transfer protein* (LTP1)², para o corpo e para a turvação da cerveja.

Degradação das β -glucanas

A presença de β -glucanases em quantidades suficientes é fulcral para a eficaz redução do teor de β -glucanas na cerveja (< 200 mg/L). Estas glucanas tem efeitos negativos para o processo, como a contribuição para a viscosidade do mosto, acarretando problemas na filtração do mosto e da cerveja. Contudo, são importantes para o corpo da cerveja e para a estabilidade da espuma.

As endo- β -glucanases são responsáveis pela degradação das β -glucanas durante a brassagem com atividade máxima a pH entre os 4,5-4,8 e a 40-45 °C. As exo- β -glucanases, com condições ótimas a pH 4,5 e a 40 °C, contribuem de forma residual para a diminuição da viscosidade do mosto. Com o decorrer da brassagem, as β -glucanases são lentamente inativadas a temperaturas de 40 °C e rapidamente inativadas acima dos 50 °C ^{2,5}.

3.2.2 Acidificação do empaste

Com a interação dos fosfatos com os sais de cálcio e magnésio, o pH do empaste situa-se entre 5,6-5,8. No entanto, são pretendidos valores de pH de 5,2, uma vez que determinados processos ocorrem preferencialmente a pH's ligeiramente mais baixos:

- Enzimas, com exceção da β -amílase são mais ativas, o que se traduz num maior rendimento do extrato;
- Solubilização mais eficiente de determinados compostos, como o zinco;
- Formação de *trub* mais eficiente;
- Menor extração de polifenóis com efeitos na cor do mosto;
- Isomerização dos α -ácidos menos extensa, permitindo obter cervejas com um amargor mais agradável.

A acidificação pode ser feita com a adição de ácidos como o ácido fosfórico (H₃PO₄).

3.2.3 Filtração do mosto

No final da brassagem procede-se à filtração, com o propósito de separar a parte insolúvel (drêche) da parte solúvel (mosto). O processo de filtração pode ser realizado em tanques de filtração ou em filtros prensa ^{2,15,50}.

Os tanques de filtração apresentam um fundo falso perfurado, onde se dá a deposição das cascas das sementes de cevada criando um bolo filtrante, responsável pela filtração. Após a filtração, o mosto é enviado para a caldeira de ebulição, e ocorre a pulverização do bolo filtrante com água quente para remover os sólidos solúveis restantes. Este tipo de filtração permite obter mosto de excelente qualidade, mas apresenta tempos de filtração longos ¹⁵.

Os filtros prensa (**Fig.18**), atualmente mais utilizados, são constituídos por placas verticais revestidas em ambos os lados por material sintético. As placas de filtração possuem o lado de filtração, por onde é recolhido o mosto filtrado, e o lado da

membrana cujo propósito é comprimir o bolo que é formado durante a filtração contra a tela de filtração da placa seguinte. A câmara de filtração é o espaço entre membrana de filtração e a tela de filtração da placa seguinte, que é preenchida com o mosto de final de brassagem. Trata-se de um sistema automático com os seguintes ciclos de funcionamento: enchimento; filtração; pré-compressão; passagem de água; compressão e remoção da drêche.

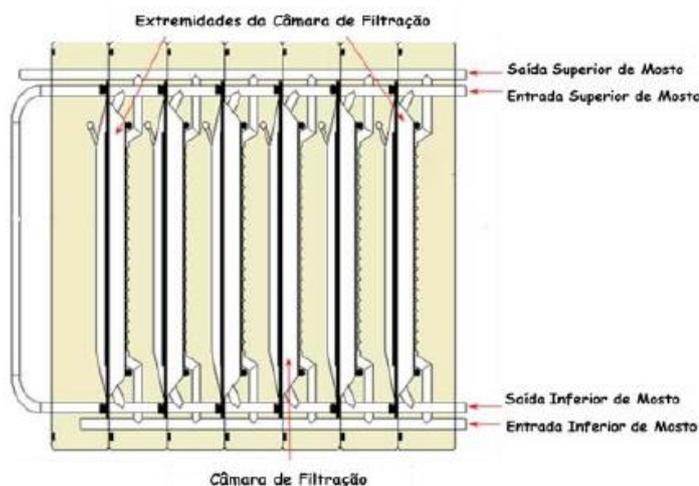


Figura 18 - Imagem esquemática do filtro prensa cheio com mosto. Adaptado de ⁴⁹

3.2.4 Ebulição do mosto

Procede-se à ebulição ($\pm 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) do mosto, em caldeiras de ebulição, tipicamente durante 60-90 min. É nesta fase que se adiciona o lúpulo para a isomerização dos α -ácidos. Durante esta fase, devido às elevadas temperaturas, grande parte dos aromas do lúpulo perdem-se por evaporação.

Este processo tem diversos objetivos, com maior ênfase no perfil aromático, amargor, clarificação e coagulação de proteínas:

1. Extração e isomerização dos compostos de lúpulo: A isomerização apresenta um maior rendimento para tempos de ebulição, temperaturas e pH's mais elevados, contudo a pH's mais baixos o amargor obtido é mais agradável.
2. Formação de *trub*: Durante a ebulição as proteínas de elevado peso molecular tendem a coagular e ligar-se aos polifenóis do malte e do lúpulo ². Desta forma e como os polifenóis existem na sua forma oxidada dois tipos de compostos são formados: compostos que consistem em proteínas e polifenóis e compostos que consistem em proteínas e polifenóis oxidados, que são insolúveis precipitando como *trub* ². O *trub* é formado maioritariamente por proteínas e polifenóis, mas

também contém alguns lípidos e minerais. A formação de *trub* é estimulada por tempos de ebulição mais longos, agitação vigorosa - favorecendo a interação entre as proteínas e os polifenóis - e pH's baixos (5,2 recomendado) ². Contudo, atualmente verifica-se a tendência de aplicar temperaturas e os tempos de ebulição menores, para garantir melhor estabilidade da espuma ². São ainda formados compostos que consistem em agregados de produtos da proteólise e polifenóis, que permanecem em solução precipitando durante o arrefecimento do mosto ^{2, 51}.

3. Estabilização microbiológica com a esterilização do mosto e estabilização bioquímica com a inativação enzimática.
4. Evaporação da água obtendo-se um mosto mais concentrado.
5. Reações de Maillard: As reações de Maillard, referidas em **3.1.3**, tornam-se mais intensas durante a ebulição do mosto, resultando na produção de vários compostos de aroma voláteis e não voláteis, assim como compostos de cor as melanoidinas.
6. Acidificação do mosto: O mosto torna-se mais ácido com a adição de ácidos de lúpulo e com a formação de melanoidinas.
7. Evaporação de substâncias não desejadas: O mosto contém uma vasta gama de substâncias com efeitos negativos para o aroma da cerveja: produtos de degradação lipídica como o pentanal, hexanal, heptanal, produtos das reações de Maillard e da degradação de Strecker como o 2- e 3-metil-butanal ou furfural. Estes compostos possuem pontos de ebulição inferiores a 100 °C, ocorrendo a sua evaporação durante a ebulição ¹. A formação e eliminação do DMS, referido em **3.1.4**, é, contudo, principal ponto de controlo. A sua formação é consideravelmente menor a pH 5 comparado com pH's entre os 5,5-5,8, o que determina o valor mínimo de pH de início de ebulição. Tempos de ebulição mais longos favorecem a eliminação do DMS, com teores finais recomendados < 100 µg/L. O arrefecimento rápido do mosto é importante, uma vez que a conversão de SMM para DMS continua a ocorrer ^{2,51}.

3.2.5 Decantação – Clarificação do mosto

Após a ebulição do mosto procede-se à remoção do *trub* para garantir a estabilidade coloidal e o aroma da cerveja. As partículas do *trub* bloqueiam as paredes

celulares e estimulam a sedimentação das leveduras, tendo implicações negativas para a taxa fermentativa ⁵¹. As técnicas utilizadas para a remoção do *trub* incluem sedimentação, centrifugação e filtração. A sedimentação é a forma mais fácil de remoção, e pode ser feita em tanques de sedimentação ou utilizando a *whirlpool*. Os tanques de sedimentação ou decantadores são tanques circulares com o fundo cónico, facilitando a remoção do *trub*, para onde é enviado o mosto quente e onde permanece por um determinado período, para a sedimentação das partículas ⁵¹. A *whirlpool* é um método mais económico, em que o mosto quente é enviado de forma tangencial criando um fluxo rotacional, responsável pela sedimentação do *trub*, na forma de um cone, no centro do tanque.

3.2.6 Arrefecimento e arejamento do mosto

Após a clarificação do mosto, este deve ser arrefecido para a temperatura de inoculação da levedura: ale (15-22 °C) e lager (6-12 °C). O arrefecimento deve ser rápido e realizado sob condições assépticas para evitar contaminações ⁵. Este é realizado através de permutadores de placas, onde a água é utilizada como agente refrigerante.

Na fase inicial da fermentação a levedura necessita de oxigénio dissolvido no mosto, para a formação esteróis e ácidos gordos insaturados necessários à formação de novas células (propagação) ². O mosto frio deve encontrar-se saturado com oxigénio para que a levedura inicie a primeira fase da fermentação. A injeção de ar esterilizado ainda é amplamente utilizada, mas não permite obter mais do 8 a 10 ppm, considerando que um valor de referência de oxigénio em partes por milhão deve ser igual aos graus Plato ($^{\circ}P$) no mosto, para mostos HGB (15-18 $^{\circ}P$) é frequentemente necessário a utilização de oxigénio puro ⁷. Procede-se ao arejamento durante ou após o arrefecimento, uma vez que a adição de oxigénio ao mosto, enquanto quente, causa a oxidação dos componentes, levando ao escurecimento e a alterações no aroma e sabor ⁵. O arejamento e a adição da levedura podem ser realizados em simultâneo, ao longo de toda a adição de mosto, de forma a que a sua distribuição na cuba de fermentação seja uniforme ².

3.3 Fermentação

3.3.1 Fermentação Primária

As leveduras cervejeiras são heterotróficas e anaeróbicas facultativas, sendo capazes de oxidar um largo espectro de moléculas orgânicas, descrito em 2.1.4, gerando energia na forma de ATP, poder redutor (NADH) e providenciando intermediários de carbono para reações anabólicas. Dependendo da disponibilidade de oxigênio, da concentração e do tipo de açúcares presentes, o metabolismo da levedura pode ser totalmente aeróbico e oxidativo ou fermentativo (ausência de O₂). Nas condições encontradas durante a produção de cerveja, o metabolismo respiratório encontra-se reprimido (efeito de *Crabtree*), e, portanto, os produtos principais do catabolismo dos açúcares são etanol e CO₂⁵. Durante as primeiras horas da fermentação, a degradação oxidativa dos açúcares ocorre através da glicólise e do ciclo de *Krebs* (respiração). Ao longo do processo fermentativo a atividade do ciclo de *Krebs* torna-se bastante reduzida. A fermentação alcoólica e a respiração possuem a primeira fase, glicólise, em comum onde uma molécula de glucose é metabolizada em duas moléculas de piruvato com um ganho de duas moléculas de ATP e com produção de poder redutor, que irá ser utilizado na conversão de acetaldeído em etanol. No entanto, durante a fermentação o piruvato é descarboxilado em acetaldeído e CO₂, pela ação da álcool desidrogenase, e o acetaldeído é reduzido em etanol, promovendo a re-oxidação do NADH em NAD⁺ no citoplasma, essencial para manter o balanço *redox* no interior da célula (Fig. 19)^{3,55}.

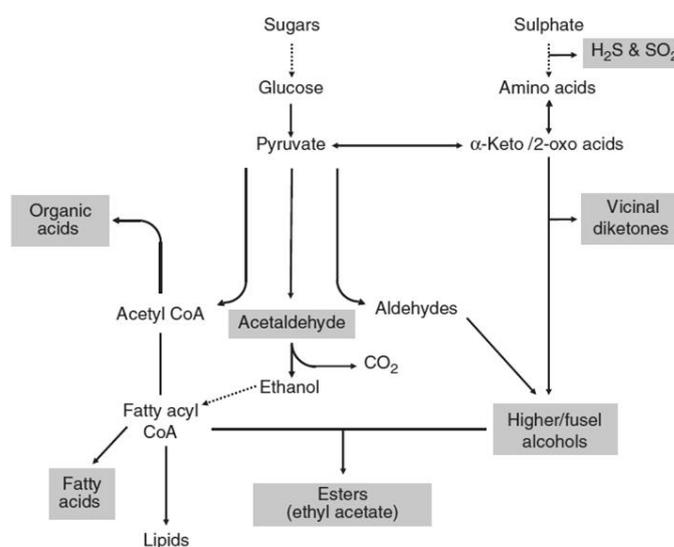


Figura 19 - Visão global da fermentação alcoólica e formação de subprodutos da fermentação. Adaptado de⁵¹

Ao longo da fermentação o extrato vai sendo continuamente fermentado e convertido em etanol – atenuação (70-80%). A atenuação limite, medida em laboratório, é utilizada para aferir qual a percentagem do extrato que é potencialmente fermentável². A atenuação final é medida anteriormente ao enchimento da cerveja, e deve ser semelhante à atenuação limite. Valores díspares são negativos para o rendimento do processo e são indicadores da presença de extrato disponível para a proliferação de para possíveis microrganismos contaminantes^{2,5}.

No decurso da fermentação ocorre a diminuição do pH (4,2-4,6) e como consequência, verificam-se alterações na cor da cerveja e a precipitação de substâncias amargas e polifenóis. O teor de CO₂ vai aumentando sendo que apenas 15% é solúvel na cerveja, podendo o restante ser recuperado². Assim ao longo da fermentação são retiradas amostras para se verificar se parâmetros como o pH, o teor em extrato, a atenuação e o volume alcoolométrico (% álcool (v/v)) estão dentro das especificações requeridas.

Ao longo da fermentação são produzidos vários subprodutos (**Fig.19**), importantes para o aroma da cerveja: dicetonas vicinais, aldeídos, álcoois superiores, ésteres, ácidos orgânicos e compostos de enxofre. As dicetonas vicinais, diacetilo (2,3-butanodiona) e 2,3-pentanodiona, tratam-se de subprodutos das vias sintéticas dos aminoácidos isoleucina (pentanodiona), leucina e valina (diacetilo), que conferem notas amanteigadas à cerveja. O diacetilo é quantitativamente mais importante, uma vez que o limite de deteção é menor⁵¹. O ponto de partida para a produção de diacetilo é o piruvato que é convertido em α -acetolactato, intermediário da síntese de valina, sendo parte deste composto excretado pela levedura. No exterior o α -acetolactato dá origem, por descarboxilação oxidativa, ao diacetilo (**Fig.20**). Esta reação é promovida por diminuição do pH, aumento da temperatura e presença de oxigénio². A levedura tem a capacidade de remover o diacetilo do meio e de o reduzir em acetoina e por fim em 2,3-butanodiol, tendo este último um limite de deteção relativamente alto³¹. A concentração de diacetilo atinge um pico no final da fermentação primária.

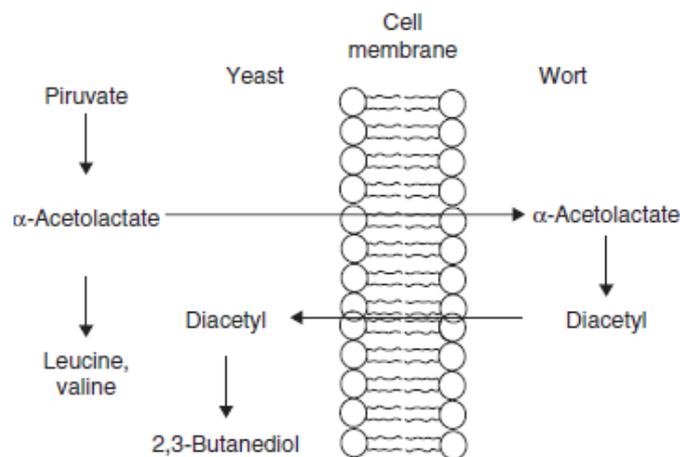


Figura 20- Formação e conversão do diacetil. Adaptado de ⁵².

O aldeído mais relevante é o acetaldeído, que se trata de um intermediário da fermentação alcoólica, com impacto negativo para o aroma. A sua concentração é mais elevada nos primeiros três dias de fermentação, sendo posteriormente removido.

Os álcoois superiores, em contraste com as dicetonas vicinais e com os aldeídos, são compostos de aroma característicos da cerveja final e não podem ser removidos, sendo a sua concentração ajustada com o controlo da fermentação. Estes são sintetizados pela levedura por via catabólica, em excesso de aminoácidos, e pela via anabólica através de hidratos de carbono ^{2,51}. Os ésteres são os compostos mais importantes para o aroma da cerveja e formam-se pela esterificação de ácidos gordos com álcoois ou com álcoois superiores. O éster mais abundante é o acetato de etilo (10 a 20 ppm), sendo a concentração dos restantes ésteres é < 1 ppm ⁵. Os ácidos orgânicos são formados principalmente a partir dos aminoácidos presentes no mosto, influenciando o sabor e aroma diretamente quando presentes acima do limiar de deteção e ao influenciarem o pH ⁵¹. São produtos em excesso do ciclo de *Krebs* incompleto, sendo os mais importantes o acetato, lactato, succinato, citrato e o α -cetoglutarato, de entre outros.

Por fim, a maioria dos compostos de enxofre presentes, tem origem nas matérias-primas, no entanto, o sulfeto de hidrogénio (H_2S) e o dióxido de enxofre (SO_2) são dependentes da atividade da levedura ³¹. Ambos os compostos são subprodutos da síntese dos aminoácidos cisteína e metionina a partir de sulfato. O H_2S é muito volátil, por isso, é parcialmente perdido com as bolhas de CO_2 , sendo a sua remoção importante uma vez que confere aroma a ovos podres. O sulfito, contudo, é importante para a

estabilidade da cerveja, uma vez que se liga a compostos carbonílicos indesejados, fazendo com o que o limite de deteção destes seja superior. Previne igualmente reações oxidativas (antioxidante), aumentando o tempo de vida do produto final ⁵⁶.

No final da fermentação a levedura floculante, descrito em **2.1.4**, é removida.

3.3.2 Fermentação Secundária

Completando a fermentação primária a cerveja é denominada verde, uma vez que contém pouco CO₂, é turva e apresenta sabores e aromas inferiores. De forma a melhorar estes parâmetros a cerveja sofre um processo de maturação, cujos principais objetivos são: (1) Fermentação do extrato remanescente; (2) Sedimentação das células de levedura; (3) Melhoramento da estabilidade coloidal da cerveja através da sedimentação dos complexos proteína-taninos e da estabilidade da espuma; (4) Saturação da cerveja com CO₂; (5) Remoção dos compostos de aroma indesejados; (6) Ajustamento da cor e amargor da cerveja (se necessário).

Durante a maturação a remoção do diacetilo, *off-flavour* nas cervejas lager, é o principal objetivo. A sua concentração no produto final deve ser < 0,1 mg/L, para esse efeito a cerveja é mantida durante período de 2 a 3 dias a 14-16 °C ⁵.

Posteriormente a temperatura é reduzida (5-8 °C), promovendo a saturação da cerveja com CO₂. Alguns dos compostos voláteis indesejados (H₂S, SO₂ e DMS) acabam por ser arrastados com o CO₂ libertado. Nesta fase, a levedura é removida ⁵.

Por fim, a cerveja é arrefecida (-1/-2 °C), durante 3-7 dias, para a estabilização coloidal. Nesta gama de temperaturas a precipitação e sedimentação de partículas, responsáveis pela turvação do produto final, é favorecida. Estes compostos redissolvem-se a temperaturas mais elevadas (15-20 °C) e ao longo do armazenamento por efeito de calor, oxigénio, movimento, luz tendem a formar agregados permanentes ^{2,5}.

3.4 Dry-hopping (DH)

O *dry-hopping* é definido como a extração a frio dos compostos voláteis e não voláteis do lúpulo, numa solução alcoólica. Esta técnica tem vindo a ser utilizada para aumentar a estabilidade do sabor e do aroma, uma vez que permite transferir quantidades consideráveis de compostos aromáticos do lúpulo para a cerveja ^{57,58}. As

cervejas resultantes do DH são mais aromáticas devido à presença elevada de vários compostos como o linalol, o mirceno, o humuleno, β -citronelol e o geraniol ⁵⁹.

Em algumas cervejeiras é aplicada a técnica de *late hopping*, durante a fase final da ebulição ou durante a decantação (*whirlpool*), no entanto verifica-se uma perda significativa de óleos essenciais em virtude da sua volatilidade. Assim, o DH é realizado durante a fase fria do processo, maioritariamente após a fermentação ⁶⁰.

O resultado final do DH é influenciado pela quantidade e tipo de produto de lúpulo utilizado, método de extração (estático ou dinâmico), tempo de contacto com a cerveja, temperatura e presença de levedura ^{57,61}. O tipo de cerveja é outro fator a ter em consideração, uma vez que cervejas com teores alcoólicos mais elevados, retêm maiores quantidades destes compostos, devido à sua estrutura não-polar.

Dado que esta técnica pode ser realizada durante ou após a fermentação e a maturação, as temperaturas utilizadas podem variar entre os 0-20 °C, sendo que a taxa de extração dos compostos aromáticos aumenta proporcionalmente com a temperatura ^{58,59,60}. Quando realizada na presença de leveduras dá origem a um produto final com um perfil aromático marcadamente diferente, por efeito da biotransformação de determinados compostos (p.e. conversão de geraniol em β -citronelol). Assim é importante definir, no processo de DH, a presença ou ausência de levedura mediante o produto final pretendido.

Conceptualmente durante o DH os compostos aromáticos difundem do lúpulo para a matriz da cerveja até ser atingida uma concentração de equilíbrio, que é proporcional ao gradiente de concentração entre o lúpulo e a cerveja e à área superficial disponível ⁶². Na extração dinâmica, a cerveja é agitada para permitir a correta dissolução do lúpulo o que possibilita o constante deslocamento das camadas de cerveja ao redor das partículas de lúpulo, tornando a transferência dos compostos mais eficaz. Desta forma, este tipo de extração exhibe tempos de extração menores e transferências mais eficazes. O tempo de contacto é outro ponto crucial, dado que foram reportadas perdas no teor de linalol em consequência de um DH longo ⁵⁹.

Estudos recentes demonstram que o aumento da taxa de adição de lúpulo não implica um aumento da intensidade do aroma e sabor ^{57,59,62}. Lafontaine e Shellhammer ⁵⁷ constataram que a intensidade do aroma aumenta com a taxa de *dry-hopping*, contudo acima dos 800 g/hL, verifica-se o oposto. Isto vai de acordo com a diminuição

da taxa de extração dos componentes linalol e geraniol com o aumento da taxa de *dry-hopping*: a 200 g/hL as quantidades extraídas destes compostos foram ~23% e ~13% e a 1600 g/hL ~7% e ~3%, respetivamente.

Em geral, o objetivo do DH é a adição de aroma intenso a lúpulo sem influenciar em demasia o amargor do produto final. Porém, foi observado que com o aumento da taxa de DH ocorre o aumento das unidades de amargor e da concentração de humulilonas (α -ácidos oxidados). A extração de humulilonas durante o DH tem vindo a ser associada com o aumento das unidades de amargor ⁵⁷.

Para além destes efeitos, a utilização de elevadas quantidades de lúpulo representa custos e perdas significativas de cerveja (durante a separação da cerveja dos *spent hops*) assim como a produção de elevadas quantidades de resíduos ⁵⁷.

Na perspetiva de diminuir a quantidade de resíduos produzida durante o processo de DH, é interessante notar que o lúpulo não perde valor para o processo cervejeiro, após a extração dos óleos essenciais, uma vez que grande parte do conteúdo de α -ácidos ainda permanece retido nos *spent hops* ^{59, 63,64}. Os α -ácidos permanecem em elevadas quantidades devido ao seu carácter hidrofóbico, motivo pelo qual apresentam baixa solubilidade na água e na cerveja ⁶⁵. Assim, de uma perspetiva prática, para a reutilização dos *spent hops* será necessária a avaliação da quantidade de α -ácidos presentes, de forma a calcular a dose de adição destes no fabrico de mosto.

3.5 Filtração da cerveja

A filtração tem o propósito de assegurar que a cerveja permanece estável ao longo do tempo, para esse efeito são eliminados compostos sólidos causadores de turvação (p.e compostos precipitados, células de levedura) ².

Existem dois tipos de filtração: filtração por placas e filtração com adjuntos, sendo este último mais barato e eficiente na clarificação da cerveja ⁵. Neste tipo de filtração são utilizados pós, *kieselguhr* (KG) ou perlite, como agentes filtrantes. Estes são depositados num suporte, formando camadas porosas que permitem a separação das partículas.

Anteriormente ao processo de filtração, a cerveja é centrifugada eliminando as substâncias que ainda se encontram em suspensão (parte da levedura e partículas de

maiores dimensões que não decantaram). A cerveja centrifugada é arrefecida, num permutador de placas, garantindo que não ocorre a redissolução dos colóides.

Posteriormente, são utilizados filtros em que o meio filtrante empregue, mais utilizado, é o KG. A função principal deste filtro é a eliminação das restantes células de levedura e das partículas de maiores dimensões. Os próximos passos consistem na filtração, denominada por estabilização, com recurso a polivinilpolipirrolidona (PVPP) para a remoção de polifenóis e proteínas. Por fim, segue-se a filtração utilizando filtros armadilha (*trap*), assegurando a remoção total de turvação e a eliminação de partículas existentes de KG e de PVPP ^{2,5}. Todo o processo de filtração deve ser realizado na ausência de O₂.

Após a filtração a cerveja é carbonatada e diluída. Durante a diluição são corrigidos alguns parâmetros físico-químicos como o extrato, o álcool, o amargo, a cor e o pH ². A cerveja filtrada é enviada para os tanques de cerveja filtrada (TCF) até ao seu envio para o enchimento. Depois de engarrafada, procede-se à pasteurização da cerveja, com o objetivo de inativar os microrganismos potencialmente prejudiciais.

4 Objetivos de trabalho

Os objetivos deste estágio curricular, passam pela (1) integração na empresa, (2) aprendizagem do processo tecnológico e (3) otimização da utilização das matérias-primas do processo de produção de cerveja, com maior foco no malte e no lúpulo.

O terceiro objetivo trata-se do tema da dissertação e está dividido em três grandes objetivos:

1. Avaliação da integração de uma nova variedade de cevada, Sanette, no *mix* de maltes utilizados pela empresa, com vista à sua aprovação. Esta cevada trata-se de uma variedade dística, de primavera de elevado rendimento. A sua aprovação é um ponto importante para a empresa, uma vez, que esta variedade está atualmente em cultivo e em comercialização por parte dos fornecedores. Para a avaliação desta matéria-prima (**Fig.21**), com vista a efetuar a sua aprovação, é necessário: realizar o controlo da qualidade das matérias-primas, acompanhamento da brassagem, filtração e ebulição do mosto no fabrico. Nesta fase, é importante validar que não existem alterações dos parâmetros normais de fabrico de mosto. Na fase seguinte – fermentação – é importante garantir a viabilidade da levedura inoculada e realizar o acompanhamento da fermentação de forma a garantir que decorre dentro dos parâmetros especificados pela empresa.
2. Alteração do tipo de malte utilizado na cerveja X por um tipo de malte economicamente mais vantajoso, que, contudo, apresenta características físico-químicas e organoléticas idênticas ao malte utilizado originalmente. Para este fim, irá proceder-se a introdução gradual do novo tipo de malte nas percentagens de 25 e 50% para compreender os impactos físico-químicos (extrato primitivo, pH e cor) no mosto e no produto final bem como os impactos sensoriais no produto final. Adicionalmente, pretende-se melhorar os parâmetros físico-químicos do processo, com maior foco na atenuação real final aproximando-a do alvo especificado para este tipo de cerveja. Os patamares de temperatura do diagrama de brassagem irão ser alterados, verificando-se o sucesso desta alteração diretamente na atenuação real final da cerveja em fermentação e maturação.

3. Avaliação da possibilidade de reutilização do lúpulo descartado após *dry-hopping*, denominado *spent hops* (SH), no fabrico de mosto *standard* (Fig.22). Este reaproveitamento pretende diminuir os custos em lúpulo no início de ebulição (extrato de resina não isomerizado) bem como diminuir o impacto dos resíduos formados. Para este efeito, será necessário aferir sobre a quantidade de ácidos- α nos *spent hops* (SH), acompanhar o fabrico de mosto de forma a determinar as unidades de amargor (UA) provenientes dos SH e por último determinar a taxa de utilização dos compostos precursores de amargo deste material. Por fim, acompanhar a fermentação e compreender o impacto nas características organolépticas do produto acabado.

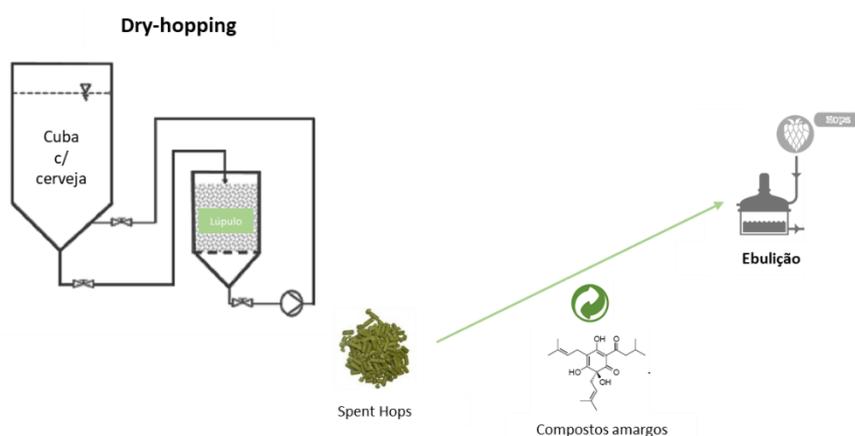


Figura 21 – Esquema reutilização dos *spent hops* no início de ebulição.

5 Métodos Analíticos de Controlo de Qualidade

Ao longo deste capítulo irão ser abordados os métodos analíticos envolvidos no controlo de qualidade das matérias-primas, do processo de produção e do produto acabado. Os métodos enunciados foram utilizados na realização de análises internas da responsabilidade do Laboratório Central do Super Bock Group.

O capítulo 5 encontra-se dividido na secção 5.1, referente ao controlo de qualidade do malte, do *gritz* de milho e da cevada e na secção 5.2, onde estão descritos os métodos de controlo de qualidade do processo e do produto acabado.

Todos os procedimentos enunciados na presente dissertação, foram retirados do Manual de Controlo de Qualidade do Super Bock Group.

Tabela 2 - Métodos analíticos utilizados em cada capítulo.

Método analítico	Capítulo 6	Capítulo 7	Capítulo 8	
Controlo qualidade matérias-primas	5.1.1	X		
	5.1.2	X		
	5.1.3	X		
	5.1.4	X		
	5.1.5	X		
Controlo qualidade processo e produto acabado	5.2.1	X	X	
	5.2.2	X		
	5.2.3	X		
	5.2.4	X		
	5.2.5	X		X
	5.2.6	X		
	5.2.7	X		
	5.2.8	X		
	5.2.9	X	X	
	5.2.10	X	X	
	5.2.11	X	X	
	5.2.12	X	X	X

5.1 Controlo de qualidade do malte, *gritz* de milho e cevada

Aquando a receção das matérias-primas são efetuadas diversas análises de controlo de qualidade. As análises aqui referidas encontram-se descritas no Plano de Inspeção e Ensaio da empresa.

As ações de controlo de qualidade, realizadas pela empresa, consistem: na avaliação visual das matérias-primas no momento da sua receção; na avaliação das

características físicas por análise da granulometria do *gritz* de milho, triagem do malte e da cevada, friabilidade dos maltes base e humidade.

Para além destas ações, é realizada a simulação de uma brassagem *standard*, que permite avaliar parâmetros como rendimento, extrato, aspeto do mosto, tempo de sacarificação, velocidade de filtração e cor.

5.1.1 Triagem do malte e da cevada (Método 3.11 da *Analytica – EBC*)

A triagem do malte e da cevada permite separar os grãos, nos seus diferentes tamanhos, por agitação em três peneiros, sobrepostos, com fendas de diferentes tamanhos. Esta técnica permite avaliar o tamanho e uniformidade dos grãos de malte e de cevada, de forma a selecionar os grãos bem modificados que permitem um melhor rendimento de extrato.

O método utilizado consiste na separação dos grãos por tamanho através da agitação em três peneiros, sobrepostos, com malhas de diferentes tamanhos (2,8 mm; 2,5 mm; 2,2 mm). A percentagem de cada fração é calculada através das seguintes fórmulas:

$$\text{Fracção} > 2,8 = \frac{A \times 100}{P}$$

$$\text{Fracção} > 2,5 = \frac{B \times 100}{P}$$

$$\text{Fracção} > 2,2 = \frac{C \times 100}{P}$$

$$\text{Resíduos} = \frac{D \times 100}{P}$$

$$\text{Grãos partidos} = E \times 100P$$

onde:

A, B, C, D e E = peso das diferentes frações em gramas;

P = peso total da amostra em gramas.

Os valores, em percentagem, recomendados para cada fração são os seguintes: conjunto da fração A e B > 90%, fração C < 2%, fração D < 1% e fração E < 0,5%.

5.1.2 Friabilidade (Método 4.15 da *Analytica - EBC*)

A friabilidade permite aferir sobre o grau de modificação dos grãos de malte. Valores de friabilidade mais elevados, permitem obter rendimentos de extrato superiores e tempos de filtração mais curtos.

Para a avaliação da friabilidade os grãos de malte são fragmentados por ação mecânica no tambor do friabilómetro (**Fig.22**). Após a fragmentação, os fragmentos menores e o material fisicamente modificado, passam através da malha do tambor. O material não modificado fica retido. A partir do peso do material retido, calcula-se a friabilidade pela seguinte fórmula:

$$F = 100 - 2 \times A$$

onde:

F = Friabilidade do malte, em %;

A = Peso da fração retida no tambor, em gramas (g).

O valor de referência para friabilidade em maltes bem modificados é de 88%.



Figura 22 – Friabilómetro presente no laboratório central nas instalações do Super Bock Group.

5.1.3 Humidade (Método 4.2 do *Analytica – EBC*)

A determinação da humidade dos maltes especiais, malte, cevada e *gritz* de milho é realizada segundo o método 4.2 do *Analytica – EBC*. Neste método a amostra é moída para formar uma farinha fina que é depois seca numa estufa previamente padronizada. O teor de humidade é calculado pela perda em massa durante a secagem:

$$H = \frac{B - C}{B - A} \times 100$$

onde:

H = humidade, em % (m/m);

A = peso da caixa vazia, em g;

B = peso da caixa com farinha, em g;

C = peso da caixa com farinha seca, em g.

Os valores de humidade máximos recomendados são: malte (5%), malte especiais (4,5%), *gritz* (13%) e cevada (14%).

5.1.4 Rendimento dos cereais maltados e não maltados (Método 4.5.1 da *Analytica-EBC*)

Para a avaliação de diversas características relativas à qualidade do malte, recorre-se ao método 4.5.1 da *Analytica-EBC*. Este método consiste na realização de uma brassagem *standard*, em pequena escala, para a produção de mosto laboratorial, seguida de filtração. Os parâmetros obtidos são: densidade, extrato, grau de sacarificação, viscosidade do mosto, velocidade de filtração, FAN, pH, coloração, cheiro e aspeto do mosto.

O extrato, a densidade e a cor são obtidos com recurso ao equipamento *Alkolyzer Plus Beer Analysis System* da *Anton Paar*. A taxa de sacarificação é determinada através da medição do tempo que demora até a sacarificação estar finalizada, com recurso ao teste de iodo.

A aparência e o odor são avaliados após a filtração, de forma sensorial. O aspeto do mosto é expresso como límpido, opalescente ou turvo. Quanto ao odor, este é definido como normal ou aromático, sendo que odores estranhos devem ser anotados.

Para o *gritz* de milho e para a cevada, parâmetros como cor, aparência, cheiro e o tempo de sacarificação não são avaliados.

Este método divide-se em duas fases: fase de empastagem (**Fig. 23, em cima**) e fase de filtração (**Fig.23, em baixo**).



Figura 23 - Empastagem dos cereais (em cima) e Filtração (em baixo).

Cereais não maltados

Empastagem

A empastagem da cevada e do *gritz* de milho é realizada utilizando um conjunto parâmetros diferentes dos utilizados para a empastagem do malte.

Em primeiro lugar adiciona-se água à mistura moída de cevada/*gritz* e mistura-se bem, garantindo a sua correta homogeneização. O copo com a mistura é colocado num banho quente, com agitação, até à ebulição (100 °C) onde permanece durante 30 minutos, sendo posteriormente arrefecido até 46 °C. Após o arrefecimento é adicionada farinha de malte padrão à mistura de cevada/*gritz* com o objetivo de fornecer enzimas para a formação do extrato. O copo com a mistura é colocado num banho de água quente, com agitação, durante 30 minutos a 45 °C. De seguida, a temperatura é elevada 1 °C/min, durante 25 minutos até uma temperatura final de 70 °C. Adiciona-se água quando se atinge os 70 °C e mantem-se esta temperatura durante 60 minutos. Por fim, o banho é arrefecido até à temperatura ambiente em 10-15 minutos.

Cereais maltados

Empastagem

No caso dos cereais maltados, adiciona-se água à mistura de malte moído, que é colocada num banho de água quente, com agitação, durante 30 minutos a 45 °C. Depois a temperatura é elevada a 1 °C/min, durante 25 minutos até uma temperatura final de

70 °C. Adiciona-se água quando se atingir os 70 °C, mantendo-se esta temperatura durante 60 minutos. Arrefece-se o banho até à temperatura ambiente em 10-15 minutos.

Filtração

A filtração é realizada para os cereais maltados e não maltados de igual forma, com recurso a funil e papel de filtro. Agita-se o conteúdo do copo e vira-se sobre o funil. Os primeiros 100 mL, são refiltrados, e recolhem-se os primeiros 50mL seguintes para a medição de cor pelo método de Lovibond. É nesta fase que se avalia o odor e aparência do mosto.

Após filtradas as amostras, retiram-se amostras do mosto para análise da densidade e do extrato. O extrato sobre matéria tal qual (% m/m) e sobre matéria seca (% m/m) dos vários cereais é calculado a partir das seguintes fórmulas:

A. Maltes base

$$R_1 = \frac{E(H + 800)}{100 - E}$$
$$R_2 = \frac{R_1 \times 100}{100 - H}$$

onde:

R_1 = Extrato do malte, sobre matéria tal qual, em % (m/m);

R_2 = Extrato do malte, sobre matéria seca, em % (m/m);

E = Extrato do mosto, em g/100 g;

H = Humidade do malte, em % (m/m).

B. Cevada/gritz de milho

$$R_t = \frac{E_t(800 + 0,60H_m + 0,40H_g)}{100 - E_t}$$
$$R_g = \frac{(R_t - 0,60R_m) \times 100}{40}$$
$$R'_g = \frac{100 \times R_g}{100 - H_g}$$

onde:

R_t = Rendimento total (mistura), sobre matéria tal qual, em % (m/m);

E_t = Extrato total do mosto (mistura), em g/100gramas;

H_m = Humidade do malte, em % (m/m);

H_g = Humidade do griz de milho/cevada, em % (m/m);

R_g = Rendimento do griz de milho/cevada, sobre matéria tal qual, em % (m/m);

R_m = Rendimento do malte, sobre matéria tal qual, em % (m/m);

R'_g = Rendimento do griz de milho/cevada, sobre matéria seca, em % (m/m).

5.1.5 Matérias gordas do griz de milho (Método 6.10 da *Analytica- EBC*)

A avaliação das matérias gordas é um parâmetro importante, uma vez que a gordura afeta a estabilidade da espuma, do aroma e do sabor da cerveja. As matérias gordas são extraídas do griz pelo éter do petróleo, num aparelho de extração do tipo Soxhlet. O solvente é evaporado e o resíduo de gordura é pesado.

O cálculo do teor de matérias gordas do griz, em percentagem sobre matéria seca, é calculado da seguinte forma:

$$M_G = \frac{(P_g - P_c) \times 100 \times 100}{P_a(100 - H_g)}$$

onde:

M_G = Matérias gordas, em % (m/m);

P_g = Peso do copo com o resíduo, em g;

P_c = Peso do copo, em g;

P_a = Peso de amostra de griz, em g;

H_g = Humidade do griz, em % (m/m).

A percentagem recomendada de matérias gordas não deverá exceder o 1%.

5.2 Controlo de qualidade do processo e do produto acabado

Ao longo deste subcapítulo irão ser abordados os processos de controlo de qualidade do processo de produção e do produto acabado, relevantes para a presente dissertação. Durante o processo são avaliados diversos parâmetros no mosto frio, na cerveja em fermentação, em maturação, após filtração e no produto acabado.

Todos os métodos enunciados estão presentes no Manual de Controlo de Qualidade da Super Bock Group.

5.2.1 Características físico-químicas

A análise do teor em álcool, extrato primitivo, extrato aparente, extrato real, densidade, atenuação real limite, atenuação real, pH e cor é realizada simultaneamente pelo aparelho *Alkolyzer Plus Beer Analysis System* da *Anton Paar* (**Fig.24**). Este equipamento efetua análises diretas ao teor em álcool através da espectroscopia NIR, à densidade relativa com recurso a um densitómetro, à cor por espectroscopia ultravioleta-visível a um comprimento de onda de 430 nm, e ao pH através de um eletrodo de pH.



Figura 24 - Alkolyzer Plus Beer Analysis System da Anton Paar, presente no laboratório central nas instalações do Super Bock Group.

As medições dos extratos e das atenuações são feitas de forma indireta, sendo estes resultados obtidos a partir de cálculos, recorrendo aos valores do teor alcoólico e da densidade relativa da amostra. A preparação das amostras consiste em filtração com recurso a filtros de papel pregado. Para amostras não filtradas como é o caso do mosto, da cerveja em fermentação e em maturação, a filtração é auxiliada com *kieselgur*. Após o passo de filtração as amostras são descarbonatadas, exceto as de mosto que não têm CO₂, uma vez que o CO₂ é prejudicial ao aparelho e à leitura.

Os extratos calculados são o primitivo, o aparente e o real, sendo geralmente expressos em graus Plato. O extrato primitivo é uma aproximação da concentração %(m/m) de açúcares no mosto, ou seja, antes da fermentação. O extrato aparente corresponde apenas à medida do teor em açúcar aparente, visto ser calculado diretamente a partir da densidade da cerveja com álcool.

O extrato primitivo é calculado a partir de uma fórmula que correlaciona o teor em álcool da cerveja e o seu teor em açúcar (extrato real), dando uma aproximação precisa de qual seria o teor em açúcar do mosto, antes de se ter iniciado a fermentação.

A partir dos extratos obtidos é possível determinar o grau de atenuação. A atenuação real ou grau de fermentação real é calculada a partir do valor do extrato real e do teor alcoólico.

A atenuação real limite ou fermentabilidade é determinada apenas nas amostras de mosto, e é realizada de acordo com o método 9.7 da *Analytica-EBC*. O princípio do método consiste na inativação das enzimas do mosto com recurso a elevadas temperaturas, com posterior arrefecimento e inoculação com levedura. A fermentação do mosto decorre durante 7 horas, com agitação constante. Após o período de fermentação a mistura é filtrada, descarbonatada e analisada do auto-analisador *Antoon Paar* para a obtenção do extrato.

O extrato inicial é determinado antes do mosto ser fermentado.

A atenuação real limite é calculada da seguinte forma:

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

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

onde:

Aap = Atenuação aparente limite ou fermentabilidade, em %;

E = Extrato do mosto, em g/100 mL;

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

Ar = Atenuação real limite, em %;

5.2.2 Cálcio e Zinco (Método 9.20 e 9.11 *Analytica-EBC*).

O controlo do cálcio e do zinco é fundamental para o processo. Ambos os minerais são essenciais para a levedura. O cálcio por sua vez desempenha um papel essencial para o processo como referido em **2.2.3**.

Estes dois minerais são determinados por espectroscopia de absorção atómica (AAS), através do aparelho *Zeenit AAS 700 BU (Analytikjena)*. O princípio deste método

consiste na medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética a um determinado comprimento de onda, proveniente de uma fonte de radiação primária, por átomos gasosos no estado fundamental. A absorção é específica a cada elemento e, nenhum outro elemento absorve este comprimento de onda. Os dois tipos de atomizadores mais usados em AAS são a chama e o forno de grafite. A espectroscopia de absorção atômica com chama (FAAS) é a técnica mais utilizada para análises elementares em níveis de mg/L.

São preparadas soluções-padrão para cada um dos minerais, com diferentes concentrações, para a construção de uma curva de calibração. De seguida são submetidas as amostras para análise e um conjunto definido de soluções padrão, que servem de controlo. A partir da curva de calibração é possível obter a concentração de zinco e cálcio, através da substituição da absorvância das amostras, pela seguinte equação: $\text{Absorvância} = m[\text{analito}] + b$.

A concentração obtida trata-se do valor diluído, sendo depois necessário corrigir esta concentração mediante o fator de diluição utilizado.

5.2.3 Azoto Aminado Livre (FAN) (Método 8.10 e 9.10 da *Analytica-EBC*)

A avaliação do azoto aminado livre no mosto e na cerveja é de elevada importância, de forma a assegurar a correta fermentação do mosto. O azoto aminado livre representa um importante fator nutricional para as leveduras ao longo da fermentação alcoólica, devido à sua função na síntese de proteínas e transporte de açúcares.

A sua determinação no mosto e na cerveja é realizada por espectrofotometria, através do método 8.10 e o método 9.10 da *Analytica-EBC*, respetivamente.

O princípio deste método consiste no aquecimento da solução a analisar com adição de ninidrina a pH 6,7. A ninidrina é um agente oxidante, responsável pela desaminação oxidativa dos aminoácidos com libertação de amónia (NH₃), resultando em ninidrina reduzida. A amónia formada reage com a molécula de ninidrina formando uma substância de cor azul. Em condições apropriadas, a intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de espécies (aminoácidos, peptídeos ou proteínas). As absorvâncias são lidas a 570 nm, contra água destilada.

Este método permite obter uma estimativa dos ácidos aminados, amoníaco e, em adição grupos de azoto alfa-aminado terminais dos peptídeos e proteínas. A prolina é avaliada parcialmente no comprimento de onda utilizado. De salientar que o método aqui enunciado, não é específico para azoto alfa-aminado uma vez que o ácido γ -aminobutírico, se estiver presente, também reage com a ninidrina.

Procede-se à realização de brancos e à construção da curva de calibração, através de soluções-padrão. As amostras são diluídas, sendo que no caso de a amostra ser cerveja esta é descarbonatada anteriormente à diluição.

O cálculo do teor de FAN na cerveja e no mosto é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{FAN} = \frac{(A_1 - A_3) \times 2 \times d}{(A_2 - A_3)}$$

onde:

FAN = Azoto aminado livre, em mg/L;

A₁ = Absorvência da amostra;

A₂ = Absorvência do padrão;

d = Fator de diluição;

A₃ = Absorvência do branco.

5.2.4 DMS (Método 9.39 da *Analytica-EBC*)

O método utilizado para determinação de DMS consiste na amostragem dos compostos voláteis da cerveja que se encontram na fase de vapor, em equilíbrio no “*headspace*”, contidos num tubo devidamente selado. É realizada a análise por cromatografia gasosa (*Cromatógrafo Varian Star 3400*) onde a mistura é separada nos seus componentes individuais que são detetados por um detetor de ionização de chama (FID). O DMS é determinado em amostras de mosto e a concentração é expressa em $\mu\text{g/L}$, sem casas decimais.

5.2.5 Amargor (Método 9.8 da *Analytica-EBC*)

O amargor presente na cerveja deve-se principalmente à presença de iso- α -ácidos que derivam do lúpulo. As substâncias amargas, essencialmente os iso- α -ácidos são extraídos, do mosto e da cerveja acidificados, pelo iso-octano e avaliadas por espectrofotometria do ultravioleta (275 nm).

O resultado está relacionado com a concentração da mistura de iso- α -ácidos dissolvidos. Uma vez que ao utilizar este método, não é possível determinar os compostos de forma individual, o amargor é descrito em unidades de amargor (UA). A unidade internacional de amargo (do inglês, *International Bitterness Unit*), reflete a quantidade, em miligramas por litro de cerveja, de iso- α -ácidos presentes.

No método utilizado as amostras são em primeiro lugar filtradas e descarbonatadas (com exceção das amostras de mosto). A descarbonatação é feita com adição de pequenas quantidades de álcool octílico, de forma a evitar a formação de espuma e conseqüente perda de compostos de amargo.

São pipetados 10 mL de amostra filtrada para um matraz de 50 mL, com adição de 0,5 mL de ácido clorídrico e 20 mL de iso-octano. A amostra é agitada durante 15 minutos, de forma a permitir a extração dos compostos de amargor. De seguida é deixada a repousar durante 3-5 minutos para a separação das duas camadas. A camada de iso-octano é lida espectrofotometricamente a 275 nm.

O cálculo do valor de amargor é obtido segundo a seguinte fórmula:

$$UA = Abs_{275} \times 50$$

Caso se preveja ou se obtenha um teor > 45 ou a 90 UA diluir a amostra 2 ou 4 vezes, respetivamente.

5.2.6 Dióxido de enxofre (SO₂)

A monitorização do dióxido de enxofre (SO₂) é importante, uma vez que este funciona como antioxidante, aumentando o tempo de validade da cerveja. Contudo, os níveis de SO₂ devem ser acompanhados de perto, porque em elevadas concentrações é considerado um alérgeno.

O procedimento utilizado para a determinação do dióxido de enxofre total na cerveja baseia-se num sistema de análise em fluxo segmentado (Equipamento *Skalar San++*) e consiste, numa prévia acidificação da amostra com ácido sulfúrico e posterior aquecimento a uma temperatura de 90°C de modo a libertar o dióxido de enxofre presente na forma complexada (grupos carbonilo de cetonas e aldeídos). O dióxido de enxofre gasoso formado é então separado por uma membrana de diálise e recolhido numa solução de formaldeído, formando-se o aduto ácido hidroximetanosulfónico que é posteriormente convertido, por reação com o reagente p-rosanilina, num complexo

corado que apresenta um máximo de absorção a 560 nm e cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de dióxido de enxofre total na amostra. É de realçar que na cerveja em fermentação, os níveis elevados de aldeídos são passíveis de originar interferências no método.

5.2.7 Diacetilo e Pentanodiona (Método 9.24.2 do *Analytica–EBC*)

O acompanhamento da redução de diacetilo é importante para definir o final da fermentação secundária. A determinação do diacetilo e da pentanodiona é realizada por cromatografia gasosa (GC) (Fig.25).

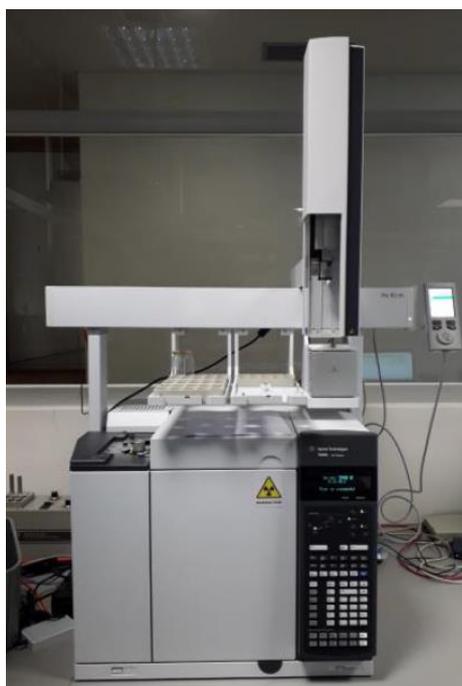


Figura 25 - Equipamento de cromatografia gasosa, presente no laboratório central das instalações do Super Bock Group.

Quando realizada em amostras de fermentação e de maturação é necessário proceder à sua filtração para remover a levedura. As amostras devem ser descarbonatadas antes da análise cromatográfica. A amostra é arejada e aquecida a 60 °C durante 90 minutos para converter os precursores em componentes livres, ou seja, a-acetolactato em diacetilo e o a-aceto-hidroxitirato em pentanodiona.

Após separação na coluna, o diacetilo e a pentanodiona são detetados por um detetor de captura eletrónica onde o gás de transporte é o azoto e a fonte de eletrões (raios β) é o ^{63}Ni . As respostas são padronizadas relativamente a uma cerveja com

adições de diacetilo e 2,3-pentanodiona, como padrão externo. Devido ao aquecimento, as concentrações encontradas não são de diacetilo e pentanodiona livres, mas sim diacetilo e pentanodiona totais. Assim, estabelece-se uma fórmula cujo resultado deve ser chamado dicetonas vicinais totais (“VDK”).

O cromatograma (Fig.26) obtido é o seguinte:

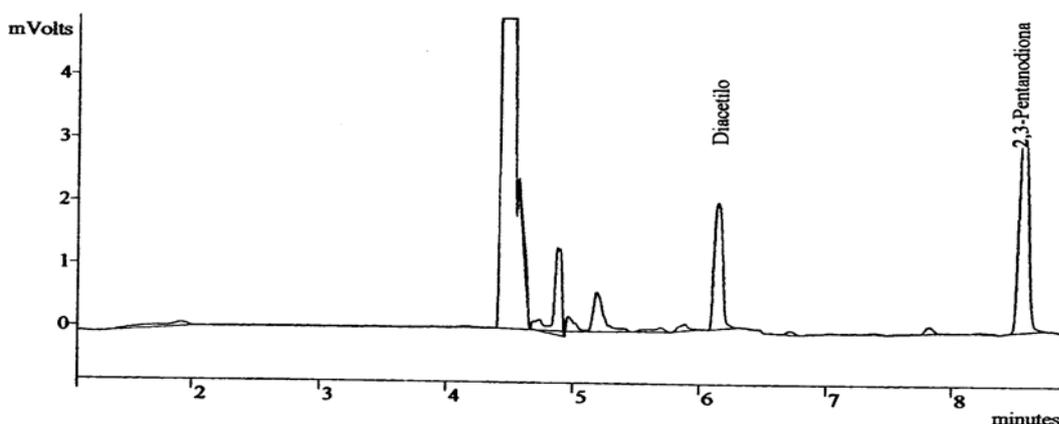


Figura 26- Cromatograma tipo com picos de diacetilo e pentanodiona, obtido através de cromatografia gasosa.

Os teores em diacetilo e 2,3-pentanodiona são obtidos diretamente do sistema de aquisição de dados em mg/L e apresentados com 2 casas decimais.

5.2.8 Contagem de células de levedura

A contagem de células de levedura é realizada ao longo do processo fermentativo como forma de controlo do mesmo (acompanha o aumento e decréscimo de células de levedura em suspensão). A contagem de células é realizada após a propagação e após a recolha de levedura no final da fermentação, de forma contabilizar as células de levedura a ser introduzidas nas fermentações posteriores.

O método de contagem baseia-se no princípio de *Coulter* onde a contagem do número de células é realizada pela deteção e medição de alterações na corrente elétrica (diferença da condutividade elétrica entre as células e o líquido condutor) quando a célula passa numa pequena abertura.

Para isto ser aplicável para a contagem de células, é necessário:

- Um campo elétrico sob um líquido condutor;
- Área de deteção da corrente restrita, de modo a que a presença de partículas nesse local cause uma mudança de corrente detetável;

- Partículas bem dissolvidas no líquido condutor e diluídas suficientemente para que entre uma partícula de cada vez na área de detecção.

O equipamento utilizado é o *Z2 Coulter Particle Count and Size Analyser*, da *Beckam Coulter* (**Fig. 27**). O procedimento passa por diluir a amostra da cerveja em fermentação num líquido condutor fornecido pela marca e proceder à contagem no equipamento. O resultado é apresentado em milhões de células por mililitro.



Figura 27 - Equipamento utilizado para contagem de células de levedura, presente no laboratório central das instalações do Super Bock Group.

5.2.9 Turvação

A turvação da cerveja é realizada no equipamento *LabScat 2, SIGRIST* que possibilita a deteção de partículas na cerveja, especialmente de tamanho inferior a $1\mu\text{m}$.

O equipamento permite a leitura da turvação a 90° , turvação esta especialmente causada por partículas inferiores a $1\mu\text{m}$, e turvação a 25° esta última causada especialmente por células de levedura. O método consiste na transferência da cerveja da garrada/lata para um copo específico e colocação desse copo na câmara do equipamento, que contém água ultra-pura.

A turvação da cerveja é medida em vários contextos de forma a simular situações de manuseamento do produto acabado:

1. Temperatura da cerveja filtrada 20°C : O armazenamento da cerveja realiza-se à temperatura ambiente, desta forma é necessário garantir que a esta temperatura não há formação de turvação.

2. Temperatura da cerveja filtrada 0 °C: A cerveja é mantida num banho a 0 °C durante 24 horas. Este procedimento pretende mimetizar o armazenamento frio que a cerveja sofre antes do seu consumo. O teste permite verificar se durante a diminuição de temperatura não ocorre formação de turvação.
3. Estabilidade Coloidal (Método 9.30 do *Analytica EBC*): A cerveja é mantida numa estufa a 60 °C durante 5 dias sendo posteriormente reduzida a temperatura para 0 °C, na qual permanece durante 24 horas. A turvação é medida a 0 °C. Este método simula o choque térmico que a cerveja pode sofrer quando exposta a temperaturas ambientais elevadas, durante um dado período de tempo, e depois arrefecida para consumo. Permite igualmente simular o estado do produto em fim de validade.



Figura 28- Equipamento utilizado para a leitura da turvação presente no laboratório central das instalações do Super Bock Group.

5.2.10 Estabilidade da espuma (Método 9.42 do *Analytica EBC*)

Cada tipo de cerveja apresenta uma determinada especificação para a estabilidade da espuma, definida pela empresa. A sua determinação é realizada pelo método de NIBEM que consiste na contagem do tempo que determinado volume de espuma demora a abater 10, 20 e 30 mm. O nível de espuma é medido por um sistema de elétrodos móvel que reage sobre a condutibilidade da espuma. A agulha central mais longa encontra-se mergulhada na cerveja, logo que uma das quatro agulhas exteriores toca na espuma, o movimento descendente do elétrodo pára até que o contato, devido ao abatimento da espuma, seja de novo interrompido. O processo de formação de espuma é realizado com o auxílio de um equipamento anexo (*inpack 2000 Sampling*

Device) que fixa a garrafa, fura-a e atravessa-a com um tubo onde é retirada a amostra com incorporação de CO₂. A estabilidade da espuma é testada no produto acabado.



Figura 29 - Aparelho utilizado para a medição da estabilidade de espuma segundo o método NIBEM, presente no laboratório central das instalações do Super Bock Group.

5.2.11 Dióxido de Carbono

A medição do dióxido de carbono realiza-se no produto final e deve corresponder a uma determinada especificação, mediante o tipo de cerveja. A quantificação do teor de CO₂ é realizada com o equipamento *Carbo QC*. O princípio de quantificação baseia-se na determinação de pressão e temperatura do gás após estabelecimento de um equilíbrio entre o CO₂ dissolvido/ CO₂ gasoso ao qual é efetuada a respetiva correção do teor de ar, caso exista. Estes dois valores são diretamente convertidos em concentração de CO₂, com base no algoritmo de cálculo para a cerveja introduzido no equipamento e que relaciona as 3 variáveis (pressão e temperatura versus teor CO₂).

5.2.12 Análise Sensorial

Os métodos de análise sensorial utilizados na presente dissertação estão enunciados em baixo.

Controlo organolético (Método 13.13 do *Analytica EBC*)

Entende-se por controlo organolético o contributo do aroma e gosto de um produto, de forma a estabelecer se o produto está ou não de qualidade satisfatória. A avaliação é realizada, sob circunstâncias controladas, por uma equipa treinada de, no mínimo, 5 pessoas.

A escala utilizada para expressar as diferentes impressões sentidas no aroma e gosto é a seguinte:

+1 = Produto de ótima qualidade

0 = Normal para este tipo de produto

-1 = Com defeitos aceitáveis para este tipo de produto

-2 = Com defeitos não aceitáveis para este tipo de produto

-3 = Com defeitos tão graves que requerem ação imediata

Durante a prova é preenchido, pelos provadores, um boletim onde deverão ser descritas as impressões de aroma e gosto detetadas, especialmente se for atribuída uma pontuação igual ou inferior a -1. Após a sessão é calculada a média para cada amostra.

O resultado é representado da seguinte forma (a partir da média obtida para cada amostra):

- Satisfatória: + 1,0 a - 0,9
- Não suficientemente satisfatória - 1,0 a - 1,4
- Não satisfatória: - 1,5 a - 3,0

Estabilidade organolética (Método 13.10 do *Analytica EBC*)

O método aqui descrito consiste na permanência da cerveja a uma temperatura de 37 °C durante sete dias, seguida de avaliação sensorial. As amostras são analisadas sensorialmente através do controlo organolético, descrito em cima.

Teste Triangular (Método 13.7 do *Analytica EBC*)

O teste triangular consiste na avaliação de duas amostras em três copos (uma delas representada uma só vez e a outra representada duas vezes), com a finalidade de determinar se há ou não diferença significativa entre duas amostras. Este teste deve ser realizado com o maior número possível de provadores (idealmente superior a 10), nunca devendo este número ser inferior a 7.

O resultado é obtido através do somatório das respostas certas, sendo a interpretação dos resultados feita mediante o número de provadores, com recurso à tabela dos níveis de significância (**Tabela A – Anexo**). Assim, consultando a tabela

define-se se há ou não diferença significativa entre as amostras para um determinado nível de significância.

6 Utilização de uma nova variedade de cevada “Sanette”

As matérias-primas utilizadas no fabrico de cerveja deverão permitir às indústrias cervejeiras a obtenção de um produto consistente e de qualidade. Desta forma, as variedades de cevada são selecionadas e aprovadas por comités⁶⁵, em Portugal pela organização Cervejeiros de Portugal, com base nas suas características agronómicas (p.e. rendimento, resistência a pragas e doenças, etc) e nos seus atributos de qualidade (p.e baixo teor em proteína, eficiência de germinação, etc).

A variedade aqui em estudo, Sanette, é uma das variedades recomendadas pelo Comité de Cevada e Maltes dos Cervejeiros de Portugal bem como pelo Comité Francês de Cerveja, Malte e Cevada Maltada (CBMO – *Comité Bière Malt Orge*), estando desta forma atestada como uma variedade de valor agronómico e de qualidade cervejeira comprovada⁶⁶.

A Sanette trata-se de uma cevada dística de primavera e apresenta os parâmetros de qualidade necessários à produção de malte com qualidade cervejeira. Estas características, segundo os Cervejeiros de Portugal⁶⁶, são humidade (<11,5%), teor proteico (10-11% s.m.t.q), calibre > 2,5 mm (<8%), calibre <2,2 mm (>95%) e capacidade germinativa (> 95%).

Posto isto, pretende-se avaliar a utilização do malte obtido, após a maltagem desta variedade, com vista à sua aprovação na produção de cerveja e posterior integração da Sanette no *mix* de maltes utilizados pela empresa.

A avaliação passa por compreender e analisar a performance deste malte ao longo do processo tecnológico do fabrico de cerveja (**Fig.30**).

Análise de Qualidade

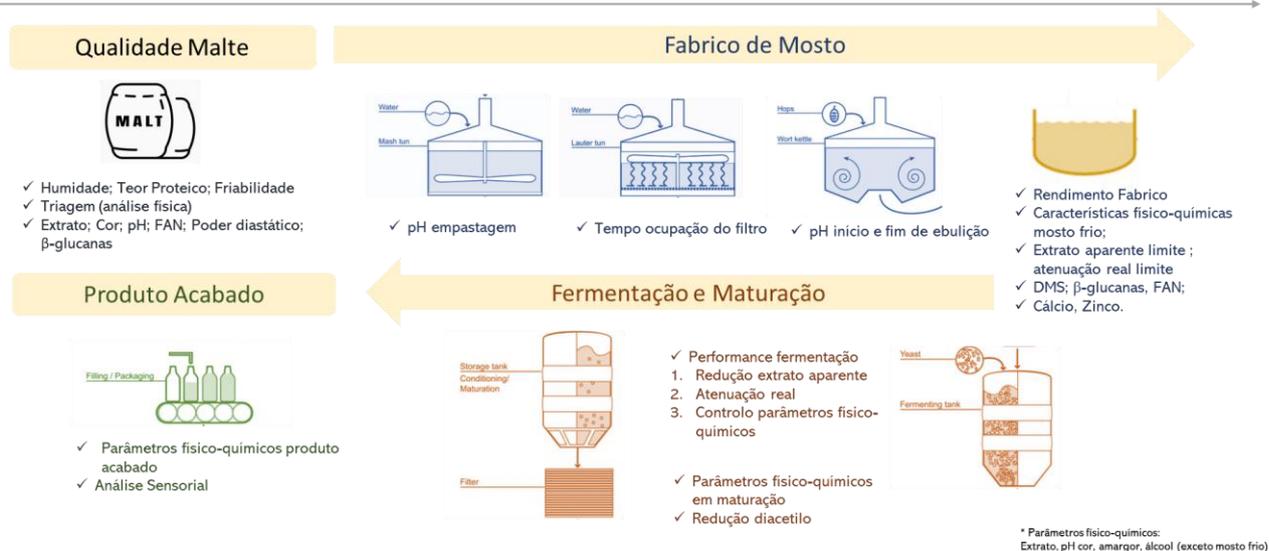


Figura 30 – Avaliação dos diversos parâmetros de qualidade, na utilização do novo malte, ao longo do processo cervejeiro.

6.1.1 Descrição do ensaio industrial

O ensaio industrial para a avaliação da performance do malte Sanette, na produção de cerveja, consistiu na realização de cubas de fermentação denominadas ensaio, onde o malte utilizado foi 100% Sanette, e na realização das respetivas cubas controlo com o malte em uso, no momento do ensaio. Desta forma, temos cubas exatamente com as mesmas condições de fabrico, em que a controlo representa os padrões *standard* no fabrico da cerveja Super Bock e o ensaio a variável a avaliar - malte Sanette.

Para obtenção de um conjunto de dados representativos, foram realizados três pares de cubas – um par de cubas é constituído por uma cuba ensaio (E) e uma cuba controlo (C) - de acordo a seguinte representação esquemática.

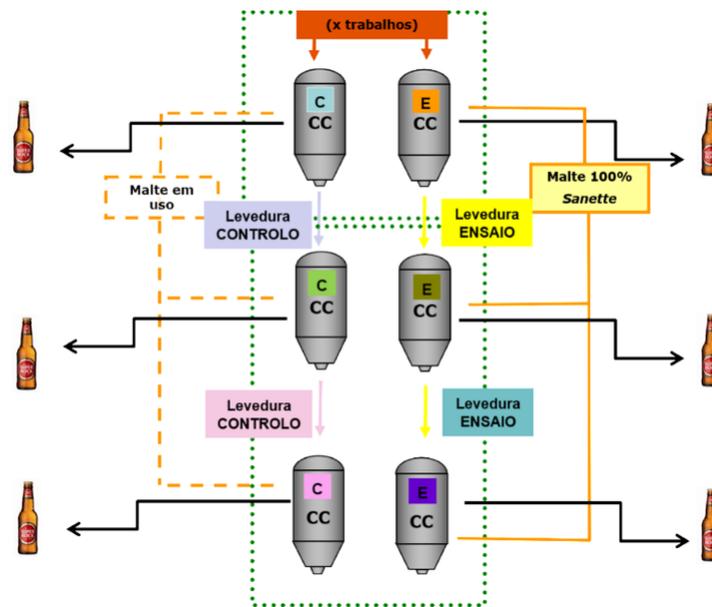


Figura 31 – Descrição esquemática do ensaio industrial.

Nos seguintes ensaios foram fabricados mostos em regime HGB, onde em conjunto com o malte (**Ensaio- 100% Sanette; Controlo – mix de malte em uso**) são utilizados adjuntos como o *gritz* de milho e a cevada. Desta forma, as matérias-primas responsáveis pelo extrato destas cubas são o malte, o *gritz* de milho e a cevada.

Cronologicamente, os ensaios foram iniciados com o primeiro par de cubas, onde se procedeu à inoculação de levedura do mesmo lote em ambas as cubas (ensaio e controlo). A levedura utilizada era de 3ª geração, ou seja, já tinha realizado três fermentações. O procedimento de inoculação com mesmo lote, pretende eliminar a levedura como uma possível variável entre cubas.

O segundo par de cubas só foi iniciado aquando o fim da fermentação primária do primeiro par. Isto deveu-se ao facto de a partir desse momento a levedura recolhida da cuba ensaio 1 ter sido semeada, respetivamente, na cuba ensaio 2. Foi aplicado o mesmo para as cubas controlo. O terceiro par de cubas foi realizado exatamente com o mesmo procedimento. Desta forma, conseguimos acompanhar o efeito da nova variedade ao longo de várias gerações da levedura.

Após maturação e estabilização a frio cerveja, garantiu-se a filtração independente de cada uma das cubas para um tanque de cerveja filtrada (TCF), de onde

partiu para as linhas de enchimento. Nas linhas de enchimento obteve-se o produto final para análise.

6.1.2 Análise de qualidade dos cereais utilizados

Malte ensaio e controlo

As análises internas realizadas aos cereais, foram conduzidas de acordo com os métodos padronizados pela instituição *European Brewery Convention*, descritos na secção **5.1**. Foi realizada uma amostragem por lote sem replicas (n=1).

O lote em avaliação, 100% malte Sanette, foi produzido em Portugal no ano de 2019. As 175 toneladas rececionadas foram encaminhas para um silo independente, que ficou bloqueado até ao final do ensaio de modo a garantir que não ocorresse qualquer mistura com outras variedades de malte, permitindo a veracidade do ensaio. Conjuntamente com o lote de malte, foi rececionado o certificado de análise do fornecedor (**Tabela 3**).

Para o fabrico de mosto das cubas controlo, foram utilizados os maltes em uso (mistura de variedades) nos silos da fábrica, no momento de cada ensaio. Devido ao espaço temporal entre os pares de cubas, não foi possível utilizar o mesmo lote de malte controlo nos diferentes pares. No entanto, o lote de malte controlo 2 e 3 é o mesmo, apenas variando o silo onde foi armazenado (**Fig.32**). A análise das características físico-químicas destes maltes, realizadas por parte do fornecedor encontram-se na **tabela 3**.

Foram realizadas análises internas de controlo de qualidade a todos os lotes de maltes utilizados (**Tabela 4**), sumarizadas na **tabela 2**.

Para o processo cervejeiro um dos parâmetros de qualidade com maior importância é a fermentabilidade do mosto e conseqüentemente o rendimento em extrato. Perante isto é importante avaliar o extrato, o poder diastático, que permite aproximar a potencial fermentabilidade do extrato⁶⁷ e o tempo de sacarificação. Estes valores encontram-se dentro das especificações, para o lote a ensaiar e para os lotes controlo, contudo, o extrato s.m.s contempla valores bastante próximos do limite mínimo (**Tabela 3**).

Estes maltes foram avaliados internamente, através de uma brassagem *standard* (método 5.1.4), que permite determinar o extrato (rendimento) de cada malte, assim como diversos parâmetros: pH, aspeto mosto, tempo de sacarificação, cheiro,

velocidade de filtração, cor. Os valores encontram-se na **tabela 4** e estão de acordo com as especificações estipuladas pela empresa e concordantes com os resultados do fornecedor (**Tabela 3**).

O teor em azoto está ligado à fermentabilidade do mosto, uma vez que é essencial para a nutrição da levedura, às características da espuma e à formação de turvação. Existe uma relação inversa entre o teor de proteína no malte e a quantidade de extrato obtida, sendo que um maior teor em proteína implica uma menor proporção em amido.

Níveis de azoto inferiores a 8%, não fornecem quantidades de enzimas hidrolíticas compatíveis com as necessárias para a obtenção dos valores de extrato alvo. Assim, o azoto total deverá estar entre os 10% e os 11,5% (de forma a minimizar também os problemas de turvação) e o teor solúvel deve-se manter entre os 4-4,5%. Valores de azoto assimilável (FAN) inferiores a 100 mg/L, são considerados limitantes para o correto funcionamento da levedura⁶⁸, com consequências a jusante, como a acumulação de produtos de fermentação indesejados (p.e diacetilo). Outro aspeto importante é o processo tecnológico adotado, como a utilização de adjuntos, que aumentam a necessidade de FAN para valores acima de 120-160 mg/L.

O índice de Kolbach, mede a percentagem de azoto total que foi dissolvida, não devendo exceder os 41-42%. Assim, os valores presentes no certificado (**Tabela 3**) para todos estes parâmetros, estão de acordo com os estipulados para um malte de boa qualidade, compatível com a utilização de adjuntos.

Parâmetros como teor em β -glucanas, viscosidade e filtrabilidade permitem aferir a tendência do malte em demonstrar problemas de filtração e turvação, o que não se verifica para os lotes avaliados (**Tabela 3**).

A humidade, que influencia o rendimento e a estabilidade em armazenamento do malte, apresenta valores perto do limite superior para o lote a ensaio e para os lotes controlo (**Tabela 3**), contudo dentro dos valores indicados pelo EBC (máximo 5%). Estes valores estão concordantes com os obtidos por análise interna (**Tabela 4**).

Por último, na triagem do malte, a percentagem de resíduos está acima do limite superior das especificações para o lote Sanette e para os maltes controlo, por análise interna. Contudo, na **tabela 3**, estes valores encontram-se perto do limite superior. Esta

discrepância de resultados, poderá estar relacionada com os diferentes operadores da análise.

A friabilidade, que determina o grau de modificação dos maltes, apresenta valores perto do alvo o que demonstra a correta modificação destes maltes.

Tabela 3 - Certificado de análise do fornecedor, lote 100% malte Sanette, malte controlo 1,2 e 3.

Lote Malte:	100% Sanette	Controlo 1	Controlo 2-3	Especificações		
Análise	Valor			Min.	Alvo	Máx.
Humidade (%)	5,0	4,8	4,9		4,5	5
Extrato S.M.S (%)	81,4	81,4	81,2	81		
Sacarificação (min)	9,0	9,9	10		10	15
Filtração (min)	2,0	2,0	2,0			
Cor Discos E.B.C	3,8	4,0	3,9		3,2	4
Proteína total (%)	11,30	10,65	11,12	10		11,5
Proteína solúvel (%)	4,40	4,30	4,43	4		4,5
Índice de Kolbach	39,0	40,5	39,8	38		42
Viscosidade (cp)	1,51	1,53	1,53			1,6
pH	6,1	6,12	6,11	5,8		
Poder diastático	317	303	326	250		
F.A.N (mg/100g)	148	142	147	120		
Beta glucanas (mg/L)	131,0	186,0	174,3			200
Homogeneidade (%)	85	81	84	70		
Triagem Crivo > 2,8 mm (%)	71,1	75,8	77,3			
Triagem Crivo > 2,5 mm (%)	20,4	17,1	16,1			
Triagem Crivo > 2,2 mm (%)	7,1	5,8	5,3			
Triagem Crivo (resíduos) (%)	1,4	1,3	1,3			1,5
Friabilidade (%)	88,0	84,0	82,5	80		95
Observações:						
1. Extrato s.m.s "sobre a matéria-seca"						

Tabela 4- Resultados da análise interna dos parâmetros físico-químicos dos lotes de maltes utilizados.

Lote Malte:	100% Sanette	Controlo 1	Controlo 2-3	Especificações		
				Min.	Alvo	Máx.
Análise	Valor			Min.	Alvo	Máx.
pH	6,17	6,09	6,10	5,8		
Humidade (%)	4,4	4,7	4,9			5
Aspeto mosto (Límpido)	Límpido	Límpido	Límpido			
Tempo sacarificação (min)	15	15	15			15
Cheiro (Normal)	Normal	Normal	Normal			
Velocidade filtração (Normal)	Normal	Normal	Normal			
Friabilidade (%)	90	87	86	80		95
Extrato s.m.t.q. (%)	77,3	77,3	77,5			
Extrato s.m.s (%)	80,9	81,0	81,5	81		
Cor mosto (Lovibond)	3,8	3,0	3,5			4
Triagem Crivo > 2,8 mm (%)	72,1	77,9	76,3			
Triagem Crivo > 2,5 mm (%)	17,5	14,7	15,0			
Triagem Crivo 2,5 + 2,8 mm (%)	89,5	92,6	91,3	90		
Triagem Crivo > 2,2 mm (%)	6,7	4,9	5,8			
Triagem Crivo < 2,2 (Resíduos) (%)	2,2	2,1	2,1			1,5
Triagem Grãos partidos	0,6	0,4	0,8			
Observações:						
1. Extrato s.m.t.q “sobre a matéria tal qual” – inclui o teor em humidade						
2. Extrato s.m.s “sobre a matéria-seca”						

Para os parâmetros com especificações estipuladas, o lote ensaio e os lotes controlo apresentam todos resultados dentro dos limites alvo, com a exceção da % de resíduos na análise interna. A análise do malte indica-nos o comportamento teórico deste durante a produção de cerveja, desta forma, não se preveem desvios à normalidade decorrentes do malte.

Gritz de Milho e Cevada

Os adjuntos são uma fonte de amido mais económica. Modificam o carácter da cerveja, tornando-a mais leve e menos encorpada. Diluem os lípidos, polifenóis e proteínas solúveis provenientes do malte dando origem a cervejas menos propensas a problemas de turvação. Não contêm poder diastático, e, portanto, necessitam de fontes externas de amílases ^{69,70}.

Os lotes de *gritz* de milho, devido ao espaço temporal dos ensaios, foram diferentes para cada par de cubas. Contudo, é importante notar que são utilizados os mesmos lotes de adjuntos nas cubas do mesmo par, ou seja, apenas os lotes de malte é que são diferentes entre as cubas controlo e ensaio (**Fig.32**). Devido à menor percentagem de utilização de cevada, o lote foi sempre o mesmo em todos os pares.

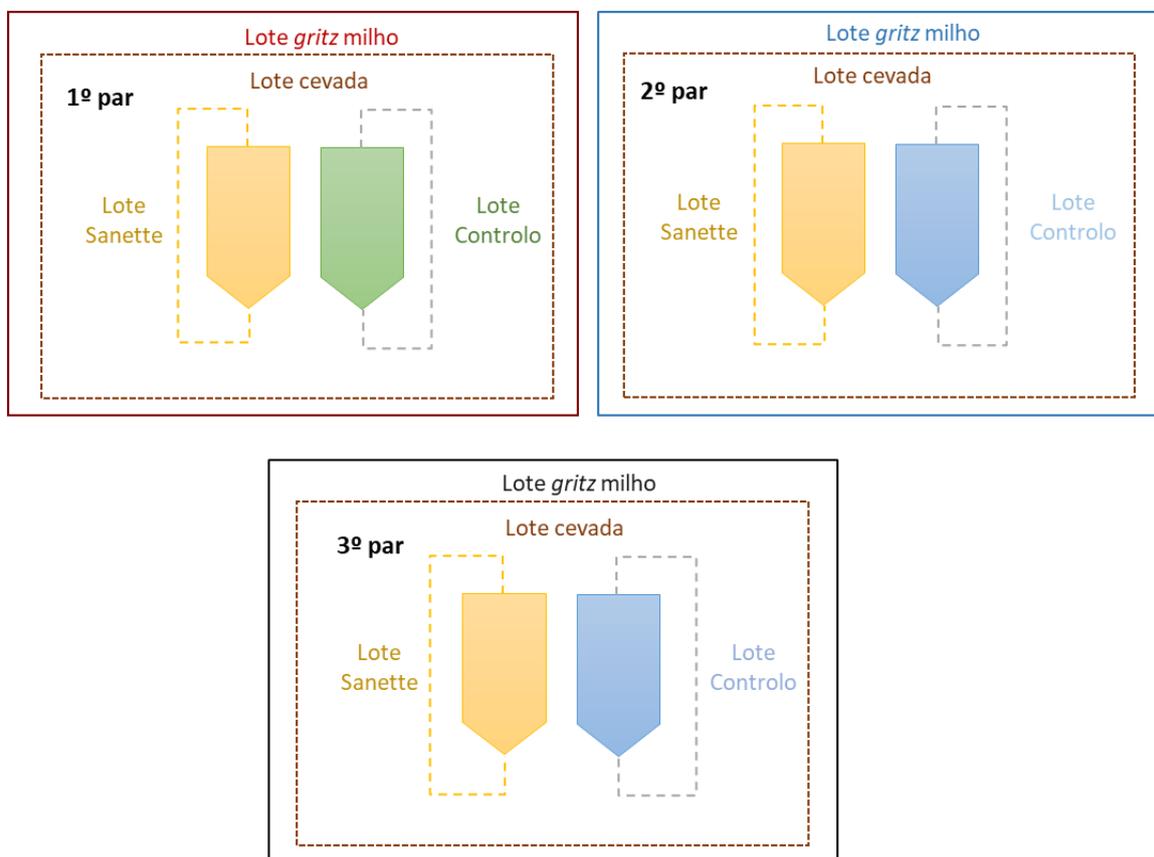


Figura 32 – Esquema de utilização de lotes nos diferentes pares de cubas.

O *gritz* de milho trata-se de milho moído, em que foi removido o embrião rico em lípidos, sendo constituído principalmente pelo endosperma amiláceo. A remoção do embrião é essencial, uma vez que os lípidos afetam negativamente a estabilidade do sabor e da espuma^{69,70}. Assim o teor em gordura deverá ser inferior a 1%².

As exigências necessárias para utilização de *gritz* de milho na indústria cervejeira, além do teor em gordura inferior a 1%, passam por: (1) elevado teor em extrato 87-91%; (2) teor proteico entre 8-9%, que está relacionado com o teor em extrato; (3) humidade < 13% e (4) ausência de impurezas e granulometria adequada.

Os três lotes de *gritz* de milho foram sujeitos a análises internas de rendimento (extrato), humidade, granulometria e matérias-gordas (**Tabela 5**). Os parâmetros referidos anteriormente encontram-se todos dentro das especificações.

Os parâmetros físico-químicos avaliados na cevada são: (1) humidade, de forma a evitar o desenvolvimento de fungos e consequente produção de micotoxinas, com valor recomendado máximo de 14% ; (2) teor em proteína, em que o limite máximo não deverá exceder os 11,5%; (3) triagem, uma vez que grãos de menor tamanho possuem uma percentagem inferior de amido, o que diminui o rendimento em extrato ⁴². Por conseguinte, a percentagem de grãos < 2,2 mm não deverá ser superior a 1,5%.

Relativamente ao lote de cevada utilizado, a percentagem de humidade (11,6%) está dentro das especificações, contudo a percentagem de extrato s.m.s (76,5%) encontra-se no limite inferior. Na análise de triagem, a cevada apresenta valores de acordo com os parâmetros de qualidade, com a exceção da percentagem de grãos com tamanho inferior a 2,2 mm (4%) que estão acima do limite superior (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Resultados da análise interna aos lotes de cevada e *gritz* de milho utilizados nos três pares de cubas.

Lote Cereais:	Cevada	Gritz de milho			Especificações	
	Para todos os pares	1º par	2º par	3º par	Cevada	Gritz Milho
Humidade (%)	11,6	13,1	13,2	12,6	Máx 14	Máx 13
Rendimento s.m.t.q. (%)	67,7	79,1	80,4	81,3		
Rendimento s.m.s (%)	76,5	91,0	92,6	93,0	Min 77	Min 90
Triagem Crivo > 2,8 mm (%)	57,7					
Triagem Crivo > 2,5 mm (%)	29,3					
Triagem Crivo 2,5+2,8 mm (%)	87					
Triagem Crivo > 2,2 mm (%)	7,6					
Triagem Crivo < 2,2 (Resíduos) (%)	4				Máx 1,5	
Triagem Grãos partidos	1,4					
Matérias gordas		-	0,5	0,4		Máx 1
Peneiro 1,250 mm		1	2	1		
Peneiro 1,000 mm		22	29	23		
Peneiro 0,500 mm		57	56	56		
Peneiro 0,250 mm		15	9	14		
Peneiro 0,125 mm		3	2	3		
Peneiro 1,250 mm + Fundo		5	4	5		Máx 5

As matérias-primas utilizadas como adjuntos não apresentam desvios significativos dos valores especificados para nenhum dos parâmetros. Desta forma não se preveem variações relevantes no processo produção de mosto e cerveja causadas por estas.

6.1.3 Controlo do processo de produção de cerveja

As análises internas realizadas nesta secção estão descritas em 5.2 e foram realizadas em três amostras de cada cuba durante a produção de mosto bem como em uma amostra na cerveja filtrada e no produto acabado.

O primeiro passo na produção de cerveja, consiste no fabrico de mosto. Como descrito em 6.1.1, foram realizados três pares de cubas Super Bock em regime HGB. Cada cuba tem a capacidade de 3000 hL, o que significa que para o enchimento da totalidade da cuba é necessário fabricar três vezes o volume máximo de fabricação de mosto (1000 hL) na sala de fabrico.

Ao longo de todos os fabricos, os parâmetros controlados foram o pH da empastagem do malte e do *gritz* de milho, o tempo de ocupação do filtro e o pH de início e fim de ebulição (Fig.33).

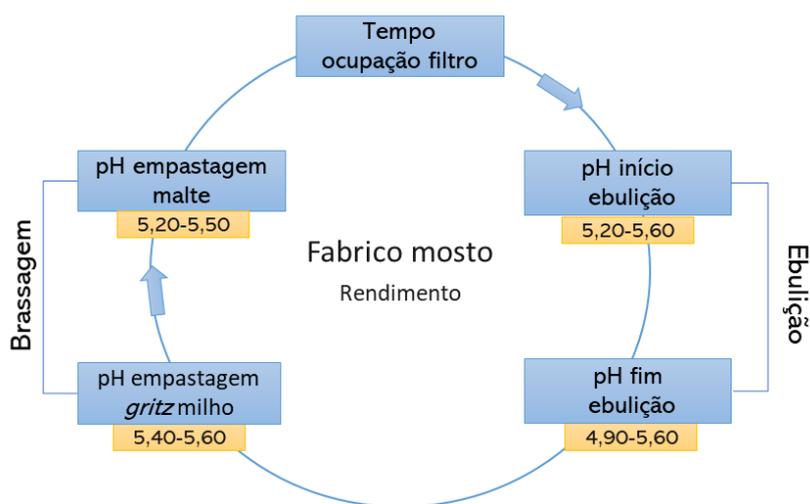


Figura 33 – Esquema dos parâmetros controlados ao longo do processo de fabrico de mosto para o máximo rendimento em extrato.

i. Parâmetros analisados durante a brassagem

Durante a brassagem o pH, a concentração e a temperatura tem efeitos consideráveis na composição dos açúcares e consequentemente na fermentabilidade do mosto. A concentração do mosto (rácio água: cereais) foi a mesma da receita Super

Bock, estando este rácio já devidamente otimizado para o melhor rendimento em termos de extrato. O regime de temperatura/tempo utilizado, têm o objetivo de combinar a temperatura de gelatinização do amido com a máxima atividade enzimática. Estes regimes são controlados de forma automática, para garantir que os patamares pré-definidos para a receita Super Bock sejam cumpridos. Desta forma, estes parâmetros não variaram entre controlo e ensaio.

Os parâmetros que podem ser principalmente afetados pela variedade de malte são o pH⁷¹ e o tempo de ocupação do filtro, devido as características agronómicas do malte e ao seu processamento durante a maltagem⁷².

O pH da empastagem influencia a atividade das enzimas, sendo assim determinante para o rendimento em extrato e para fermentabilidade do mosto⁷³. A gama de pH's utilizada durante a brassagem, deverá situar-se entre 5,4-5,7 de forma a favorecer a ação das amílases. Durante o ensaio, o pH foi medido a 20 °C no passo final de empastagem.

O pH da caldeira da empastagem do *gritz* de milho é ajustado com a adição de cloreto de cálcio. O cloreto de cálcio apresenta dupla função: diminuir o pH da solução e aumentar a estabilidade térmica (cálcio) das enzimas⁷⁰. Este pH pode situar-se entre 5,40-5,80 (enzimas demonstram atividade considerável em ambos os lados do pH ótimo⁷³) sendo o alvo pretendido de 5,60. O alvo está de acordo com o pH ótimo da α -amílase, uma vez que o principal objetivo é a liquefação do amido na caldeira do *gritz* de milho.

Por sua vez, o pH da empastagem do malte é ajustado, principalmente, com a adição de ácido fosfórico, contudo também se procede à adição de cloreto de cálcio. Neste caso, o pH é mantido a um pH intermédio (5,40), ideal para a ação de ambas as amílases (α -amílase 5,60-5,80; β -amílase 5,40-5,50), mas principalmente para a β -amílase^{2, 70}. Tendo em consideração que este ajuste é realizado de igual forma para as cubas controlo e ensaio, é possível verificar a influência do malte na avaliação deste parâmetro.

Os valores de pH medidos, para cada fabrico de mosto, de todas as cubas realizadas encontram-se na **tabela 6**. É possível verificar que os valores de pH estão dentro das especificações. O valor médio (n=3) de pH da empastagem do malte para o ensaio foi de 5,40, com um desvio padrão de 0,07. Este resultado, concordante com o valor alvo, demonstra que o malte em avaliação não introduz diferenças relevantes

neste parâmetro da empastagem. O controlo apresenta valores médios (n=3) para a empastagem do malte de 5,32 com um desvio padrão de 0,05.

A diferença entre ensaio e controlo não é expressiva e pode dever-se à diferença entre os valores de pH de cada malte, presente na **tabela 4** (Sanette - 6,17; Controlo 1 – 6,09; Controlo 2-3 – 6,10) uma vez que o malte Sanette apresenta valores mais elevados.

Os resultados para a empastagem do *gritz* de milho encontram-se dentro das especificações, com valores médios (n=3) para o ensaio de 5,63 ($\sigma=0,08$) e para o controlo 5,64 ($\sigma=0,07$). Assim sendo, estas matérias-primas não introduzem nenhuma diferença considerável, que possa influenciar a interpretação dos resultados para o malte Sanette.

Tabela 6 – Valores de pH da empastagem do malte, do *gritz* de milho e tempo de ocupação do filtro em minutos, com respetiva média e desvio padrão (σ).

Tipo	Par	Empastagem		Tempo ocupação filtro (min)
		Malte	<i>Gritz</i> Milho	
		pH	pH	
Controlo	1	5,29	5,70	110
Controlo		5,26	5,54	110
Controlo		5,27	5,58	105
Ensaio		5,32	5,46	102
Ensaio		5,28	5,70	97
Ensaio		5,41	5,59	110
Controlo	2	5,38	5,72	105
Controlo		5,35	5,68	105
Controlo		5,36	5,56	106
Ensaio		5,43	5,75	101
Ensaio		5,53	5,66	103
Ensaio		5,46	5,66	105
Controlo	3	5,28	5,56	110
Controlo		5,38	5,70	107
Controlo		5,35	5,69	104
Ensaio		5,39	5,63	106
Ensaio		5,37	5,59	105
Ensaio		-	-	105
Controlo	Média	5,32	5,64	106
	σ	0,05	0,07	2,33
Ensaio	Média	5,40	5,63	103
	σ	0,07	0,08	3,42

O tempo de ocupação do filtro foi avaliado de modo a compreender qual o impacto das características do novo malte na filtração. O teor em β -glucanas (131 mg/L)

e a viscosidade (1,50 cp) do malte ensaio são bons indicadores de que o malte não causará problemas durante a filtração. Segundo a literatura para este tipo de filtro (filtro prensa) o tempo máximo reportado é de 120 minutos⁷⁰.

As cubas controlo apresentam um tempo médio de ocupação do filtro (n=3) de 106 minutos com desvio padrão de 2,33. O tempo médio de ocupação (n=3) para as cubas ensaio foi de 103 minutos com desvio padrão de 3,42.

Atendendo ao desvio padrão deste conjunto de dados, constata-se que apresentam uma maior dispersão, comparativamente ao controlo. A maior dispersão dos dados, está relacionada com problemas técnicos que ocorreram no filtro (fuga de mosto) aquando a filtração do primeiro e segundo fabrico da cuba ensaio do 1º par e do primeiro fabrico da cuba ensaio do 2º par, que conseqüentemente apresentam valores atípicos (102, 97 e 101 minutos, respetivamente.)

Contudo, a média de ocupação das cubas ensaio esta concordante com o obtido para as cubas controlo. Assim, o mosto realizado com o malte ensaio não demonstra desvios à normalidade no tempo de ocupação do filtro.

ii. Parâmetros avaliados durante a ebulição do mosto

Durante a ebulição do mosto, procedeu-se à monitorizado do pH de início e fim. A gama de pH a que ocorre a ebulição é fundamental para a correta isomerização dos α -ácidos, por conseguinte, para garantir a isomerização sem extrair demasiados compostos de amargor, o pH de início de ebulição deverá estar entre 5,20-5,60².

O pH de fim de ebulição tem um efeito substancial na clarificação do mosto, sendo o pH recomendado para a máxima precipitação do *trub* de 5,0-5,2^{2,70}.

O pH do mosto diminui aproximadamente 0,3 unidades durante a ebulição, devido à formação de melanoidinas, à precipitação de fosfatos por ação do cálcio, aos ácidos provenientes do lúpulo, e por fim devido à adição de ácido fosfórico no final de ebulição^{70,73}.

Os valores de pH de início e fim de ebulição para todos os pares de cubas encontram-se na **tabela 7**. Os valores médios de pH (n=3) para o início e fim de ebulição das cubas ensaio foram 5,31 ($\sigma= 0,06$) e 5,07 ($\sigma= 0,05$), respetivamente. Relativamente ao controlo, os valores médios para o início e fim foram 5,31 ($\sigma= 0,04$) e 5,07 ($\sigma= 0,03$), respetivamente.

O ensaio e o controlo apresentam valores dentro das especificações estipuladas e próximos do alvo. Não se verificam diferenças entre controlo e ensaio. A redução do pH entre o início e o fim de ebulição está concordante com o descrito na literatura. Desta forma, o malte ensaio não causa alterações dos valores expectáveis de pH durante ebulição.

Tabela 7 – Valores de pH do início e fim de ebulição, com respetiva média e desvio padrão (σ).

Tipo	Par	Ebulição	
		Início	Fim
		pH	pH
Controlo	1	5,25	5,04
Controlo		5,37	5,06
Controlo		5,32	5,02
Ensaio		5,32	5,01
Ensaio		5,25	5,00
Ensaio		5,23	5,06
Controlo	2	5,31	5,09
Controlo		-	5,11
Controlo		5,38	5,13
Ensaio		5,28	5,14
Ensaio		-	5,08
Ensaio		5,40	5,14
Controlo	3	5,29	5,05
Controlo		5,29	5,05
Controlo		5,30	5,05
Ensaio		5,29	5,07
Ensaio		5,31	-
Ensaio		5,38	5,06
Controlo	Média	5,31	5,07
	σ	0,04	0,03
Ensaio	Média	5,31	5,07
	σ	0,06	0,05

iii. Parâmetros físico-químicos do mosto frio

Após a ebulição e decantação do mosto, este foi arrefecido de acordo com a temperatura de inoculação da levedura. Após o seu arrefecimento, foram recolhidas amostras de mosto frio para análises físico-químicas (**Tabela 8**).

Tabela 8- Resultados da análise dos parâmetros físico-químicos do mosto frio, atenuação real limite (ARL) e extrato aparente limite de todos as cubas com respetiva média e desvio padrão (σ).

Tipo	Par	pH	Coloração (EBC)	ARL (%)	Extrato aparente limite % (p/v)
Controlo	1	5,04	13,9	71	2,09
Controlo		5,03	14,6	72	2,09
Controlo		5,07	15,3	71	2,12
Ensaio		5,07	16,1	72	2,07
Ensaio		5,05	14,6	72	1,99
Ensaio		5,06	15,7	72	2,07
Controlo	2	5,05	13,1	71	2,11
Controlo		5,04	13,8	71	2,26
Controlo		5,03	13,7	71	2,31
Ensaio		5,07	14,5	71	2,29
Ensaio		4,98	14,3	71	2,23
Ensaio		5,08	14,9	71	2,26
Controlo	3	5,03	15,0	70	2,41
Controlo		5,03	14,2	71	2,30
Controlo		5,02	14,2	71	2,20
Ensaio		5,04	16,2	71	2,17
Ensaio		5,05	15,6	71	2,30
Ensaio		5,02	16,3	71	2,22
Controlo	Média	5,04	14,20	71	2,21
	σ	0,01	0,64	0,47	0,11
Ensaio	Média	5,05	15,36	71	2,18
	σ	0,03	0,74	0,47	0,10

O pH do mosto frio está de acordo com o verificado no final da ebulição. A cor do mosto, em média (n=3), está dentro das especificações para o controlo (14,20 EBC) e para o ensaio (15,36 EBC). Todavia, o ensaio apresenta uma coloração superior à do controlo.

A cor é influenciada pelas matérias-primas utilizadas, bem como pelo processo de preparação do mosto – temperatura através de reações não enzimáticas e pH sendo que valores mais elevados promovem uma maior extração de compostos de cor⁷⁴.

Posto que, a temperatura foi a mesma para o controlo e para o ensaio e que segundo os resultados de pH, as diferenças não foram relevantes, a diferença verificada na coloração pode ser explicada através da cor original mais elevada dos grãos de malte Sanette (**Tabela 4**). Ainda assim, o malte ensaio não demonstra alterações significativas na cor do mosto, relativamente às especificações estipuladas para esta cerveja.

O mosto só pode ser fermentado pela levedura, até um determinado limite (atenuação real limite), após o qual a levedura flocula. Considera-se que a atenuação pode ser influenciada por fatores como: variedade, processo de maltagem do malte, parâmetros utilizados durante a brassagem e estirpe de levedura utilizada^{75,76}. Assim, garantindo que a levedura inoculada é mesma entre ensaio e controlo, este fator é eliminado, permitindo aferir a influência do malte neste parâmetro. O extrato aparente limite, indica a quantidade de extrato que não é passível de ser utilizada pela levedura para a produção de determinada cerveja.

Os valores médios (n=3) de atenuação real limite e de extrato aparente limite para o ensaio e o controlo foram iguais, o que indica que a variedade se adequa ao fabrico deste tipo de mosto.

Cálcio, Zinco, FAN e DMS

O mosto trata-se de um meio fermentativo complexo constituído por açúcares, dextrinas, compostos azotados, vitaminas, iões, sais minerais de entre outros compostos.

Durante a germinação da cevada é formando o precursor inativo do sulfureto de dimetilo (DMS), sendo a quantidade deste precursor dependente da variedade de cevada^{2,77}. O DMS devido à sua volatilidade é perdido durante a ebulição do mosto. Uma vez que a concentração deste composto é dependente da variedade de cevada procedeu-se à sua determinação no mosto frio. Os valores de DMS para controlo e ensaio (**tabela 9**), estão dentro dos valores especificados pela empresa, e de acordo com a concentração máxima reportada na literatura (50-61 µg/L)⁷⁷. Em razão disso, concluiu-se que a contribuição de DMS do malte Sanette é semelhante à dos maltes controlo, não sendo espectável a sua perceção como *off-flavour* no produto acabado.

Por sua vez, o ião cálcio desempenha um papel preponderante ao longo de toda a produção de mosto – controlo do pH, proteção térmica das enzimas – no entanto, é

igualmente importante para a fermentação e floculação da levedura^{2,70}. O cálcio presente no mosto deriva das matérias-primas, embora nesta receita ocorra a suplementação exógena de cálcio, na forma de cloreto de cálcio. Tendo em consideração que quantidade adicionada de cloreto de cálcio foi a mesma entre controlo e ensaio, é possível verificar se a variedade Sanette tem efeitos neste parâmetro. Tendo em consideração que os valores de cálcio não apresentam diferenças consideráveis entre si, estando dentro dos valores estipulados para este tipo de mosto, concluímos que o malte Sanette não tem efeitos neste parâmetro que possam comprometer o processo.

A concentração de zinco no mosto é dependente das matérias-primas utilizadas e da tipologia de produção de mosto. Este ião é conhecido pelo papel crítico na performance fermentativa da levedura e não deve ser inferior a 0,1 mg/L (fermentação incompleta)⁷⁷. Como os parâmetros de produção de mosto foram as mesmas, entre controlo e ensaio, pretende-se depreender a influência do malte Sanette na concentração de zinco no mosto. Mediante os resultados obtidos (**tabela 9**), não são evidentes diferenças relevantes entre controlo e ensaio, o que significa que a contribuição do malte Sanette em zinco se assemelha aos maltes controlo. Como os resultados não foram inferiores a 0,1 mg/L, não são esperadas perturbações na performance da levedura.

Por fim, os compostos azotados são essenciais para o crescimento da levedura e consequentemente para a fermentação. O azoto aminado livre (FAN) é imprescindível para uma fermentação rápida e completa (atenuação). Desta forma, o FAN é utilizado como um indicador para prever o crescimento saudável da levedura, eficiência fermentativa, qualidade e estabilidade da cerveja⁷⁸. O FAN surge da degradação proteica das matérias-primas e é influenciado pelo rácio malte/adjunto, brassagem, variedade e condições de maltagem do malte⁷⁸. Como o rácio malte/adjunto e o programa de brassagem foram iguais entre controlo e ensaio, o FAN no mosto foi determinado de forma a compreender se a nova variedade de cevada introduz variações consideráveis na concentração deste parâmetro. Analisando os resultados presentes na **tabela 9**, a concentração de azoto aminado livre, é em média (n=3) superior nos mostos produzidos com o malte ensaio. Contudo, os valores são semelhantes entre controlo e ensaio, e estão de acordo com as especificações internas bem como o descrito na literatura (220-

250 ppm)². Assim, o mosto ensaio garante a concentração óptima destes compostos, não sendo expectável irregularidades durante o decurso da fermentação.

Tabela 9 -Resultados DMS, cálcio, zinco e azoto aminado livre (FAN) no mosto frio, com respetiva média e desvio padrão (σ).

Tipo	Par	DMS ($\mu\text{g/L}$)	Cálcio (mg/L)	Zinco (mg/L)	FAN (mg/L)
Controlo	1	30	42,90	0,22	225
Controlo		31	52,80	0,39	231
Controlo		46	50,50	0,28	234
Ensaio		31	52,00	0,27	246
Ensaio		32	57,00	0,30	245
Ensaio		21	48,80	0,29	241
Controlo	2	33	48,10	0,29	220
Controlo		31	56,40	0,33	228
Controlo		30	55,69	0,36	231
Ensaio		29	46,55	0,32	235
Ensaio		20	50,48	0,37	225
Ensaio		31	-	-	241
Controlo	3	-	60,80	0,30	219
Controlo		-	60,80	0,36	226
Controlo		-	60,15	0,46	238
Ensaio		-	49,28	0,34	249
Ensaio		-	51,21	0,44	243
Ensaio		-	47,93	0,29	245
Controlo	Média	33,50	54,24	0,33	228,00
	σ	5,68	5,87	0,07	5,89
Ensaio	Média	27,33	50,41	0,33	241,11
	σ	4,92	2,99	0,05	6,81

iv. Rendimento

O rendimento pode ser influenciado pelos seguintes fatores: temperatura, tempo, pH, poder diastático, moagem do malte, rácio água: malte. O rendimento não deve ser menor que 100%, caso se verifique, é uma indicação de que algum dos parâmetros enunciados anteriormente está abaixo do seu valor ótimo⁷⁹.

O rendimento pode ser superior a 100%, uma vez que na produção industrial há a utilização de auxiliares tecnológicos o que pode tornar o extrato real superior ao teórico.

Pretende-se compreender se a utilização da nova variedade de malte, tem impacto no rendimento da sala de fabrico do mosto, garantindo que todos os fatores exógenos ao malte se mantêm constantes.

O rendimento da sala de fabrico foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Extrato real (kg)}}{\text{Extrato teórico (kg)}} \times 100$$

Para o cálculo do rendimento é necessário o valor de extrato real, que resulta do produto entre o extrato % (p/v) de cada fabrico com o respetivo volume (hL):

$$\text{Extrato Real (kg)} = \frac{\text{Extrato } \left(\% \frac{p}{v}\right) \times V. \text{ fabrico (hL)}}{1 \text{ hL}}$$

Assim como o extrato teórico, que foi calculado através da soma da contribuição do extrato teórico de cada cereal utilizado no fabrico do mosto:

$$\text{Extrato Teórico (kg)} = \frac{\text{Rendimento s. m. t. q } \left(\% \frac{p}{p}\right) \times \text{Volume (kg)}}{100 \text{ kg}}$$

O rendimento de cada cuba, foi determinado através da média dos rendimentos dos três fabricos (n=3) enviados para essa mesma cuba (**Tabela 10**).

Em média, os rendimentos verificados para as cubas controlo e ensaio não são inferiores a 100%, o que demonstra que os parâmetros utilizados para a recuperação de extrato se situam nos seus valores ótimos. O rendimento médio obtido para o ensaio foi de 100% ($\sigma=0,021$), que foi semelhante ao obtido para o controlo (100% ($\sigma=0,003$)), constatando-se que o malte Sanette não impacta negativamente o rendimento da sala de fabrico.

Tabela 10- Percentagem do rendimento de todas as cubas ensaio e controlo e respetiva média e desvio padrão (σ).

Tipo	Par	% Rendimento
Controlo	1	101%
Ensaio		98%
Controlo	2	100%
Ensaio		100%
Controlo	3	100%
Ensaio		102%
Controlo	Média	100%
	σ	0,003
Ensaio	Média	100%
	σ	0,021

No entanto, como referido anteriormente, durante a filtração dos fabricos das cubas ensaio do 1º e 2º par ocorreu fuga de mosto. Este problema técnico, tem implicações no rendimento, o que se verificou na cuba ensaio do 1º par (98%). Na cuba ensaio do 2º par, as implicações não foram perceptíveis no rendimento, uma vez que a fuga aconteceu apenas num dos fabricos e o problema foi resolvido de forma mais célere.

v. Acompanhamento Fermentação

Avaliação levedura inoculada

Na produção industrial de Super Bock, após o término da fermentação primária, a levedura é recolhida, armazenada em tanques de *stockagem* – a temperaturas baixas de forma a reduzir a atividade metabólica – sendo posteriormente semeada numa nova cuba de fermentação. O número de vezes que a levedura pode ser semeada - número de trabalhos - é limitada, não devendo exceder os 8 (VIII).

Anteriormente à sementeira da levedura, são realizadas análises para determinar a sua qualidade (viabilidade) e o seu estado de contaminação microbiológica. Os resultados destes parâmetros estão presentes na **tabela 11**.

As leveduras inoculadas não exibem contaminação microbiológica e a percentagem de células mortas não excede os 15%, o que confirma a sua viabilidade para as fermentações subsequentes. A viabilidade é um parâmetro importante, uma vez que tem influência direta na performance da levedura (atenuação, rapidez da fermentação).

A levedura utilizada no controlo e ensaio do 1º par, foi a mesma, eliminando-a assim como uma variável entre cubas. A partir deste momento, a levedura foi recolhida e semeada de acordo com o tipo de mosto, de forma a avaliar o efeito do malte nas características da levedura.

Tabela 11 – Resultados da análise de viabilidade e do estado microbiológico das leveduras utilizadas.

Par	1º	2º		3º	
Tipo Levedura	Controlo Ensaio	Controlo	Ensaio	Controlo	Ensaio
% Células Mortas (máx 15%)	12	5	7	4	6
Contagem de células (10 ⁶ /mL)	1759	1829	1829	2243	2035
Contagem - Bactérias do mosto	0	0	0	0	0
Contagem - Bactérias Lácticas	0	0	0	0	0
Trabalhos da Levedura	III	IV		V	

Analisando os resultados para os diferentes tipos de mosto (Controlo/Ensaio), conclui-se que o malte não tem influência nas características avaliadas. Deste modo, o malte Sanette providencia os nutrientes e os minerais necessários para o correto funcionamento da levedura. Como resultado, as fermentações das diferentes cubas, analisadas em seguida, ocorreram sem desvios à normalidade.

Parâmetros avaliados no decurso da fermentação

A escolha das matérias-primas tem um impacto considerável na fermentação e no produto final. O extrato resultante dos cereais é o principal responsável pelo fornecimento de açúcares e compostos azotados para o processo fermentativo, influenciando diretamente a concentração final de etanol e o desenvolvimento de aromas e sabores⁵⁶.

O acompanhamento da fermentação foi realizado através de amostras diárias para a medição de álcool %(v/v), pH, cor, extrato aparente ($^{\circ}P$), contagem de células e diacetilo. Quando a redução do extrato aparente é inferior a 0,1 $^{\circ}P$ dá-se como finalizada a fermentação primária.

O final do período de maturação é ditado pela concentração de diacetilo inferior a 0,1 mg/L, entrando de seguida na fase de estabilização a frio^{2,70}.

A fermentação primária é caracterizada pela redução do extrato aparente, devido à multiplicação das células de levedura e ao consumo dos açúcares do mosto para a produção de etanol (**Fig.34**). O final da fermentação (redução extrato < 0,1 $^{\circ}P$) verifica-se entre as 130 e as 160 horas o que está dentro do expectável para este tipo de fermentação.

Como se pode verificar pela **figura 34**, a redução de extrato e a produção de álcool apresentam perfis semelhantes entre controlo e ensaio. A contagem de células em suspensão, permite verificar a concentração de levedura inoculada e a sua evolução em termos de número de células ao longo da fermentação. A levedura apresenta uma fase de adaptação, nas primeiras 12 horas entre a inoculação no mosto e o aparecimento de atividade fermentativa. Posteriormente decorre a fase exponencial, entre as 20 e 60 horas de fermentação, onde a população de células aumenta devido ao excesso de substrato. Por fim, as células entram gradualmente na fase estacionária, à medida que a concentração de açúcares vai diminuindo. Verifica-se aqui uma

diminuição das células em suspensão (após as 60 horas) que é coincidente com a redução da maior parcela do extrato aparente, desta forma a menor disponibilidade de substrato causa a sedimentação e floculação de uma percentagem das células presentes.

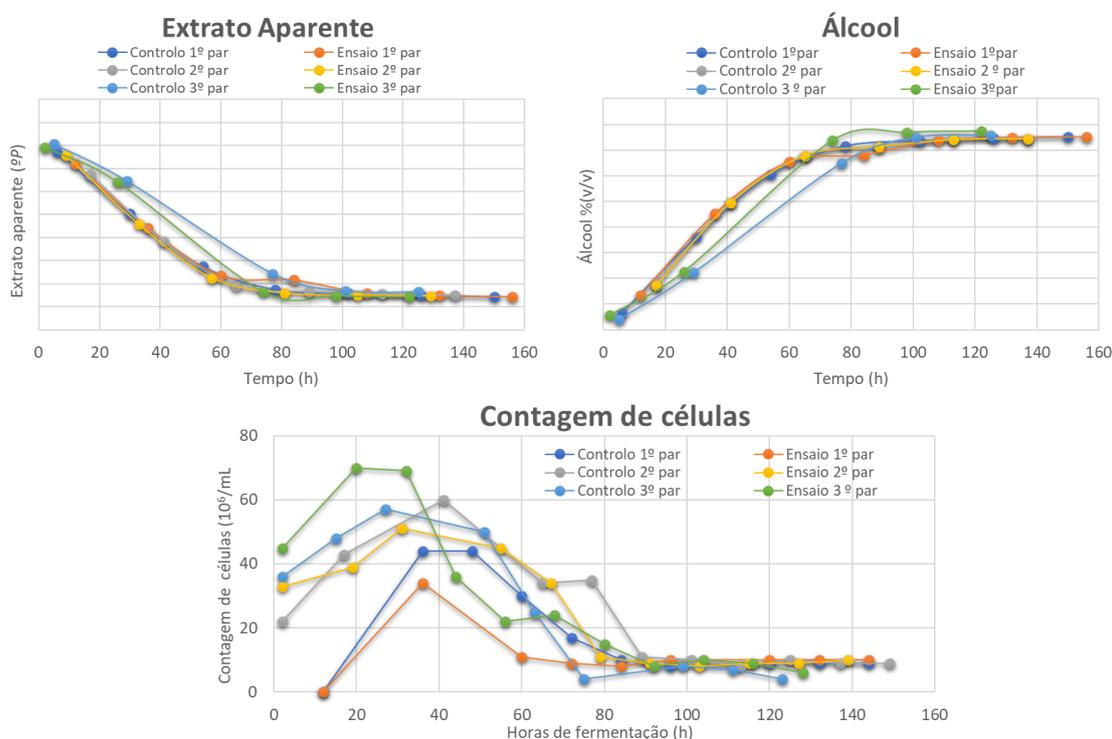


Figura 34 - Acompanhamento fermentativo através da redução do extrato aparente (°P), produção de álcool %(v/v) e contagem do número de células em suspensão (milhões/mL).

O perfil de redução do extrato aparente e de produção de álcool, em conjunto com a concentração de células em suspensão ao longo do tempo, não exibem diferenças relevantes entre controlo e ensaio. Por conseguinte, o malte em avaliação não introduz alterações na duração e no processo fermentativo.

Durante a fermentação constata-se uma redução dos valores de pH (**Fig.35**). O pH diminui no início da fermentação, em consequência da produção de ácidos orgânicos e do consumo de compostos com efeito tampão (aminoácidos básicos e fosfatos). O pH durante a fermentação é dependente de três fatores: pH do mosto, concentração de compostos tampão e concentração de levedura durante a fermentação²⁷. Valores de pH mais baixos verificam-se quanto menor for o pH do mosto e a quantidade de compostos tampão, e maior for a quantidade de levedura. É expectável que o pH diminuía (mínimo 3,8) imediatamente antes de aumentar de forma ligeira no final da fermentação²⁷.

Analisando a **figura 35** verifica-se uma diminuição do pH concordante com o expectável, não tendo sido detetadas diferenças expressivas entre controlo e ensaio. Posto isto, as propriedades do mosto realizado a partir do malte Sanette, não alteram a evolução esperada do pH para este tipo de fermentação.

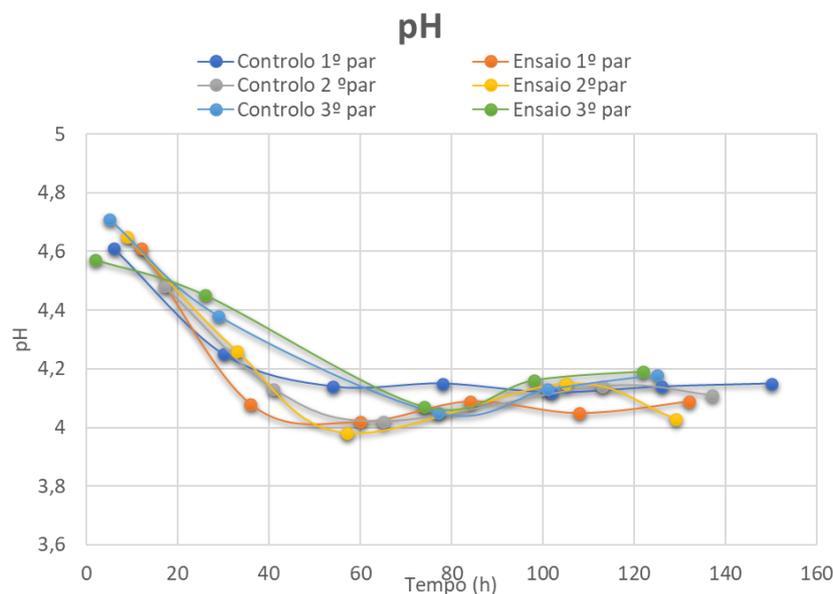


Figura 35 – Evolução do pH ao longo da fermentação primária.

O precursor do diacetilo, α -acetolactato, é produzido pela levedura durante a síntese dos aminoácidos valina e leucina, necessários à síntese proteica. Uma parte deste precursor é excretado para o meio extracelular, sendo convertido por reações não enzimáticas em diacetilo – passo limitante, sendo este acelerado por temperaturas mais elevadas e pH's mais baixos. Durante a fase estacionária, o diacetilo do meio é absorvido e reduzido enzimaticamente em acetoina e posteriormente em 2,3-butanodiol que apresenta um limite de deteção mais alto ⁸⁰.

Os níveis produzidos de diacetilo estão ligados à concentração de aminoácidos (valina) disponíveis no mosto, às condições de temperatura e pH durante a fermentação e consequentemente ao estado fisiológico da levedura. As condições de temperatura e pH foram as mesmas entre controlo e ensaio e o estado fisiológico da levedura (**tabela 11**) não apresenta alterações que se possam correlacionar negativamente com a produção excessiva do precursor ou com a remoção incompleta do diacetilo do meio. Contudo, para que as conclusões acerca da influência do malte, pudessem ser o mais

clarividentes possível, a concentração de levedura semeada deveria ser semelhante entre cubas. Tal não aconteceu, não obstante, a redução do diacetilo ocorreu dentro da normalidade (**Fig.37**).

Analisando o **gráfico 36**, o pico de diacetilo, para cada cuba de fermentação, verifica-se nas primeiras 60 horas. As curvas ensaio, regra geral, apresentam picos de maior concentração com a exceção do controlo do 2º par (linha cinzenta). No entanto, esta diferença nas concentrações iniciais de diacetilo, não deve ser atribuída ao tipo de malte, uma vez que as quantidades de levedura semeadas variaram entre cubas. Desta forma não podemos tirar conclusões sobre a influência do malte no valor máximo de diacetilo produzido.

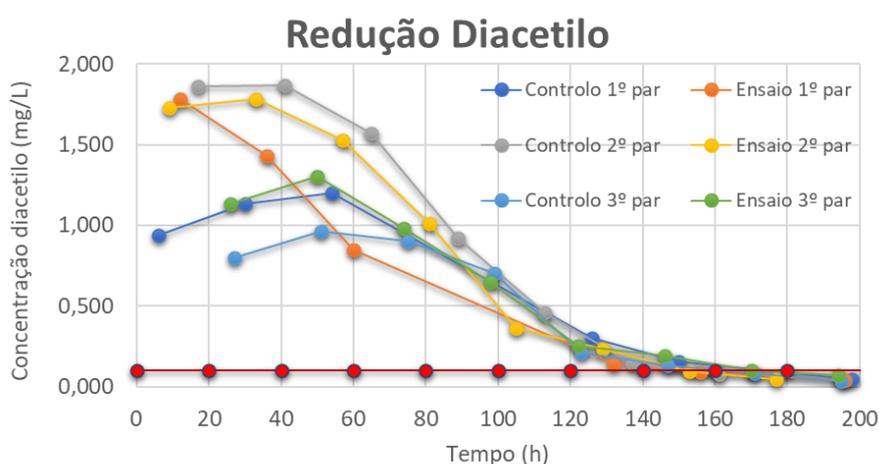


Figura 36 – Gráfico de redução do diacetilo (mg/L).

Observando a redução de diacetilo e sendo este o parâmetro de maior importância durante a maturação da cerveja, é possível constatar que ao fim de 200 horas (8 dias) as concentrações de diacetilo são inferiores a 0,100 mg/L, para todas as cubas. Deste modo, o malte a avaliar não afeta a duração (entre a 7 e 9 dias⁷⁰) nem a correta eliminação do diacetilo. As concentrações iniciais de diacetilo mais elevadas, para as cubas controlo 2º par e ensaio 1 e 2º par, parecem não interferir na redução do diacetilo.

Em suma, os parâmetros avaliados ao longo da fermentação, não demonstram alterações relevantes entre controlo e ensaio, o que revela que o malte Sanette não introduz variações no normal perfil de fermentação.

vi. Cerveja Filtrada

As cubas após a estabilização a frio, foram filtradas de forma independente e sob as mesmas condições, para tanques de cerveja filtrada (TCF). As especificações de extrato % (p/p), álcool % (v/v), pH e cor, para a cerveja filtrada estão de acordo com as especificações. Contudo, o parâmetro de turvação a 20 °C, que é um indicador de turvação permanente e deve ser no máximo de 0,8 EBC, exibiu valores de 1,2 e 1 EBC para o controlo e ensaio, respetivamente, do 1º par. Estes resultados, não são concordantes com os verificados para os restantes pares, e não podem ser devido à matéria-prima em avaliação, uma vez que é o controlo que demonstra turvação mais elevada. Este desvio nos valores de turvação, não está assim relacionado com o ensaio, podendo ter sido causado por problemas ao longo do processo tecnológico (decantação, estabilização a frio, filtração).

vii. Produto Acabado

A qualidade da cerveja é afetada principalmente por dois fatores: (1) estirpe de levedura e (2) materiais provenientes do mosto que passam para a cerveja, sem serem afetados pela levedura. A maioria dos aspetos de qualidade da cerveja, quer positivos ou negativos, são uma consequência direta do tipo de mosto e, portanto, das matérias-primas que o compõe. A cor da cerveja é de uma forma geral, estabelecida durante o processo de fabrico de mosto, ou mais precocemente, através da formação de melanoidinas na fase de secagem do malte. A estabilidade coloidal é amplamente estabelecida a montante da fermentação, em termos de concentração de determinados compostos como polipéptidos, polifenóis, β -glucanas, oxalato de cálcio de entre outros. Por sua vez, a espuma é uma consequência primária de polipéptidos anfipáticos que derivam dos cereais e do lúpulo.

Finalmente, uma proporção considerável de compostos de aroma e sabor provêm do mosto⁸¹. Por exemplo, mostos com excesso de açúcares simples, que não são completamente fermentados, dão origem a cervejas mais doces, assim como as dextrinas contribuem para o corpo da cerveja⁸². No que lhe diz respeito, a levedura é responsável pela produção de etanol, dióxido de carbono e um amplo espetro de compostos de aroma e sabor (ésteres, álcoois superiores, aldeídos, ácidos orgânicos),

sendo percentagem presente destes compostos, igualmente dependente da composição do mosto.

O produto acabado foi avaliado em termos físico-químicos, de forma a depreender se existem desvios nas características do produto final, entre controlo e ensaio. Os valores encontram-se apresentados na **tabela 12**, sendo concordantes com as especificações para este tipo de cerveja. Não se verificam diferenças expressivas, entre controlo e ensaio, concluindo-se que o malte Sanette não altera as características físico químicas finais da cerveja. Desta forma, pode ser incorporado no *mix* de maltes utilizados para a produção de Super Bock, uma vez que permite manter a uniformidade do produto acabado.

Tabela 12 – Resultados da análise das características físico-químicas do produto final.

Par Tipo	1º		2º		3º		Média	
	Controlo	Ensaio	Controlo	Ensaio	Controlo	Ensaio	Controlo	Ensaio
Extrato Primitivo (p/p) % P [10,70-11,00]	10,83	10,85	10,79	10,84	10,80	10,77	10,81	10,82
Extrato Primitivo % (p/v)	11,28	11,31	11,23	11,29	11,24	11,21	11,27	11,27
Álcool % (p/p)	3,79	3,79	3,76	3,81	3,7	3,79	3,80	3,80
Álcool % (v/v) [4,70-5,20]	4,83	4,83	4,79	4,85	4,72	4,82	4,78	4,83
Extrato Real % P	3,43	3,46	3,45	3,42	3,57	3,38	3,48	3,42
Extrato Aparente %P	1,67	1,7	1,7	1,65	1,85	1,62	1,74	1,66
Atenuação Real (%) [67-73]	70	69	69	70	68	70	69	70
pH [4,00-4,40]	4,20	4,11	4,16	4,15	4,18	4,18	4,18	4,15
Coloração (EBC) [7,0-9,0]	8,0	7,9	7,2	7,8	7,8	8,2	7,6	7,9
Estabilidade de Espuma (seg) [Min. 235]	-	258	253	261	261	269	257	262
Amargor (U.A [14-18])	15	15	16	16	18	17	16	16
Turvação a 20 °C [Máx.0,70]	0,64	0,59	0,49	0,46	0,41	0,38	0,51	0,48
Turvação a 0 °C [Máx.0,70]	0,52	0,55	0,53	0,44	0,46	0,41	0,50	0,47
Turvação Total 60 °C 5d/1 [Máx.3,3]	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,30	0,37
CO2 (g/L) [5-5,6]	5,4	5,2	5,3	5,4	5,3	5,4	5,3	5,3
SO2 Total (mg/L) [6-10]	7	7	8	7	9	8	8	7

A consistência das características organolépticas (sabor, aroma, odor e textura) da cerveja é de grande importância para o reconhecimento de uma determinada marca. Estas características são fruto de uma complexa mistura de compostos, que por sua vez são grandemente influenciados pelas matérias-primas utilizadas⁸³. Desta forma, as

cervejas obtidas utilizando o malte Sanette foram sujeitas a análise sensorial tendo o controlo como base de comparação.

O teste triangular é um dos métodos utilizados na avaliação sensorial da cerveja. Como o próprio nome indica, o teste triangular baseia-se na comparação de três amostras separadas. Como regra geral, duas dessas amostras são iguais, enquanto uma terceira é ligeiramente diferente, as amostras são analisadas através de um teste cego, de forma a determinar diferenças sensoriais (inespecíficas) entre dois produtos. Este teste é utilizado quando a indústria cervejeira ajusta o processo ou os ingredientes utilizados para produzir uma das suas cervejas. O objetivo é determinar se há uma diferença detetável no produto final por conta dessas variações.

Foram realizados testes triangulares para todos os pares de cubas (**Tabela 13**). O número de provadores nunca foi inferior a 10, o que de acordo com a tabela presente no **Anexo A** quer dizer que para as amostras serem significativamente diferentes sete ou mais provadores teriam de detetar a amostra díspar. Tal não se verificou, e, portanto, conclui-se que não existem diferenças significativas entre controlo e ensaio.

Tabela 13 - Resultados da análise sensorial ao produto acabado.

Análise Sensorial						
Par Tipo	1º		2º		3º	
	Controlo	Ensaio	Controlo	Ensaio	Controlo	Ensaio
Teste Triangular – Resultados (Nível de significância 95%)	Nº total de provadores 12. 4 identificaram a amostra diferente.		Nº total de provadores 11. 2 identificaram a amostra diferente.		Nº total de provadores 11. 2 identificaram a amostra diferente.	
Teste Triangular - Conclusão	Não existe diferença significativa entre controlo e ensaio.		Não existe diferença significativa entre controlo e ensaio.		Não existe diferença significativa entre controlo e ensaio.	
Controlo organolético	S	S	S	S	S	S
Estabilidade organolética	S	S	S	S	S	S
Legenda: S - Satisfatório; NC – Não satisfatório						

O controlo organolético realiza-se no produto fresco e pretende estabelecer se este está ou não de qualidade satisfatória. Os resultados, **tabela 13**, determinam a qualidade do produto final ensaio como satisfatória.

A composição química da cerveja trata-se de um sistema dinâmico e altera-se ao longo do armazenamento⁸³. Estudos demonstram que a variedade de cevada não tem impactos negativos nas características sensoriais do produto fresco, no entanto o mesmo não se verificou quando a cerveja foi sujeita a testes de estabilidade organolética

⁸⁴. Assim, o teste de estabilidade organolética tem como objetivo forçar o envelhecimento da cerveja (7 dias a 37 °C) de forma a verificar se a variedade em teste, tem influência na estabilidade e conseqüentemente no prazo de validade da cerveja.

Mediante os resultados presentes na **tabela 13**, é possível constatar que a variedade de cevada Sanette não altera a estabilidade organolética da cerveja.

Em suma, a introdução desta nova variedade de cevada não apresenta diferenças relevantes, em termos sensoriais, entre controlo e ensaio. O produto fresco apresenta qualidade satisfatória e a estabilidade organolética não sofre alterações com a utilização da cevada Sanette.

6.1.4 Conclusão

A indústria cervejeira tem determinados objetivos na escolha do malte a adquirir, tais como:

- (1) Rendimento em extrato elevado;
- (2) O malte possa ser utilizado de forma satisfatória, na planta da fábrica, sem a adição de tratamentos ou passos adicionais;
- (3) A filtração do mosto ocorra de forma satisfatória, dentro da duração normal para o tipo de cerveja pretendido;
- (4) O mosto produzido a partir do malte em questão, forneça todos os nutrientes necessários para uma fermentação satisfatória;
- (5) A duração da fase de maturação não seja afetada e, portanto, o tempo de redução do diacetilo se mantenha o mesmo ou diminua, sem que isso tenha implicações na qualidade do produto final;
- (6) Por fim que o malte permita obter um produto final com características organoléticas consistentes.

O malte Sanette demonstrou resultados satisfatórios, cumprindo com todos os objetivos acima enumerados. Por conseguinte, este malte pode ser utilizado para a produção da cerveja Super Bock, uma vez que não impacta negativamente o processo (filtração, fermentação e maturação) e permite a obtenção de rendimentos em extrato elevados, assim como um produto final com características organoléticas consistentes.

Conclui-se que este malte pode ser introduzido nos mix de maltes utilizados, sem restrições.

7 Alteração do tipo de malte e reformulação do diagrama de brassagem na cerveja X

Os maltes de cevada podem ser divididos em maltes claros e ricos em enzimas (Pilsener, Pale Ale), em maltes de cor (Viena, Munique) e em maltes especiais (caramelo, chocolate). Os primeiros são utilizados, essencialmente, como fonte de amido e enzimas amiolíticas, denominados como maltes base. Por sua vez, os maltes de cor e os maltes especiais são aplicados com o objetivo de conferir cor, aroma e sabor à cerveja.

Neste trabalho pretende-se realizar a alteração do tipo de malte base utilizado na cerveja X. Para esse fim, é necessário ter em consideração que o malte tem um papel fundamental nas características físico-químicas e organolépticas da cerveja: (1) o malte é a principal fonte de compostos de cor para a cerveja, assim alterando o tipo de malte utilizado, torna-se necessário prever as alterações sofridas em termos de coloração (2) diferentes tipos de maltes, devido aos parâmetros de maltagem, em particular o grau de modificação e ao perfil de temperaturas utilizado durante a secagem, apresentam entre si um largo espectro de compostos de aroma e sabor ⁸⁷ bem como diferentes rendimentos em extrato. Posto isto, é necessário aferir qual a percentagem de malte que é possível alterar, garantindo a consistência organoléptica e qualidade do produto final.

A alteração do malte tipo A pelo malte tipo B, foi realizada de forma gradual, tendo como ponto de partida, o facto de os dois maltes apresentarem características como o rendimento em extrato, perfil sensorial e cor semelhantes. O motivo desta alteração passa pelo facto do malte tipo B permitir a redução de complexidade na gestão de cereais e, simultaneamente, de custos no fabrico da cerveja X.

O segundo objetivo deste trabalho, de uma forma geral, procura controlar os desvios físico-químicos do processo com maior enfoque na atenuação real da cerveja X. Para esse efeito, a estratégia adotada consistiu em alterar o diagrama de brassagem de dois patamares de temperatura para um único patamar a x °C. A escolha desta temperatura prende-se com dois fatores: (1) a temperatura de gelatinização do amido do malte situa-se entre 60-62 °C, e, portanto, a x °C a extensão da gelatinização é maior ⁹⁴ (2) trata-se da temperatura ótima da enzima β -amílase ¹. Assim, havendo uma maior

proporção de amido gelatinizado (mais acessível as enzimas) em conjunto com uma maior atividade enzimática, tenciona-se melhorar a atenuação real final.

7.1.1 Descrição ensaio industrial

O ensaio industrial consistiu na realização de uma primeira cuba de fermentação, com ~ 75% malte tipo A e ~ 25% malte tipo B e de uma segunda cuba com ~ 50% malte tipo A e ~ 50% malte tipo B (Fig.37). A segunda cuba foi apenas realizada, aquando avaliação das características físico-químicas e sensoriais da cerveja da primeira cuba. Anteriormente foi realizada uma cuba controlo, que servirá como termo comparativo para os parâmetros físico-químicos e para a análise sensorial da cerveja.

Na reformulação da receita da cuba nº1 e da cuba nº2, procedeu-se à alteração do diagrama de brassagem de dois patamares de temperatura para um único patamar a x °C (Fig.37).

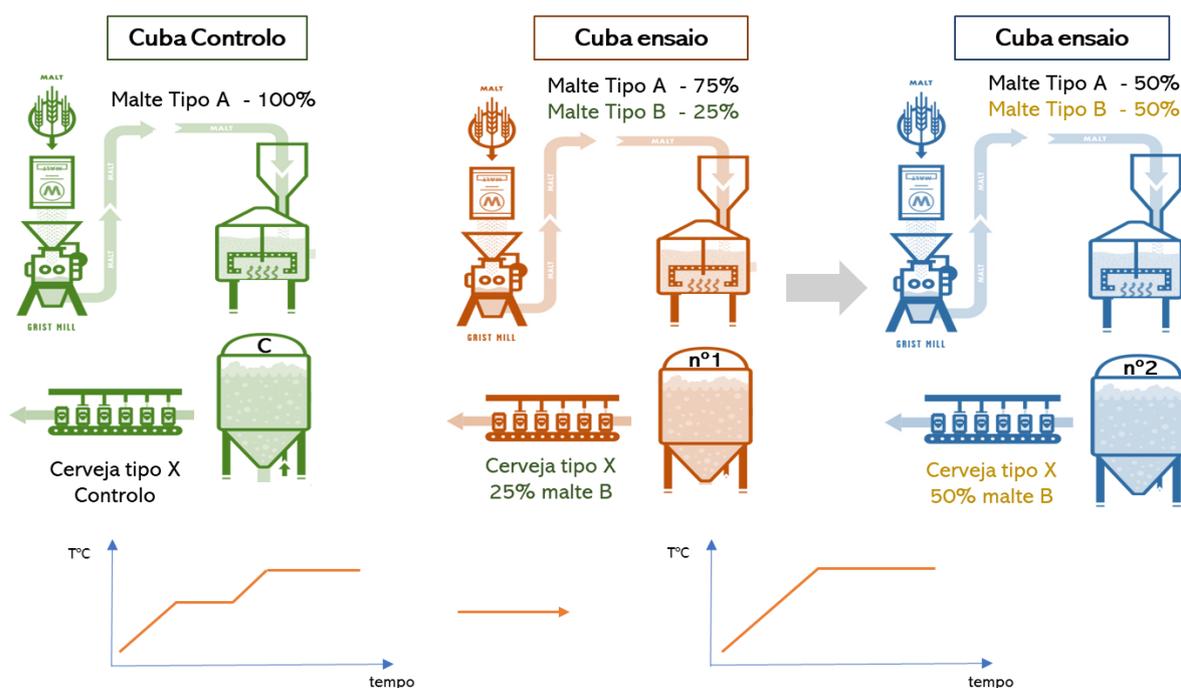


Figura 37 – Descrição esquemática do ensaio industrial (C) – controlo, (nº1) cuba nº1 e (nº2) cuba nº2.

Previsão da cor

A percepção da cor da cerveja influencia a aceitação do produto por parte do consumidor, sendo distintiva de um determinado estilo de cerveja. Com a alteração do tipo de malte e devido às suas ligeiras diferenças em termos de coloração, efetuou-se uma previsão da cor da cerveja obtida na cuba nº1 e na cuba nº2, com base na coloração dos grãos de malte. Não existem métodos para determinar a cor da cerveja com precisão, a partir dos grãos de malte utilizados, uma vez que os processos térmicos (p.e ebulição) e os parâmetros aplicados (tempo e T °C) têm influência na formação de compostos de cor. No entanto, a influência do processo não varia de forma considerável para a fabricação de um tipo de mosto, pelo que é expectável que seja constante.

A previsão da cor da cerveja pode ser feita com recurso ao cálculo das unidades de cor do malte (*MCU*), tratando-se de uma determinação relativa da cor fornecida pelos grãos de malte.

O *MCU* pode ser calculado da seguinte forma:

$$MCU = \frac{\text{Peso grãos} \times \text{Cor do grão}}{\text{Volume}}$$

Os valores de *MCU* totais (soma da contribuição de cada malte) foram relacionados com a escala de referência na medição da cor da cerveja (EBC), de forma a associar a contribuição da cor do malte com a cor final da cerveja (**Tabela 14**). Além dos grãos de malte fornecerem uma parte considerável da cor, existem outras variáveis que a influenciam a cor final, tal como se pode constatar na discrepância entre a cor obtida pelo cálculo *MCU* (11,80, 11,68 e 11,48 EBC) e a cor normal e alvo da cerveja (19 EBC).

Assim, tendo em consideração que as variáveis do processo causam uma diferença de aproximadamente 7 EBC, entre a previsão *MCU* e a cor final, é possível formular as quantidades necessárias do malte tipo C – malte especial, cuja função é a correção da cor – em relação aos maltes tipo A e B, para que a cor seja corrigida e se mantenha no alvo (**Tabela 14**). Através desta previsão, aumentou-se da cuba controlo para a cuba nº1 e nº2 a percentagem de malte tipo C em 1%.

Tabela 14 -Cálculo de *MCU* (unidades de cor do malte) e conversão em cor final da cerveja (EBC) para a cuba nº 1 e cuba nº 2 e controlo.

Malte	Cuba Controlo			Cuba nº1			Cuba nº2			Cor alvo
	Quant. (%)	<i>MCU</i>	EBC	Quant. (%)	<i>MCU</i>	EBC	Quant. (%)	<i>MCU</i>	EBC	EBC
Tipo C	5%	2,84	11,80	6%	3,31	11,68	6%	3,55	11,47	19
Tipo A	95%	4,76		73%	3,55		46%	2,32		
Tipo B	-	-		21%	0,63		48%	1,43		
Total	7,59	Total		7,48	Total		7,29			

7.1.2 Análise comparativa dos parâmetros de qualidade dos cereais utilizados

Devido ao espaçamento temporal entre a cuba nº1 e nº2, os lotes de malte tipo B foram diferentes (**Tabela 15**).

O valor de extrato varia consoante a variedade e o tipo de malte (processo de maltagem). Posto isto, alterando o tipo de malte base é fundamental que o novo malte possua um rendimento em extrato semelhante, para que o processo, os parâmetros físico-químicos e a qualidade do produto final permaneçam consistentes.

Analisando a friabilidade e o índice de *Kolbach* é possível aferir sobre o grau de modificação de cada malte (**Tabela 15**), com o pressuposto de que maltes com um maior grau de modificação permitem rendimentos em extrato superiores. O malte tipo A apresenta um grau de modificação superior, relativamente ao tipo B, contudo a percentagem de extrato recuperada não é consideravelmente diferente entre eles.

Mediante a análise dos valores teóricos, não é expectável que o extrato obtido a partir do malte tipo B demonstre alterações expressivas.

A percentagem de proteína total, é importante para que características como o corpo e estabilidade da espuma se mantenham estáveis⁷². Este parâmetro é igualmente importante para o correto desenvolvimento da levedura e conseqüentemente do processo fermentativo. Analisando este parâmetro para os dois tipos de malte, não existem diferenças relevantes.

Por último, o pH dos maltes base em água destilada, como é o caso do mosto realizado para as análises da **tabela 15**, situa-se entre 5,6-6,0⁹⁰. Ambos os tipos de malte apresentam valores de pH concordantes com a gama referida, no entanto o tipo A apresenta um pH mais baixo.

Tabela 15 –Resultados descritos no certificado do fornecedor relativamente aos parâmetros físico-químicos do malte tipo A e B utilizados no controlo, cuba nº1 e cuba nº2.

Tipo	Controlo	Cuba nº1	Cuba nº2
Malte	Tipo A	Tipo B	Tipo B
Extrato S.M.T.Q (%)	78,20	77,10	77,80
Extrato S.M.S (%)	81,90	81,10	81,80
Friabilidade (%)	88,20	83,00	84,00
Viscosidade (cp)	1,88	1,53	1,51
Índice de Kolbach	41,60	38,00	42,00
Proteína total (%)	10,50	11,20	10,10
pH mosto	5,87	6,10	6,10
Observações:			
1. Resultados de análises realizadas pelo fornecedor a cada lote			

Em suma, não se preveem alterações relevantes no processo e nos parâmetros físico-químicos da cerveja obtida, com a alteração do malte tipo A pelo tipo B.

7.1.3 Controlo do processo de produção de cerveja

As análises internas realizadas nesta secção estão descritas em 5.2 e foram realizadas numa amostra de cada cuba durante a produção de mosto e no produto acabado.

i. Produção de Mosto

Na fase de produção de mosto foram controlados os valores de pH da empastagem do malte e o do início e fim de ebulição. O controlo destes parâmetros deve-se ao facto de o pH variar consoante o tipo de malte⁶⁶ e de este parâmetro ser essencial para a produção eficiente e consistente de cerveja. O valor de pH recomendado para a empastagem do malte é de 5,40, correspondente ao pH ótimo da β -amílase^{1,72}.

Os resultados obtidos, estão registados na **tabela 16**. Comparando os valores de pH da empastagem do controlo (5,26) com a cuba nº1 (5,32) e nº2 (5,39) é possível verificar um aumento. Este aumento é mais expressivo na cuba nº2 e pode ser explicado pelo facto do malte tipo B apresentar um pH mais elevado (**tabela 15**). Não obstante, os valores de pH obtidos na cuba nº1 e nº2 estão dentro das especificações e mais próximos da atividade ótima da β -amílase.

Tabela 16 - Valores de pH da empastagem do malte, início e fim de ebulição, e tempo de ocupação do filtro em minutos e desvio padrão (σ) entre controlo e as respetivas cubas.

Tipo	Empastagem Malte	Início de Ebulição	Fim de Ebulição
	pH	pH	pH
Controlo	5,30	5,16	5,01
Cuba nº1	5,32	5,15	5,07
σ	0,01	0,02	0,03
Cuba nº2	5,39	5,25	5,09
σ	0,04	0,03	0,04

O pH de início de ebulição apresenta valores baixos para ambas as cubas, sendo uma tendência já verificada no controlo, e que pode ter efeitos negativos na isomerização dos α -ácidos. No entanto, a cuba nº2 (5,25), como consequência de um pH mais elevado na empastagem, apresenta valores mais próximos do alvo.

Relativamente ao pH de fim de ebulição, este encontra-se dentro dos valores ótimos para uma clarificação eficiente¹, verificando-se a normal diminuição de 0,2-0,3 unidades do início para o fim de ebulição.

Após o arrefecimento do mosto para a temperatura de inoculação da levedura, foram realizadas análises aos parâmetros físico-químicos do mosto.

Os principais pontos a ter em consideração, com a alteração do tipo de malte, são o extrato, a cor e a atenuação real limite. Os resultados obtidos estão registados na **tabela 17**.

Tabela 17 – Resultados da análise dos parâmetros físico-químicos do mosto frio e desvio padrão (σ) entre controlo e as respetivas cubas.

Tipo	Extrato (p/p)	pH	Coloração (EBC)
Controlo	16,23	4,91	30,7
Cuba nº1	14,99	4,99	30,5
σ	0,62	0,04	0,10
Cuba nº2	15,36	5,05	25,3
σ	0,44	0,07	2,70

Os extratos obtidos para as cubas nº1 e nº2 são inferiores ao controlo, sendo este resultado expectado, mediante os extratos S.M.S (**tabela 15**) de cada tipo de malte. Não

obstante, as diferenças entre as cubas nº1 e nº2 e o controlo não são relevantes, e as flutuações de valores entre as cubas ensaio, devem-se a aspetos processuais como o volume de mosto para cada fabrico.

A formulação das quantidades de malte para a cuba nº1 e nº2, foi realizada de modo a que a cor da cerveja fosse minimamente afetada. Para tal, e de forma a compensar as diferenças de cor entre o malte A e B, aumentou-se em 1% a quantidade de malte C.

A cor do produto final é afetada maioritariamente pelas características dos maltes, no entanto, é necessário ter em consideração que a ebulição do mosto também contribui, ainda que de uma forma mais reduzida, para a cor da cerveja, através da formação de compostos corados as melanoidinas⁸⁹. Os parâmetros de ebulição da cerveja X não foram alterados, e, portanto, variações observadas na cor do mosto estão relacionadas com a composição dos maltes. Observando os resultados (**Tabela 17**), a cuba controlo e a cuba nº1 apresentam valores perto do alvo. A cuba nº2 exhibe uma coloração abaixo do limite inferior estipulado pela empresa, o que demonstra que a percentagem de malte tipo C deveria ter sido aumentada para 2%.

ii. Acompanhamento Fermentação

O acompanhamento da fermentação foi realizado através de análises diárias de álcool %(v/v), pH, cor, extrato aparente ($^{\circ}P$) e atenuação. *À priori*, não são esperadas alterações consideráveis na fermentação com a introdução do malte tipo B, devido à sua semelhança com o malte tipo A. Porém, com a alteração da temperatura no diagrama de brassagem para x °C, é expectável que a atenuação – percentagem de extrato primitivo que foi fermentado – seja superior e conseqüentemente a quantidade de álcool produzida também. A alteração de dois patamares de temperatura para um único patamar (x °C) deveu-se à análise do histórico de atenuações da cerveja X, tendo ficado evidente que os patamares utilizados não eram os mais adequados. A temperatura durante a empastagem tem um impacto direto na fermentabilidade do mosto – rácio entre os açúcares fermentescíveis (glucose, maltose, maltotriose) e o total do extrato – assim o balanço entre açúcares fermentescíveis e não fermentescíveis é conseguido com temperaturas de, aproximadamente, 64 °C onde a intensidade da atividade da β -amílase é maior⁹¹.

Através da análise da **figura 38**, constata-se uma maior produção de álcool para as cubas nº1 e nº2, relativamente ao controlo. A maior produção de álcool está de acordo com valores superiores de atenuação para as cubas ensaio, relacionados com uma maior fermentabilidade do mosto. Ou seja, como o mosto contém uma maior concentração de açúcares fermentescíveis, o extrato aparente vai ser menor, uma vez que foram consumidos mais açúcares, refletindo-se diretamente na atenuação e no álcool produzido.

Assim, conclui-se que a alteração do diagrama de brassagem permite aumentar a fermentabilidade do mosto e conseqüentemente a produção de álcool. Decorrente da maior disponibilidade de açúcares fermentescíveis, o número de dias de fermentação aumentou entre controlo, cuba nº1 (~ 5 dias) e cuba nº2 (~ 6 dias). No entanto, este aumento não é significativo e está dentro dos limites estipulados.

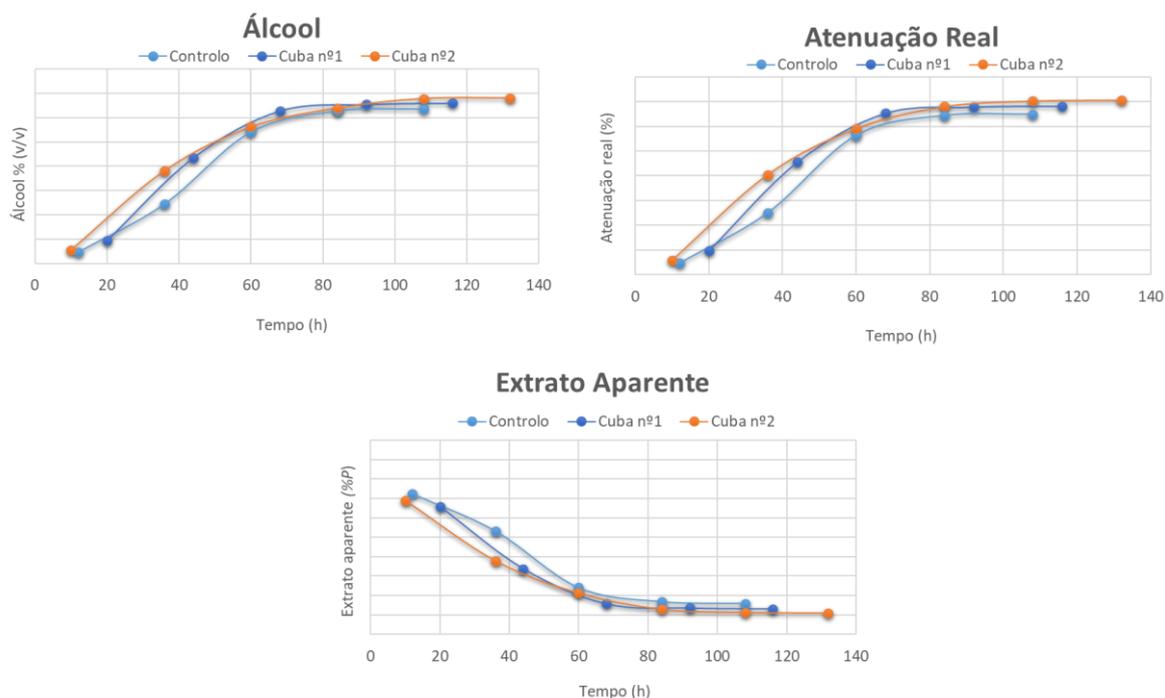


Figura 38 – Evolução da redução do extrato aparente ($^{\circ}P$), produção de álcool % (v/v) e atenuação.

O acompanhamento da cor e do pH, está presente na **figura 39**. Durante a fermentação ocorre a perda de alguns dos compostos corados, por adsorção à superfície da levedura, o que resulta numa diminuição da cor inicial⁸⁹. Verifica-se para o controlo e para as cubas nº1 e nº2 uma diminuição de cor semelhante (~ 1 EBC). Assim, a cor final da cerveja em fermentação é maioritariamente dependente da composição dos maltes, voltando a ser evidente a necessidade de aumentar a percentagem do malte tipo C.

Como já referido no capítulo anterior, o pH diminui no início da fermentação devido à produção de ácidos orgânicos e ao consumo de compostos com efeito tampão. Atentando à **figura 39**, é possível verificar esta diminuição para todas as cubas, sem que nenhuma tenha atingido o mínimo (3,8)⁷¹. Observam-se valores finais de pH mais elevados para as cubas nº1 e nº2, visto que este é dependente do pH do mosto⁷¹. Todavia, o aumento de pH não excede os 4,4, o que é importante para evitar a contaminação microbiológica e manter estabilidade organolética do produto final⁹².

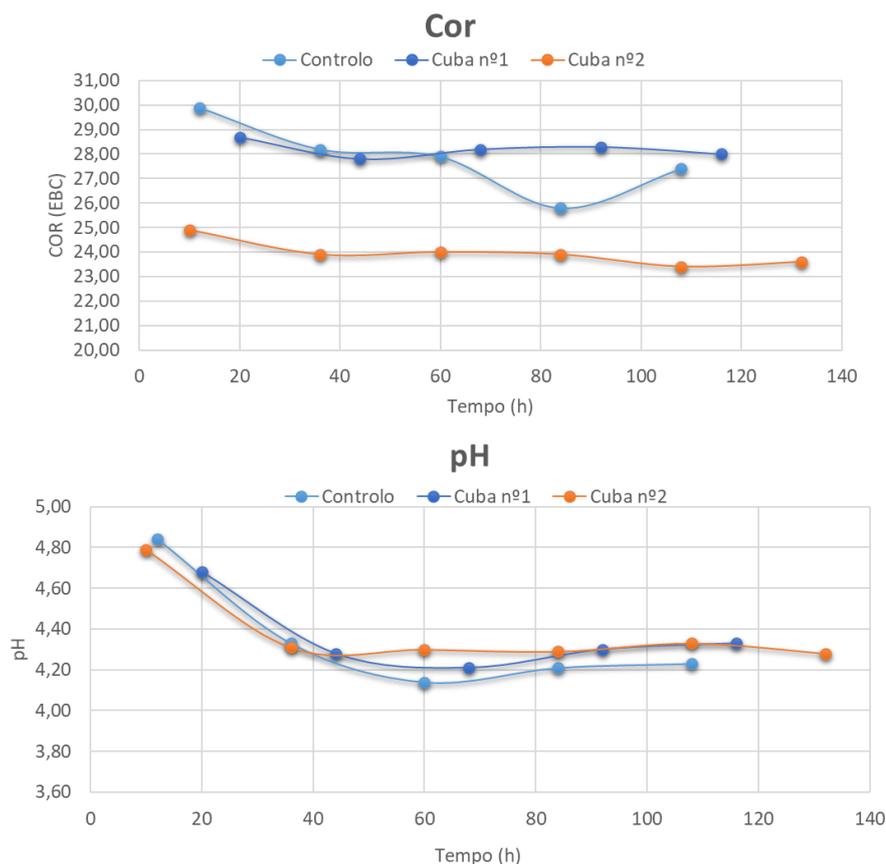


Figura 39 – Evolução da cor e pH ao longo da fermentação primária.

Em suma, não são evidentes alterações no decorrer da fermentação com a alteração gradual do malte tipo A pelo tipo B.

A cerveja em maturação apresenta valores de extrato %(p/p), álcool %(v/v) e pH de acordo com as especificações internas. Relativamente à cor, a cuba nº2 exhibe valores inferiores ao limite inferior da especificação, tal como era expectado tendo em conta a cor mais baixa no mosto frio e no final de fermentação. Os valores de atenuação final e de álcool confirmam-se mais elevados para a cuba nº1 e nº2, relativamente ao controlo.

Assim, os parâmetros físico-químicos da cerveja em maturação não foram alterados com a introdução de 25 e 50% de malte tipo B.

iii. Produto Acabado

Com a alteração do tipo de malte base - nas percentagens de aproximadamente 25% e posteriormente de 50% - e do diagrama de brassagem, pretende-se obter um produto final sem diferenças relevantes do original (100% malte tipo A) em termos físico-químicos e organoléticos. Para esse fim, foram analisadas as características físico-químicas (**Tabela 18**) e sensoriais (**Tabela 19**) do produto acabado.

Com as alterações em cima mencionadas, observam-se as seguintes variações físico-químicas no produto acabado.

- (1) O extrato primitivo é menor para o produto acabado da cuba nº1 e nº2, relativamente ao controlo - consequência do aumento da percentagem do malte tipo B.
- (2) As cubas nº1 e nº2 com extratos primitivos inferiores, atingiram concentrações mais elevadas de álcool, em comparação ao controlo - maior fermentabilidade do mosto com a alteração do diagrama de brassagem.
- (3) O pH do produto final da cuba nº1 e nº2, foi superior ao controlo, devido à introdução de malte tipo B.
- (4) A cor do produto final da cuba nº2 encontra-se no alvo, uma vez que foi ajustada.

Tabela 18 - Resultados da análise das características físico-químicas do produto final.

Tipo	Controlo	Cuba nº1	Cuba nº2
Extrato Primitivo (p/p) % P [12,51-12,90]	12,90	12,51	12,39
Extrato Primitivo (p/v) % (p/v)	13,56	13,12	12,98
Álcool (p/p) % (p/p)	4,36	4,32	4,40
Álcool (v/v) % (V/V) [5,20-6,00]	5,57	5,51	5,61
Extrato Real % P	4,49	4,17	3,87
Extrato Aparente %P	2,49	2,18	1,85
Atenuação Real (%) [66-72]	67	68	70
pH [4,20-4,60]	4,40	4,46	4,46
Coloração (EBC) [17-21]	19,3	18,5	19,2
Estabilidade de Espuma (seg) [Min.235]	281	275	-
Turvação a 20 °C [Máx.1,30]	0,83	0,49	0,69
Turvação a 0 °C [Máx.1,30]	0,95	0,53	0,86
Turvação Total 60 °C 5d/1 [Máx.3,3]	3,3	3,0	2,2
CO2 (g/L) [5-5,6] Alvo 5,2	5,3	5,3	-

Todas as alterações verificadas nas características físico-químicas eram já expectadas, sendo que nenhum dos parâmetros se encontra fora dos limites especificados para este produto. Por conseguinte, não se considera que existam diferenças relevantes no produto final com ~ 25 e 50% de malte tipo B.

Por fim, de forma a perceber qual a influencia das alterações na cerveja X ao nível sensorial, foram realizados para cada cuba: teste triangular, controlo organolético e estabilidade organolética.

O teste triangular não demonstrou diferenças significativas entre o controlo e a cuba nº1 (**Tabela 19**), o que permite concluir que alteração do malte com 25% e o ajuste do diagrama de brassagem não alteram o perfil sensorial da cerveja tipo X. Contudo, para a alteração do malte com 50%, dez dos treze provadores identificaram a amostra diferente, tendo seis deles preferido a amostra ensaio (aroma mais limpo, menos adstringente), três a amostra controlo e três não demonstraram preferência.

O controlo organolético e a estabilidade organolética demonstraram resultados satisfatórios, não sendo evidente que as alterações na cerveja X comprometam estes parâmetros.

Tabela 19 - Resultados da análise sensorial ao produto acabado.

Análise sensorial		
Tipo	Cuba nº1 (Nível de significância 95%)	Cuba nº2 (Nível de significância 99%)
Teste Triangular – Resultados	Nº total de provadores 10. 5 identificaram a amostra diferente.	Nº total de provadores 13. 10 identificaram a amostra diferente.
Teste Triangular - Conclusão	Não existe diferença significativa entre controlo e ensaio.	Existe diferença significativa entre controlo e ensaio.
Controlo organolético	S	S
Estabilidade organolética	S	S
Legenda: S - Satisfatório; NC – Não satisfatório		

7.1.4 Conclusão e trabalho futuro

Após a análise dos parâmetros físico-químicos do mosto frio, da cerveja em maturação e do produto acabado, não são evidentes diferenças relevantes com a alteração de 25 e 50% do malte tipo A. Relativamente à análise sensorial da cuba nº1, no teste triangular esta cerveja não foi diferenciada do controlo (nível de significância 95 %) e demonstrou resultados satisfatórios para o controlo e estabilidade organolética.

Por sua vez, a cuba nº2 foi diferenciada por dez dos treze provadores, o que significa que a cerveja com 50% de malte tipo A e B, demonstra diferenças significativas do controlo (nível de significância 99%). No entanto, foi a amostra preferida com 99% de significância. Esta alteração da percentagem do tipo de malte, não teve impactos no controlo e estabilidade organolética.

De forma a manter as características originais da cerveja X, o malte tipo A pode ser substituído até 25%, contudo, se o perfil de preferência da cuba nº2 permitir obter uma cerveja com características organoléticas superiores, a sua realização pode ser executada com sucesso.

Futuramente para a avaliação de uma maior percentagem de substituição do malte tipo A (75% e 100%) será importante acompanhar a evolução do pH durante a produção de mosto e o extrato primitivo obtido. Para manter a cor final da cerveja no alvo, será necessária a reformulação da receita com a adição de uma percentagem de 8% de malte tipo C. Por fim, e de forma a perceber os impactos a nível sensorial, proceder à realização de teste triangular, controlo e estabilidade organolética.

Finalmente, a estratégia de alterar o diagrama de brassagem, com o objetivo melhorar a atenuação real final, demonstrou ser eficiente. A atenuação real final aumentou de 67% no controlo para 70% na cuba nº2. Assim, este novo diagrama poderá ser adotado garantindo melhorias eficazes na atenuação.

8 Reaproveitamento dos *spent hops* como fonte de compostos de amargor

Atualmente verifica-se um crescente interesse, por parte do consumidor, em cervejas de *dry-hopping* (DH). Como consequência e devido à tendência em maximizar a extração dos compostos de aroma, a quantidade em gramas de lúpulo utilizado, por hectolitro de cerveja aumentou de forma significativa⁵⁷. O maior consumo de lúpulo, implica problemas de sustentabilidade para as cervejeiras, em termos económicos e de resíduos originados, os *spent hops*⁶⁰.

Devido as baixas temperaturas a que ocorre o DH, comparativamente à ebulição do mosto, os compostos precursores de amargor (α -ácidos: cohumulona, humulona e adhumulona) não são isomerizados e a sua solubilização na matriz da cerveja é pouco eficiente, o que faz com permaneçam em quantidades consideráveis no material descartado (*spent hops*)⁶².

Uma potencial reutilização dos *spent hops* na produção de cerveja, consiste em reintroduzi-los no início de ebulição como fonte de compostos precursores de amargo. A reutilização desta fonte de amargor, apresenta uma vantagem económica para o processo, uma vez que permite diminuir a quantidade doseada de extrato de resina. Com o possível aumento de cervejas de *dry-hopping* no futuro, as quantidades de *spent hops* originadas irão ser conseqüentemente superiores, o que torna a aprovação deste material, como fonte de compostos de amargor na ebulição de qualquer tipo de mosto, importante para manter a sustentabilidade do processo.

Durante a ebulição, os α -ácidos sofrem um processo de isomerização, catalisado pelo calor, convertendo-se em iso- α – ácidos (iso-cohumulona, iso-humulona e iso-adhumulona). A quantidade de iso- α - ácidos no mosto ou na cerveja acabada, relativamente à quantidade de ácidos- α adicionados na ebulição, diz respeito a taxa de utilização destes compostos ⁶⁰.

Correlacionado com as diferenças, em termos de composição, dos *spent hops* com o extrato de resina (solução concentrada de *soft resins*), podem existir diferenças na taxa de utilização e/ou nas qualidades organoléticas do produto acabado.

Assim, os objetivos deste trabalho são: (1) avaliar a possibilidade de reutilização dos *spent hops*, na caldeira de ebulição, como fonte de compostos de amargor (2) investigar a taxa de utilização dos *spent hops*, relativamente ao extrato de resina não

isomerizado (3) analisar o impacto da reutilização em organoléticos do produto acabado.

8.1.1 Descrição do ensaio industrial

Após o DH, os *spent hops* (SH) foram recolhidos para um contentor esterilizado (**Anexo B**), que foi armazenado no frio e no escuro de modo a minimizar a degradação dos compostos precursores de amargo.

Para avaliar a possível reutilização dos *spent hops* num mosto *standard*, foi realizado um ensaio preliminar num dos fabricos de mosto (1000 hL) de uma cuba de 3000 hL, que consistiu na adição, no início de ebulição, de aproximadamente 55 L de *spent hops* mais 44,51 mg/L de α -ácidos provenientes do extrato de resina. (**Fig.40**). Mediante a taxa de utilização do extrato de resina não isomerizado, sabe-se que 44,51 mg/L, conferem aproximadamente 18 unidades de amargor (UA), sendo estas últimas relativas a concentração de iso- α -ácidos em mg/L no mosto.

Neste ensaio, de forma a compreender a contribuição das unidades de amargor dos SH, foram adicionados 55 L de SH e metade do extrato de resina usualmente doseado, de forma a garantir que os valores de amargor estipulados para o fabrico de mosto eram cumpridos.

Após o ensaio preliminar, realizou-se um 1º ensaio industrial num dos fabricos de mosto (1000 hL) de uma cuba de 3000 hL, em que foram adicionados, aproximadamente, 500 L de *spent hops* – metade da quantidade de SH passíveis de serem recolhidas - mais a camada sobrenadante de água e cerveja, que se forma após a sedimentação dos SH.

Conjuntamente foram adicionados 50,51 mg/L de α -ácidos a partir do extrato de resina (19 UA). Neste ensaio, pretendia-se determinar quais os valores de amargor para a totalidade de SH recolhida, sendo que para garantir as unidades de amargor estipuladas para este mosto, foi adicionada a concentração acima referida de α -ácidos a partir do extrato de resina.

Foi também realizada uma cuba controlo, apenas com a adição de extrato de resina no início de ebulição (**Fig.40**).

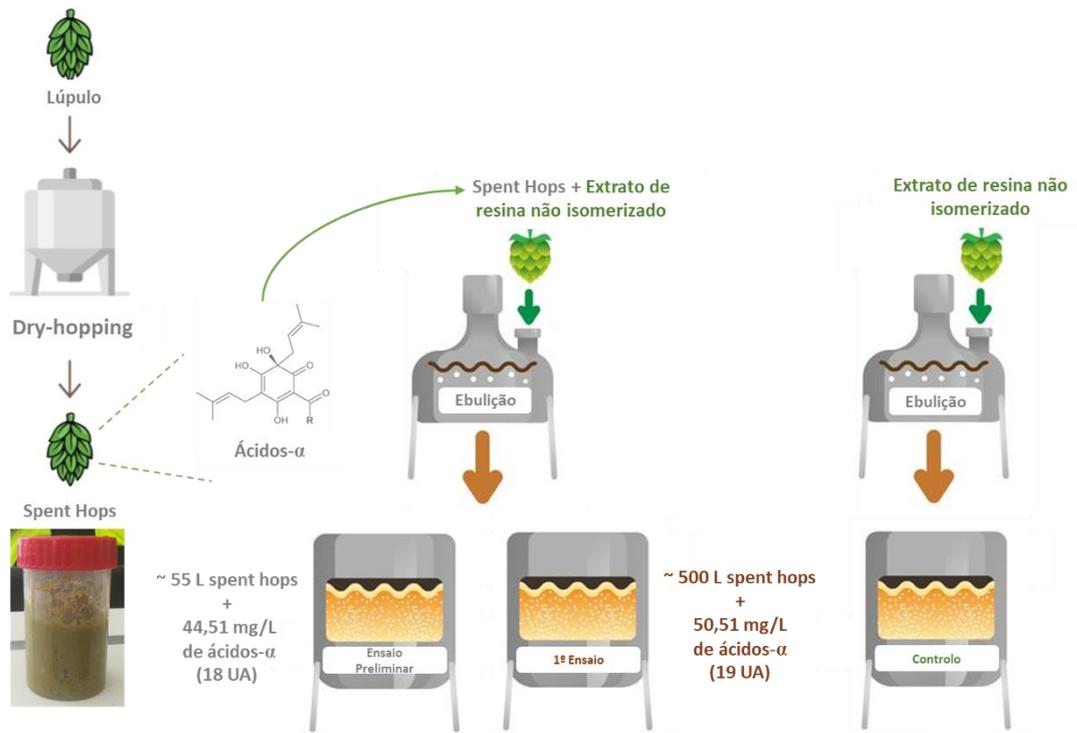


Figura 40 – Descrição esquemática do ensaio industrial.

8.1.2 Avaliação da reutilização dos *spent hops* como fonte de compostos de amargor

Para avaliar o potencial de reutilização dos *spent hops*, é fundamental numa primeira instância, verificar se ocorre a retenção dos α -ácidos e $-\beta$ nos SH e qual a percentagem de retenção. Com essa finalidade, as concentrações destes compostos nos *pellets* utilizados para o DH e nos *spent hops* originados foram comparadas (**Tabela 20**). Tal como era esperado, devido ao carácter hidrofóbico dos α -ácidos e $-\beta$ e à baixa solubilidade na cerveja, estes permanecem em quantidades consideráveis nos SH, observando-se uma retenção de 60 e 49%, respetivamente (**Tabela 20**).

A comparação é realizada com os *spent hops* “*as is*”, ou seja, exatamente da forma como são recolhidos, por uma questão de praticidade, uma vez que para a sua reutilização, os dados devem ser sobre o estado como os *spent hops* são adicionados. Assim, os SH apresentam uma humidade de 86%, que terá de ser tida em conta no cálculo das unidades teóricas de amargor provenientes deste material.

Tabela 20 – Comparação da % de humidade e da concentração % (p/p) de ácidos- α e $-\beta$ nos pellets de lúpulo adicionados no DH com os *spent hops* resultantes desses pellets.

Material	Humidade (%)	% p/p	
		α -ácidos	β -ácidos
Pellets de lúpulo	6,54	30,0	8,4
Spent Hops “as is”	86,00	18,1	4,1
Retenção (%)	-	60	49

Com a percentagem de humidade dos *spent hops*, é possível aproximar a quantidade transferida para a caldeira de ebulição no ensaio preliminar e no 1º ensaio (~ 8 e 70 kg, respetivamente) (**Tabela 21**). Dado que, apenas os α -ácidos é que são convertidos em compostos de amargor e mediante a sua concentração de 18,1%, os gramas de ácidos- α adicionados com 8 e 70 kg de SH, foram 1393 e 12 670, respetivamente (**Tabela 21**).

Tabela 21 – Quantidade de SH em kg, mediante a quantidade adicionada (L) e a % de humidade com a respetiva quantidade de α -ácidos adicionados (g).

Tipo	Humidade SH (%)	Quant. SH “as is” adicionada (L)	Quant. SH (kg)	α -ácidos SH % (p/p)	Quant. α -ácidos adicionada (g)
Ensaio preliminar	86	55	8	18,1	1393
1º Ensaio		500	70		12 670

Mediante este resultado, com o volume de mosto fabricado e a percentagem de utilização, é possível calcular as unidades teóricas de amargor provenientes dos SH:

$$\text{Unidades de amargor (mg/L)} = \frac{\text{Quantidade de ácidos } - \alpha \text{ (mg)}}{\text{Volume de mosto (L)}} \times \text{taxa de utilização}$$

Atendendo aos resultados anteriores, torna-se evidente a potencialidade deste resíduo em ser reutilizado. Contudo, na prática é necessário avaliar as implicações nas características físico-químicas do mosto com a adição dos SH “*as is*”, bem como o rendimento de isomerização dos α -ácidos, dado que os *spent hops* introduzem uma maior quantidade de material vegetal, relativamente ao extrato de resina, o que aumenta a perda de α -ácidos e iso- α -ácidos no *trub*, durante a clarificação do mosto. 63,64,85.

Todos os fabricos foram analisados em termos físico-químicos e os resultados encontram-se na **tabela 22**. O fabrico do ensaio preliminar corresponde ao **número 2 (negrito amarelo)** e não se verificam alterações relevantes nas características físico-químicas, relativamente ao controlo. O amargor total obtido para este fabrico foi de 23 UA, o que significa que aproximadamente 5 UA são provenientes dos SH.

Relativamente ao 1º ensaio que foi realizado no **fabrico número 1 (negrito verde)**, em que a quantidade adicionada de *spent hops* foi superior, não se observam alterações relevantes comparativamente ao controlo. O parâmetro de amargor, que é o mais importante nesta avaliação, foi de 47 UA, o que quer dizer que os SH foram responsáveis por aproximadamente 28 UA.

Tabela 22- Resultados da análise dos parâmetros físico-químicos do mosto frio.

Tipo	Nº Fabrico	Ext.resina - ácidos – α adicionados (mg/L)	SH- ácidos – α adicionados (mg/L)	Mosto frio				
				Extrato % (p/p)	pH	Coloração (EBC)	Iso- α - ácidos total (mg/L) - UA	Iso- α - ácidos SH (mg/L) - UA
Ensaio preliminar	1	89,47	-	16,05	5,09	15,1	36	-
	2	44,51	15,31	16,90	5,14	15,6	23	5
	3	89,47	-	16,73	5,16	14,9	35	-
Média				16,56	5,13	15,2	31	-
1º Ensaio	1	50,51	127,98	16,08	5,00	15,1	47	28
	2	89,47	-	16,20	4,96	14,3	33	-
	3	89,47	-	16,35	4,96	16,2	38	-
Média				16,21	4,97	15,2	39	-
Controlo	1	89,47	-	16,39	4,91	15,1	37	-
	2	89,47	-	16,47	4,96	14,8	35	-
	3	89,47	-	16,48	4,95	15,1	34	-
Média				16,45	4,94	15,0	35	-

Com a adição dos *spent hops* “*as is*”, nestas quantidades, não se observam alterações relevantes nas características físico-químicas do mosto frio. A obtenção de amargor a partir dos SH permite concluir que ocorre a isomerização dos α -ácidos, sendo agora imperativo determinar a taxa de utilização para este material.

8.1.3 Taxa de utilização

A taxa de utilização dos α -ácidos durante a ebulição do mosto, é uma determinação comum que descreve a quantidade de iso- α -ácidos na cerveja ou mosto, relativamente à quantidade de α -ácidos adicionados através do lúpulo⁶³.

$$\text{Taxa de utilização (\%)} = \frac{\text{Iso-}\alpha\text{-ácidos cerveja/mosto (mg/L)}}{\text{ácidos-}\alpha\text{ adicionados (mg/L)}} \times 100\%$$

Tipicamente na adição à caldeira de ebulição, apenas metade dos α -ácidos é que ficam em solução ocorrendo perdas subsequentes durante a fermentação⁶⁴. A taxa de utilização depende do produto de lúpulo aplicado, com os *pellets* e o extrato de resina a exibir utilizações mais elevadas comparativamente aos cones de lúpulo⁶³.

Foi calculada a taxa de utilização do ensaio preliminar (15,31 mg/L de ácidos- α dos SH e 44,51 mg/L de ácidos- α de extrato de resina) com um resultado de 38%. Relativamente à taxa de utilização do 1º ensaio, em que estão presentes 127,98 mg/L de ácidos- α provenientes dos SH e 50,51 mg/L do extrato de resina não isomerizado, o resultado obtido foi de 26% (**Tabela 23**). Por fim, calculou-se a percentagem de utilização do extrato de resina não isomerizado, nos fabricos controlo, tendo se obtido um resultado de 39% (**Tabela 23**).

Posto isto, constata-se uma taxa de utilização inferior, no 1º ensaio, com a adição de uma maior quantidade de *spent hops* (70 kg), em oposição aos resultados obtidos no ensaio preliminar (8 kg), o que sugere que a adição de quantidades superiores de material vegetal diminui o rendimento de isomerização. Outra evidência, é o facto de os α -ácidos doseados, no 1º ensaio, com os SH (127,98 mg/L) serem superiores aos doseados com o extrato de resina (50,51 mg/L), e da utilização dos *spent hops* ser apenas de 22% relativamente a 38% do extrato de resina (**Tabela 23**). Desta forma, a maior adição de material vegetal diminui a disponibilidade dos α -ácidos e retém uma porção dos iso- α -ácidos resultantes da isomerização, refletindo-se diretamente na taxa de utilização destes compostos.

Tabela 23- Taxa de utilização do extrato de resina não isomerizado, do extrato de resina em conjunto com os spent hops e da taxa de utilização individual spent hops e extrato de resina do 1º ensaio.

Tipo	Controlo	Ensaio preliminar			1º Ensaio		
Material	Extr. de resina	Spent hops + Extr. de resina	Spent hops	Extr. de resina	Spent hops + Extr. de resina	Spent hops	Extr. de resina
α-ácidos doseados (g)	8500	5443	1393	4050	17 670	12 670	5000
α-ácidos doseados (mg/L)	89,47	59,81	15,31	44,51	178,48	127,98	50,51
Iso-a-ácidos (mg/L) – (UA)	35	23	5	18	47	28	19
Taxa de utilização (%)	39%	38%	33%	40%	26%	22%	38%

Contudo, para aferir com maior precisão sobre a percentagem de utilização dos *spent hops*, será necessário que o fabrico de mosto seja com 100% SH.

8.1.4 Impacto da reutilização na fermentação e nas características organoléticas do produto acabado

O perfil da fermentação (**Fig.41**), não demonstra alterações relevantes entre a cuba do ensaio preliminar e do 1º ensaio em comparação com a cuba controlo. De um modo geral as três cubas apresentam uma duração da fermentação primária entre 5-6 dias e extrato aparente final de aproximadamente 3°P.

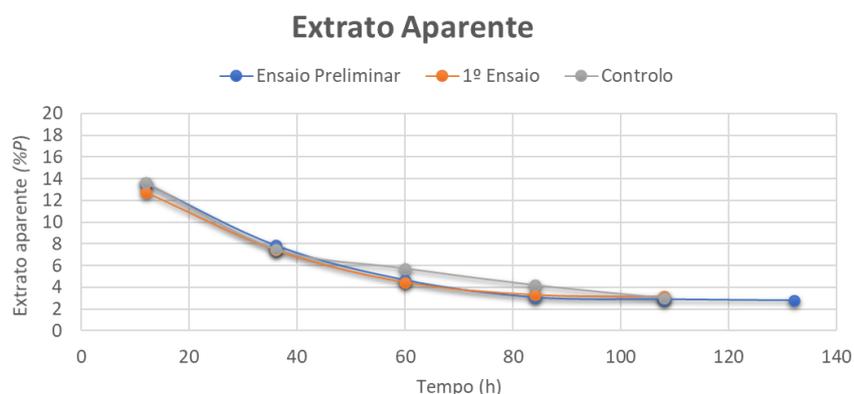


Figura 41 – Perfil da fermentação primária.

Por conseguinte, com a quantidade máxima adicionada de SH “as is” de 500 L, não são evidentes alterações no decorrer da fermentação causadas por deste material.

Durante a fermentação ocorre a perda de compostos de amargor, principalmente devido a diminuição do pH (pKa iso- α -ácidos, aproximadamente 3) e à adsorção destes às células de levedura ⁶⁴.

Considerando os resultados da **tabela 24**, relativos à percentagem de perda dos compostos de amargor durante a fermentação primária e maturação, observam-se perdas superior no ensaio preliminar e no 1º ensaio, em relação ao controlo.

Esta tendência foi observada igualmente por *Jaskula et al* ⁶⁴, e pode ser explicada caso o rácio (iso-cohumulona: iso-humulona + iso-adhumulona) dos *spent hops* seja inferior ao do extrato de resina, o que significa que a concentração de iso-cohumulona é muito mais próxima da concentração de iso-humulona e iso-adhumolona nos *spent hops*. Outro indício, é o facto dos *pellets* utilizados no DH serem provenientes de lúpulos aromáticos que segundo a literatura apresentam rácios de cohumulona inferiores relativamente ao lúpulo utilizado para amargor ^{86,87}.

A implicação direta com uma maior percentagem de perda, prende-se com o facto da iso-humulona e a iso-adhumolona apresentarem estruturas mais apolares, o que as leva a interagir mais fortemente com a superfície das células de levedura, sendo perdidas numa maior percentagem ^{64,24}. Desta forma, se a quantidade destes compostos for muito semelhante à de iso-cohumulona, na globalidade irão ser perdidos mais compostos de amargor.

Tabela 24 – Percentagem de perda de amargor para o ensaio preliminar, 1º ensaio e controlo.

Tipo	Controlo	Ensaio preliminar	1º Ensaio
Iso- α -ácidos (mg/L) – UA	26	21	27
% perda amargor	26%	32%	31%

Assim de forma a corroborar esta hipótese, será importante no futuro a determinação da concentração individual destes compostos, no mosto frio em contraste com a cerveja no final de maturação, assim como a realização de mais cubas ensaio e controlo de forma a perceber se esta tendência se verifica.

A adição do sobrenadante (água e cerveja) formado após a sedimentação dos SH, com o facto de este material conter uma carga superior de material vegetal, pode ter impactos sensoriais significativos. O objetivo passa por reutilizar este material nas cervejas já existentes, e, portanto, a sua adição não pode causar diferenças entre a cerveja ensaio e controlo.

Mediante os resultados obtidos (**Tabela 25**), não foram detetadas diferenças significativas entre controlo e ensaio para a adição do volume total (SH mais sobrenadante). A reutilização dos *spent hops* nestas quantidades não evidenciam alterações relevantes no controlo e na estabilidade organolética.

Tabela 25 - Resultados da análise sensorial ao produto acabado.

Análise sensorial		
Tipo	Ensaio preliminar	1º Ensaio
Teste Triangular – Resultados (Nível de significância 95%)	Nº total de provadores 12. 6 identificaram a amostra diferente.	Nº total de provadores 9. 3 identificaram a amostra diferente.
Teste Triangular - Conclusão	Não existe diferença significativa entre controlo e ensaio.	Não existe diferença significativa entre controlo e ensaio.
Controlo organolético	S	S
Estabilidade organolética	S	S
Legenda: S - Satisfatório; NC – Não satisfatório		

8.1.5 Conclusão e trabalho futuro

A percentagem de retenção dos α -ácidos (60%) e β (49%), demonstra que o processo de *dry-hopping* é ineficiente na extração dos compostos de amargor, ficando retidos em concentrações consideráveis no *spent hops*.

Após a análise dos *spent hops* “*as is*” recolhidos no final do DH, foi determinada a concentração de α -ácidos retidos (18,1%) bem como a humidade (86%). Com estes resultados foi possível aproximar a quantidade de SH adicionada no ensaio preliminar e no 1º ensaio (8 e 70 kg, respetivamente) e a concentração de α -ácidos doseados (15,31 e 127,98 mg/L, respetivamente).

Os ensaios industriais permitiram concluir que os α -ácidos provenientes dos SH, são isomerizados, contudo a percentagem de utilização diminuiu à medida que se adiciona uma quantidade superior de SH, o que poderá estar relacionado com a maior introdução de material vegetal. Contudo, os parâmetros físico-químicos do mosto frio e o perfil de fermentação não sofreram alterações.

A percentagem de perda de amargor observada para os ensaios (~32%) foi superior à observada para o controlo (~26%). Estes resultados podem sugerir uma concentração superior de iso-humulona e iso-adhumulona relativamente a iso-cohumulona, nos *spent hops*, que por sua vez são perdidas em maior quantidade durante a fermentação devido ao seu caráter apolar. Não obstante, para corroborar esta hipótese deve proceder-se à determinação individual destes compostos no mosto e na cerveja após maturação assim como a realização de mais cubas ensaio e controlo de forma a compreender se esta tendência se continua a verificar.

Com a adição da camada sobrenadante de água e cerveja, relativamente ao controlo, o produto pode sofrer alterações significativas em termos sensoriais. Os resultados demonstram que não existem diferenças significativas entre controlo e ensaio.

Em suma, os resultados demonstram que os *spent hops* podem ser reutilizados como fonte de compostos de amargor, permitindo diminuir os custos e o impacto ambiental destes resíduos.

No futuro, devem ser feitos mais ensaios de forma a determinar a taxa de utilização real dos *spent hops*, assim como a influência em adicionar uma maior quantidade deste resíduo (> 70 kg), para determinar se reutilização deve ser 100% SH ou combinada com extrato de resina não isomerizado.

Por fim, deverão ser encontradas soluções para eliminar o sobrenadante formado (p.e abertura lateral no contentor, acima da camada solida de SH, ou eliminação através de uma bomba) de modo a diminuir o impacto sensorial no produto.

9 Conclusão e trabalho futuro

Os principais objetivos dentro do tema da dissertação foram: (1) avaliação da integração da variedade de cevada Sanette nos mix de maltes utilizados; (2) alteração gradual do malte tipo A pelo malte tipo B na cerveja X e (3) reutilização dos *spent hops* como fonte de compostos de amargor na produção de um mosto *standard*.

O malte Sanette, após ensaios industriais, demonstrou resultados satisfatórios para os principais parâmetros avaliados: rendimento em extrato ($\geq 100\%$), tempo de ocupação do filtro (controlo - 106 minutos; ensaio- 103 minutos), performance da fermentação, tempo de redução de diacetilo (~200 horas) e obtenção de um produto final com características organoléticas consistentes. Por conseguinte, este malte pode ser utilizado para a produção da cerveja Super Bock, uma vez que não impacta negativamente o processo (rendimento, filtração, fermentação e maturação) e permite a obtenção de produto final sem diferenças relevantes da Super Bock controlo. Conclui-se assim que este malte pode ser introduzido nos mix de maltes utilizados, sem restrições.

A alteração do malte tipo B pelo malte tipo A foi bem-sucedida uma vez que após a análise dos parâmetros físico-químicos do mosto frio, da cerveja em maturação e do produto acabado, não foram evidentes diferenças com a alteração de 25 e 50% do malte tipo A. No entanto, em termos sensoriais a cerveja produzida com 50% de malte tipo A e B foi diferenciada do controlo, por dez dos treze provadores (nível de significância 99%), que revelou ser a opção preferencial dos provadores, com um nível de significância 99%. Desta forma manter as características originais da cerveja X, o malte tipo A pode ser substituído até 25%, contudo se o perfil de preferência da cuba com 50% permitir obter uma cerveja com características organoléticas superiores, a sua realização pode ser executada com sucesso.

Futuramente para avaliar a substituição do malte tipo A nas percentagens de ~75% e 100% será importante acompanhar a evolução do pH durante a produção de mosto e

o extrato primitivo obtido. Para manter a cor final da cerveja no alvo terá que ser feita a reformulação da receita com a introdução de 8% de malte tipo C. Por fim, e de forma a perceber os impactos a nível sensorial deve-se realizar: teste triangular, controlo e estabilidade organolética.

Finalmente, a estratégia de alterar o diagrama de brassagem, com o objetivo melhorar a atenuação real final, demonstrou ser eficiente. A atenuação real final aumentou de 67% no controlo para 70% na cuba nº2. Assim, este novo diagrama poderá ser adotado garantindo melhorias eficazes na atenuação.

Por último, com a análise aos *spent hops "as is"* conclui-se que, aproximadamente, 60% dos α -ácidos ficam retidos neste material. Os ensaios industriais permitiram entender que α -ácidos presentes nos SH são isomerizados, contudo a percentagem de utilização diminuiu com a adição de uma quantidade superior de SH, o que poderá estar relacionado com a maior introdução de material vegetal. Contudo, os parâmetros físico-químicos do mosto frio e o perfil de fermentação não sofreram alterações. Sensorialmente, a cerveja produzida com *spent hops* não demonstrou diferenças relevantes entre controlo e ensaio. Em suma, os resultados demonstram que os *spent hops* podem ser reutilizados como fonte de compostos de amargor, permitindo diminuir os custos e o impacto ambiental destes resíduos.

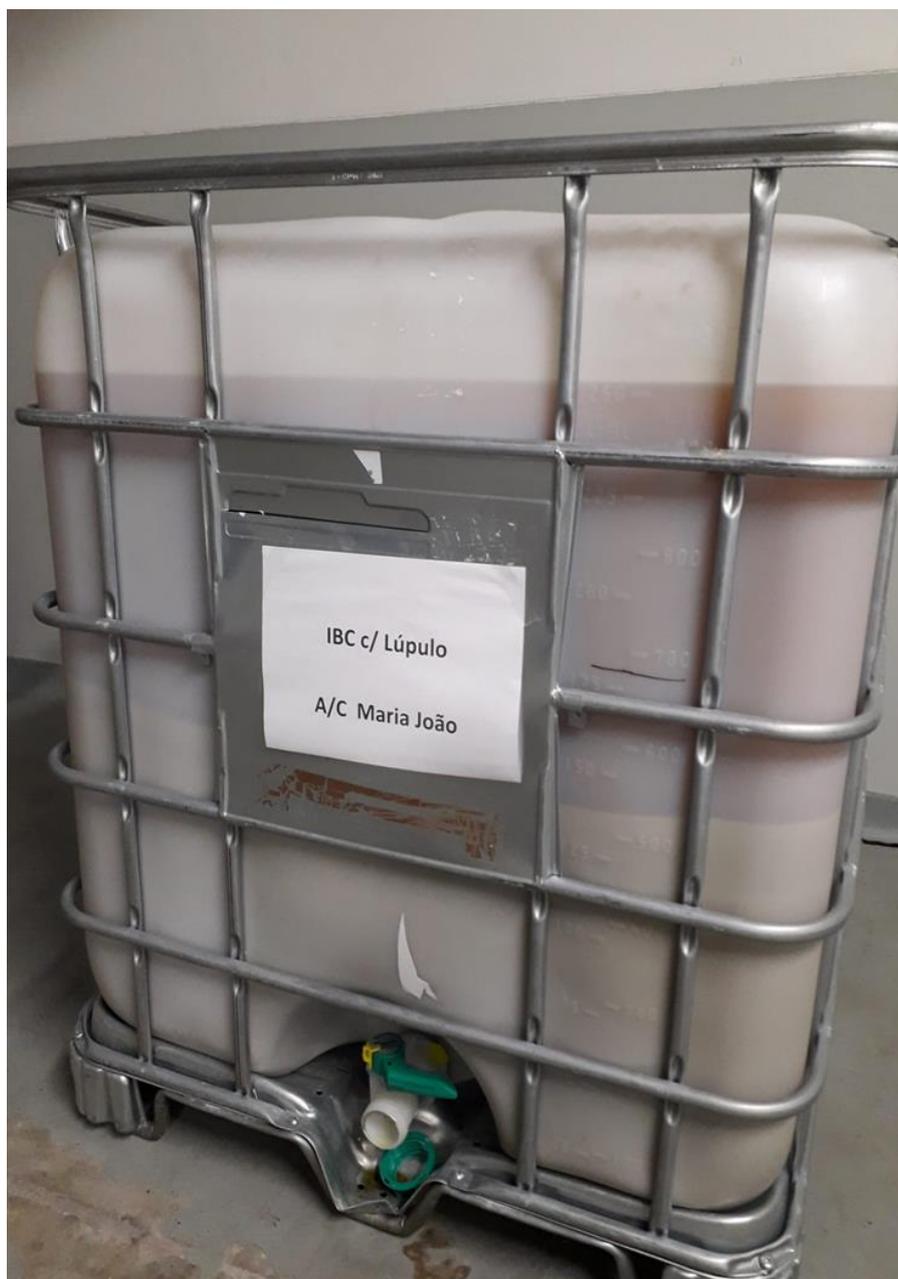
Como trabalho futuro devem ser feitos ensaios com 100% de SH para determinar a taxa de utilização real dos *spent hops*, assim como a influência em adicionar uma maior quantidade deste resíduo (> 70 kg), para estabelecer se reutilização deve ser 100% SH ou combinada com extrato de resina não isomerizado.

Em suma, os objetivos foram cumpridos com a apresentação de resultados relevantes para a empresa, o que leva a concluir que o estágio curricular foi bem sucedido.

Anexo A – Tabela de níveis de significância

Número de Provedores	TESTE DE DIFERENCIAÇÃO			TESTE DE PREFERÊNCIA		
	Número de respostas corretas necessárias para determinar se existe diferença significativa entre as amostras.			Número de resultados concordantes selecionados corretamente pelos provedores para determinar a preferência das amostras.		
	Nível de Significância			Nível de Significância		
	*	**	***	*	**	***
	< 5 %	< 1 %	< 1 ‰	< 5 %	< 1 %	< 1 ‰
2	-	-	-	-	-	-
3	3	-	-	3	3	-
4	4	-	-	3	4	-
5	4	5	-	4	4	5
6	5	6	-	4	5	6
7	5	6	7	4	5	6
8	6	7	8	5	5	6
9	6	7	8	5	6	7
10	7	8	9	5	6	7
11	7	8	10	5	6	8
12	8	9	10	6	7	8
13	8	9	11	6	7	8
14	9	10	11	6	7	9
15	9	10	12	7	8	9
16	9	11	12	7	8	9
17	10	11	13	7	8	10
18	10	12	13	7	9	10
19	11	12	14	8	9	10
20	11	13	14	8	9	11
21	12	13	15	8	9	11
22	12	14	15	8	10	11
23	12	14	16	9	10	12
24	13	15	16	9	10	12
25	13	15	17	9	10	12
26	14	15	17	9	11	12
27	14	16	18	10	11	13
28	15	16	18	10	11	13
29	15	17	19	10	11	13
30	15	17	19	10	12	13

Anexo B – Imagens ensaio *Spent Hops*



10 Bibliografia

- 1- Super Bock Group: <https://www.superbockgroup.com/>(Acedido em dezembro de 2019)
- 2- Kunze, W. *Techonology Brewing and Malting*, 5ª ed; Versuchs und Lehranstalt für Brauerei (VLB): Berlin, 2014.
- 3- Pires, E.; Brányik, T. An Overview of the Brewing Process. In *Biochemistry of Beer Fermentation*; Springer International Publishing: New York, 2015; pp 1–9.
- 4- Arendt, E. K.; Zannini, E. Barley. In *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*; Woodhead Publishing: Cambridge, 2013; pp 155–201.
- 5- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A. & Stevens, R.,. *Brewing: Science and practice*; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, 2004.
- 6- GROVER, C. (27 de Maio de 2014). Rise and Fall of US Barley. <http://drunkalchemist.blogspot.pt/2014/05/rise-and-fall-of-us-barley.html> (Acedido em novembro de 2019).
- 7- Bamforth, C. *Beer. Tap into the art and science of brewing*, 2ª ed; University Press: Oxford, 2003.
- 8- Baik, B.-K.; Ullrich, S. E. Barley for Food: Characteristics, Improvement, and Renewed Interest. *J.Cereal Sci* 2008; 233–242.
- 9- Trafford, K.; Fincher, G. B. Barley Grain Carbohydrates: Starch and Cell Walls. In *Barley*, 2ª ed; Shewry, P.R.; Ullrich,S.E., Eds.; AACC International: St.Paul, Minnesota, 2014; pp 71–95.
- 10- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*, 6ªed; Worth Publishers: New York, 2012.
- 11- Gupta, M.; Abu-Ghannam, N.; Gallagher, E. Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of Its By-Products. *Compr.Rev.Food Sci. Food Saf.* 2010, 9 (3), 318–328.
- 12- Weiskirchen, R.; Mahli, A.; Weiskirchen, S.; Hellerbrand, C. The Hop Constituent Xanthohumol Exhibits Hepatoprotective Effects and Inhibits the Activation of Hepatic Stellate Cells at Different Levels. *Front.Physiol* 2015, 6.
- 13- Karabín, M.; Hudcová, T.; Jelínek, L.; Dostálek, P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use: Biologically Active Compounds from Hops. *Compr.Rev.Food Sci. Food Saf.* 2016, 15 (3), 542–567.
- 14- Srinivasan, V.; Goldberg, D.; Haas, G. J. Contributions to the Antimicrobial Spectrum of Hop Constituents. *Econ. Bot.* 2004, 58, 230–238.
- 15- Eßlinger, H. *Handbook of Brewing*; Stewart, G.G.; Russel, I.; Anstruther, A., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2009.
- 16- Jaskula-Goiris, B.; Aerts, G.; De Cooman, L. Hop α -Acids Isomerisation and Utilisation: An Experimental Review. *Cerevisia* 2010, 35 (3), 57–70.
- 17- Jaskula, B.; Sryn, E.; Goiris, K.; De Rouck, G.; Van Opstaele, F.; De Clippeleer, J.; Aerts, G.; De Cooman, L. Hopping Technology in Relation to Beer Bitterness Consistency and Flavor Stability. *J Am Soc Brew Chem* 2007, 65 (1), 38–46.

- 18- Hauser, D. G.; Lafontaine, S. R.; Shellhammer, T. H. Extraction Efficiency of Dry-Hopping. *J Am Soc Brew Chem* 2019, 77 (3), 188–198.
- 19- Algazzali, V.; Shellhammer, T. Bitterness Intensity of Oxidized Hop Acids: Humulinones and Hulupones. *J Am Soc Brew Chem* 2016, 74 (1), 36–43.
- 20- Hieronymus, S. *For the love of hops: the practical guide to aroma, bitterness and the culture of hops*; Brewers Publications: Boulder, Colorado, 2012.
- 21- Schönberger, C.; Kostelecky, T. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *J.Inst.Brew* 2011, 117 (3), 259–267.
- 22- Wolfe, P. H.,. *Study of Factors Affecting the Extraction of Flavor When Dry Hopping Beer*. Oregon State University: Oregon, 2012.
- 23- Eyres, G.; Dufour, J.-P. Hop Essential Oil: Analysis, Chemical Composition and Odor Characteristics. In *Beer in Health and Disease Prevention*; Preedy, V.R., Eds.; Academic Press: Oxford, 2009; pp 239–254.
- 24- Haunold, A.; Nickerson, G. B. Development of a Hop with European Aroma Characteristics. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1987, 45 (4), 146–151.
- 25- Ayabe, S.; Uchiyama, H.; Aoki, T.; Akashi, T. Plant Phenolics: Phenylpropanoids. In *Comprehensive Natural Products II*; Mander, L.; Liu, H., Eds.; Elsevier Science: Oxford, 2010; pp 929–976.
- 26- Jaskula-Goiris, B.; Goiris, K.; Syryn, E.; Van Opstaele, F.; De Rouck, G.; Aerts, G.; De Cooman, L. The Use of Hop Polyphenols during Brewing to Improve Flavor Quality and Stability of Pilsner Beer. *J Am Soc Brew Chem* 2014, 72 (3), 175–183.
- 27- Stewart, G. G.; Anstruther, A.; Russell, I. *Handbook of Brewing*, 3rded; Russel, I.; Stewart, G.; Anstruther, A., Eds.; CRC Press Taylor & Francis: Cambridge, 2006.
- 28- Power, J. Basic Analysis of Brewing Licor. In *Quality Brewing Share de Experience*: Brewers Publications Boulder: Colorado, 1992; pp 253-265.
- 29- Boulton, C. & Quain, D.,. *Brewing yeast and fermentation*; Blackwell Publishing: London, 2008.
- 30- Rainieri, S. The Brewer's Yeast Genome: From Its Origins to Our Current Knowledge. In *Beer in Health and Disease Prevention*; Preedy, V.R., Eds.; Academic Press: Oxford, 2009; pp 89-101.
- 31- Stewart, G.G. Biochemistry of Fermentation. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nded; Caballero, B.; Finglas, P.M.; Trugo, L.C., Eds.; Academic Press: Baltimore, 2003; pp 434-440.
- 32- Lodolo, E. J.; Kock, J. L. F.; Axcell, B. C.; Brooks, M. The Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* – the Main Character in Beer Brewing. *FEMS Yeast Res.* 2008, 8 (7), 1018–1036.
- 33- Verstrepren, K. J.; Derdelinckx, G.; Verachtert, H.; Delvaux, F. R. Yeast Flocculation: What Brewers Should Know. *Appl. Microbiol and Biotechnol* 2003, 61 (3), 197–205.
- 34- Agu, R. C. A Comparison of Maize, Sorghum and Barley as Brewing Adjuncts. *J.Inst.Brew* 2002, 108 (1), 19–22.

- 35- Poreda, A.; Czarnik, A.; Zdaniewicz, M.; Jakubowski, M.; Antkiewicz, P. Corn Grist Adjunct - Application and Influence on the Brewing Process and Beer Quality: Corn Grist Adjunct. *J.Inst.Brew* 2014, 120 (1), 77–81.
- 36- Martins, S. I. F. S.; Jongen, W. M. F.; van Boekel, M. A. J. S. A Review of Maillard Reaction in Food and Implications to Kinetic Modelling. *Trends Food Sci Technol* 2000, 11 (9–10), 364–373.
- 37- Fox, G. Starch in Brewing Applications. In *Starch in Food*, 2^ªed; Sjøo, M.; Nilsson, L., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, 2017; pp 633–659.
- 38- https://www.pngkit.com/view/u2t4r5y3u2w7t4u2_login-beer-brewing-process-png/ (Acedido em novembro de 2019).
- 39- MacLeod, L.; Evans, E. Barley: Malting. In *Encyclopedia of Food Grains*, 2^ªed; Wrigley, C.; Seetharaman, K.; Corke, H.; Faubion, J., Eds.; J Elsevier Academic Press: Oxford , 2016; pp 423–433.
- 40- Gomaa, A. M. Application of Enzymes in Brewing. *J Nutri Food Sci Forecast* 2018, 1(1), 1002.
- 41- Briggs, D. *Malts and Malting* ; Blackie Academic & Professional: London, 1998.
- 42- Fox, G. P. Chemical Composition in Barley Grains and Malt Quality. In *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*; Zhang, G.; Li, C., Eds.; Springer, Berlin, Heidelberg ,2009 pp 63-98.
- 43- Bertrand, E.; El Boustany, P.; Faulds, C. B.; Berdagué, J.-L. The Maillard Reaction in Food: An Introduction. In *Reference Module in Food Science*; Elsevier, 2018.
- 44- Fillaudeau, L.; Blanpain-Avet, P.; Daufin, G. Water, Wastewater and Waste Management in Brewing Industries. *J. Clean. Prod* 2006, 14 (5), 463–471.
- 45- Edney, M. J.; Izydorczyk, M. S. MALT | Malt Types and Products. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2^ªed; Caballero, B., Eds.; Academic Press: Baltimore,2003; pp 3671–3677.
- 46- Castle Malting.
<http://www.castlemalting.com/CastleMaltingMalts.asp?P=105&Language=English> (Acedido em novembro de 2019).
- 47- Muller, R. An Assessment of Malt Friability from Analysis of the Sound Made During Milling. *J. Cereal Sci* 2003, 37 (2), 241–251.
- 48- Boulton, C. *Encyclopaedia of Brewing*. Sussex UK: Jonh Wiley & Sons, Ltd, 2013.
- 49- Pereira, Mariana. *Otimização energética da maltagem a menor temperatura de estufagem*. Tese de Mestrado em Química. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2016.
- 50- Ortega-Heras, M.; González-Sanjosé, M. L. BEERS | Wort Production. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2^ªed; Caballero, B., Eds.; Academic Press: Baltimore,2003; pp 429–434
- 51- Willaert, R. The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation. In *Handbook of Food Products Manufacturing*; Hui, Y.H., Eds.; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, 2007; pp 443–506.

- 52- Pavslar, A., & Buiatti, S. Lager Beer. In *Beer in Health and Disease Prevention*; Preedy, V.R., Eds.; Academic Press: Oxford, 2009; pp 31–43.
- 53- Smart, K. *Brewing Yeast Fermentation Performance*, 2nded. Smart, K., Eds. Blackwell Science: Oxford, 2003.
- 54- Swanston, J. S.; Wilhelmson, A.; Ritala, A.; Gibson, B. R. Malting, Brewing, and Distilling. In *Barley*; Shewry, P.R.; Ullrich, S.E., Eds.; AACC International: St. Paul, Minnesota, 2014; pp 193–222.
- 55- Faria-Oliveira, F., Puga, S., & Ferreir, C. Yeast: World's Finest Chef. In *Food Industry*; InTech, 2013.
- 56- Saerens, S. M. G.; Duong, C. T.; Nevoigt, E. Genetic Improvement of Brewer's Yeast: Current State, Perspectives and Limits. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, 86 (5), 1195–1212.
- 57- Lafontaine, S. R.; Shellhammer, T. H. Impact of Static Dry-Hopping Rate on the Sensory and Analytical Profiles of Beer. *J. Inst. Brew* 2018, 124 (4), 434–442.
- 58- Oladokun, O.; James, S.; Cowley, T.; Smart, K.; Hort, J.; Cook, D. Dry-Hopping: the effects of temperature and hop variety on the bittering profiles and properties of resultant beers. *Brewing Science* 2017, 70 (11), 187-196.
- 59- Hauser, D. G.; Lafontaine, S. R.; Shellhammer, T. H. Extraction Efficiency of Dry-Hopping. *J Am Soc Brew Chem* 2019, 77 (3), 188–198.
- 60- Jelínek, L.; Müllerová, J.; Karabín, M.; Dostálek, P. The secret of dry hopped beers - Review. *Kvasny Prum* 2018, 64 (6), 287–296.
- 61- Hauser, D. G.; Simaey, K. R. V.; Lafontaine, S. R.; Shellhammer, T. H. A Comparison of Single-Stage and Two-Stage Dry-Hopping Regimes. *J Am Soc Brew Chem* 2019, 77 (4), 251–260.
- 62- Hauser, D. G. *The Efficiency of Dry-hopping and Strategies for the Better Utilization of Dry-hops*. Oregon State University: Oregon, 2019.
- 63- Jaskula, B.; Goiris, K.; Van Opstaele, F.; De Rouck, G.; Aerts, G.; De Cooman, L. Hopping Technology in Relation to α -Acids Isomerization Yield, Final Utilization, and Stability of Beer Bitterness. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2009, 67 (1), 44–57.
- 64- Jacobsen, T.; Hage, T.; Kristensen, R.; Malterud, K. E. Hop Utilization in the Brewery—An Interbrewery Comparison. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1989, 47 (3), 62–67.
- 65- Bamforth, C. W. *Brewing New Technologies*; CRC Press Taylor & Francis: Cambridge, 2006.
- 66- Cervejeiros de Portugal. <https://www.cervejeirosdeportugal.pt/> (Acedido em março de 2020).
- 67- Evans, D. E., Collins, H. M., Eglinton, J. K., and Wilhelmson, A. Assessing the impact of the level of diastatic power enzymes and their thermostability on the hydrolysis of starch during wort production to predict malt fermentability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2005, 63 (4), 185-198.

- 68-** Poreda, A.; Czarnik, A.; Zdaniewicz, M.; Jakubowski, M.; Antkiewicz, P. Corn Grist Adjunct - Application and Influence on the Brewing Process and Beer Quality: Corn Grist Adjunct. *J. Inst. Brew.* 2014, 120 (1), 77–81.
- 69-** Stewart, G. Adjuncts. In *Brewing Materials and Processes*; Bamforth, C.W., Eds.; American Press: London, 2016; pp 27–46.
- 70-** Briggs, D.; Boulton, C.; Brookes, P.; Stevens, R. *Brewing: Science and Practice*; Briggs, D., Eds.; CRC Press Taylor & Francis: Cambridge, 2004.
- 71-** Pahl, R.; Meyer, B.; Biurrun, R. Wort and Wort Quality Parameters. In *Brewing Materials and Processes*; Bamforth, C.W., Eds.; American Press: London, 2016; pp 113–121.
- 72-** Leather, R. V. From Field to Firkin: An Integrated Approach to Beer Clarification and quality. *J. Inst. Brew* 1998, 104 (1), 9–18.
- 73-** Bamforth, C. W. pH in Brewing: An Overview. *MBAA TQ* 2001, 38 (1), 1-9.
- 74-** Krstanović, V.; Mastanjević, K.; Nedović, V.; Mastanjević, K. The Influence of Wheat Malt Quality on Final Attenuation Limit of Wort. *Fermentation* 2019, 5 (4), 89.
- 75-** Phaweni, M.; O'Connor-Cox, E. S. C.; Pickerell, A. T. W.; Axcell, B. The effects of glucose adjunct in high gravity fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Inst. Brew* 1992, 98 (3), 179–185.
- 76-** Hauser, D. G.; Shellhammer, T. H. Investigating the Potential for Re-Using “Spent” Dry-Hops in the Brew Kettle. *Brewing Science* 2019, 72, 125–131.
- 77-** Rees, E. M. K.; Stewart, G. G. STRAIN SPECIFIC RESPONSE OF BREWER’S YEAST STRAINS TO ZINC CONCENTRATIONS IN CONVENTIONAL AND HIGH GRAVITY WORTS. *J. Inst. Brew* 1998, 104 (4), 221-228.
- 78-** Stewart, G. G.; Hill, A.; Lekkas, C. Wort FAN – Its Characteristics and Importance during Fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem* 2013, 71 (4), 179–185.
- 79-** Understanding Efficiency - German brewing and more.
<http://www.lowoxygenbrewing.com/wpcontent/uploads/2016/11/Understanding-Efficiency.pdf> (Acedido em abril de 2020).
- 80-** Krogerus, K.; Gibson, B. R. 125 th Anniversary Review: Diacetyl and Its Control during Brewery Fermentation: Diacetyl and Its Control during Brewery Fermentation. *J. Inst. Brew* 2013, 119 (3), 86-97.
- 81-** Smart, K. *Brewing Yeast Fermentation Performance*, 2^ªed. Smart, K., Eds. Blackwell Science: Oxford, 2003.
- 82-** Bettenhausen, H. M.; Barr, L.; Broeckling, C. D.; Chaparro, J. M.; Holbrook, C.; Sedin, D.; Heuberger, A. L. Influence of Malt Source on Beer Chemistry, Flavor, and Flavor Stability. *Food Res. Int.* 2018, 113, 487–504.
- 83-** Lehnhardt, F.; Gastl, M.; Becker, T. Forced into Aging: Analytical Prediction of the Flavor-Stability of Lager Beer. A Review. *Crit Ver Food Sci Nutri.* 2019, 59 (16), 2642–2653.
- 84-** Guido, L. F.; Curto, A.; Boivin, P.; Benismail, N.; Gonçalves, C.; Barros, A. A. Predicting the Organoleptic Stability of Beer from Chemical Data Using Multivariate Analysis. *Eur Food Res Technol* 2007, 226 (1–2), 57–62.

- 85- Bastgen, N.; Becher, T.; Titze, J. Influencing Factors on Hop Isomerization Beyond the Conventional Range. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2019, 77 (2), 126–133.
- 86- Nickerson, G. B.; Williams, P. A.; Haunold, A. Varietal Differences in the Proportions of Cohumulone, Adhumulone, and Humulone in Hops. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1986, 44 (2), 91–94.
- 87- Mikyška, A.; Hrabák, M.; Hašková, D.; Šrogl, J. The Role of Malt and Hop Polyphenols in Beer Quality, Flavour and Haze Stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2002, 108 (1), 78–85.
- 88- https://www.memoireonline.com/08/13/7254/m_Evaluation-of-the-hypoglycemic-hypolipidemic-and-anti-alpha-amylase-effects-of-extracts-of-the-twig19.html (Acedido em dezembro 2020)