



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Estudo de caso de melhoria no Processo de Mosturação de uma cervejaria no RS

Autor: Paola Cunha Bandinelli

Orientador: Daniele Misturini Rossi

Coorientadora: Lilian Hickert

Porto Alegre, dezembro de 15

Sumário

| | |
|--|------|
| Agradecimentos | iv |
| Resumo | v |
| Lista de Figuras | vi |
| Lista de Tabelas | vii |
| Lista de Símbolos | viii |
| Lista de Abreviaturas e Siglas | ix |
| 1 Introdução | 1 |
| 2 Revisão Bibliográfica | 2 |
| 2.1 Cerveja: História e Classificação | 2 |
| 2.2 Matérias-primas | 3 |
| 2.2.1 Malte | 3 |
| 2.2.2 Lúpulo | 4 |
| 2.2.3 Água Cervejeira | 5 |
| 2.2.4 Adjuntos | 5 |
| 2.3 Processo Fermentativo | 5 |
| 2.4 Tecnologia na Elaboração da Cerveja | 6 |
| 2.4.1 Moagem | 6 |
| 2.4.2 Mosturação | 7 |
| 2.4.2.1 Enzimas Importantes no Processo de Mosturação | 8 |
| 2.4.2.2 Influência de Adjuntos no Processo com Elevadas Concentrações | 10 |
| 2.4.2.3 Influência da temperatura e do tempo de repouso na atividade enzimática | 11 |
| 2.4.3 Filtração, Fervura e Preparo do Mosto | 14 |
| 2.4.4 Obtenção da Cerveja | 14 |
| 2.5 Parâmetros de Qualidade do Mosto | 14 |
| 2.5.1 Extrato do Mosto Primário | 14 |
| 2.5.2 FAN | 15 |
| 2.5.3 Grau de Fermentação Aparente Final (GFAF) | 15 |
| 2.5.4 Reação com Iodo | 15 |
| 2.5.5 Grau de Sacarificação | 16 |
| 3 Materiais e Métodos | 17 |
| 3.1 Descrição do Processo | 17 |
| 3.2 Modificações realizadas na Etapa de Mosturação | 18 |
| 3.3 Avaliação dos Parâmetros de Qualidade | 19 |
| 3.3.1 Teste de Iodo | 19 |
| 3.3.2 Atividade Amilolítica | 20 |
| 3.3.3 Concentração de Glicose e Maltose | 20 |
| 4 Resultados e Discussão | 21 |
| 4.1 Impacto do Tempo do Repouso Proteolítico no FAN do Mosto | 21 |
| 4.2 Influência da temperatura e do tempo de repouso na atividade da Beta-amilase | 22 |
| 4.3 Influência da temperatura e dos tempos de repouso na atividade da alfa-amilase | 23 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3.1 | Influência avaliada pelo teste de iodo | 23 |
| 4.3.2 | Influência avaliada através da atividade enzimática | 25 |
| 5 | Conclusões e Trabalhos Futuros | 27 |
| 6 | Referências | 28 |

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à minha família e ao meu namorado por terem me dado o suporte e a força necessários para que eu chegasse até aqui, e por terem sempre me incentivado a buscar o melhor.

Agradeço também às minhas orientadoras Daniele e Lilian pela orientação e apoio no trabalho final.

Agradeço ao Prof. Marco Antônio Zacchia Ayub e ao laboratório Bioteclab por disponibilizarem o espaço e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Agradeço aos colegas de trabalho, por permitirem o desenvolvimento desse projeto e por fornecerem ajuda em todos os momentos.

Finalmente, agradeço aos amigos e colegas, da faculdade e da vida. Agradeço a vocês por todos os momentos, sérios ou de descontração. Agradeço, porque saio da universidade com muito mais do que um diploma, com amizades para a vida toda.

Resumo

O setor cervejeiro atualmente movimenta uma cadeia produtiva responsável por 15 % da indústria de transformação no Brasil. A mosturação é a primeira operação unitária da sala de brassagem e tem papel fundamental no perfil sensorial da cerveja. Sendo a mosturação uma etapa com duração significativa, a busca por melhorias de processo que levem a um aumento de produtividade da sala de brassagem é de grande interesse das cervejarias. Nesse contexto, foi realizada uma proposta para melhoria de processo em uma cervejaria do estado do RS, com capacidade de produção de aproximadamente 700.000 hL por mês. Através do acompanhamento da mosturação e dos índices de qualidade, identificou-se pontos que poderiam ser otimizados alterando-se o tempo de repouso e a temperatura da rampa de mosturação. Com isso, foram realizadas quatro variações diferentes da curva de mosturação original. Com estas variações pôde-se observar que o tempo de 24 minutos e a temperatura de 46,5 °C apresentaram os melhores resultados de concentração de aminoácidos livres no mosto (FAN), 207mg.L⁻¹. Para o segundo repouso, o tempo de 11 minutos e temperatura de 62°C foi a melhor condição para a concentração de maltose desejada. O terceiro repouso foi definido em 9 minutos e 72 °C, pois a reação com iodo apresentou coloração dourada ao final do repouso e o grau de sacarificação não superou o limite superior de 0,2 dE. Tendo em vista o tempo total da etapa de mosturação, a nova curva de mosturação proposta teve 26 minutos de duração a menos do que a curva inicial, a qual utilizava o tempo total de 130 minutos. A nova curva não resultou em impactos significativos nos parâmetros de qualidade do mosto e aumentou a produtividade do processo.

Palavras-chave: cerveja, mosturação, atividade enzimática, FAN, açúcares fermentescíveis, curva de mosturação.

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 2.1. Etapas do processo de malteação. Fonte: (EBC 2004) | 3 |
| Figura 2.2. Grão de malte durante o processo de germinação. Fonte: (http://www.camunbeer.com.br/)..... | 4 |
| Figura 2.3 Tina de mostura ou Mosturador de uma cervejaria. Fonte: (http://www.engenharia-brasil.com)..... | 7 |
| Figura 2.4 Sistema de controle de temperatura em um mosturador. Fonte: Adaptado de (Barnes 2004)..... | 8 |
| Figura 2.5 Representação esquemática das reações enzimáticas das amilases. Fonte: (Gava, Da Silva, e Frias 1978)..... | 10 |
| Figura 2.6 Curva de mosturação em patamares de temperatura para cerveja <i>Stout/Ale</i> . Fonte: Adaptado de (Green 2015)..... | 11 |
| Figura 2.7 Curva de mosturação em patamares de temperatura para cerveja <i>Pilsen/Lager</i> | 12 |
| Figura 2.8 Inativação das enzimas amilolíticas do malte na temperatura de 65°C. A atividade da alfa-amilase (■-■) é apresentada em gramas de dextrinas hidrolisadas por minuto por grama de malte. A atividade da beta-amilase (o-o) é apresentada em gramas de maltose produzida por minuto por grama de malte). Fonte: (Muller 1991) | 13 |
| Figura 2.9 Aprisionamento da molécula de iodo na cadeia helicoidal da amilose. | 15 |
| Figura 3.1 Curva de mosturação original da cervejaria. | 18 |
| Figura 4.1 Influência do tempo do repouso proteolítico no FAN do mosto. | 22 |
| Figura 4.2 Concentração de maltose em diferentes curvas de mosturação..... | 23 |
| Figura 4.3 Teste de Iodo para as amostras da curva de mosturação original utilizada pela cervejaria (B41 = início do repouso 4, B32 = final do repouso 3 , B31 = início do repouso 3, B22 = final do repouso 2 e B21 = início do repouso do 2)..... | 24 |
| Figura 4.4 Teste de Iodo para o Teste C a temperatura de 69 °C e tempo de 16 minutos (C41 = início do repouso 4, C32 = final do repouso 3 , C31 = início do repouso 3, C22 = final do repouso 2 e C21 = início do repouso do 2)..... | 24 |
| Figura 4.5 Teste de Iodo para o Teste D, a temperatura de 72°C e tempo de 9 minutos (D41 = início do repouso 4, D32 = final do repouso 3 , D31 = início do repouso 3, D22 = final do repouso 2 e D21 = início do repouso do 2). | 25 |
| Figura 4.6 Variação da atividade enzimática da alfa-amilase em diferentes curvas de mostura..... | 26 |
| Figura 6.1 Curva padrão para maltose. | 30 |
| Figura 6.2 Curva padrão de glicose para a análise da atividade enzimática..... | 37 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 Atuação enzimática e suas respectivas condições ótimas de pH e temperatura. Fonte: (Tschope 2001)..... | 8 |
| Tabela 3.1 Testes realizados e os respectivos tempos e temperaturas. Fonte: (O autor, 2015)..... | 19 |

Lista de Símbolos

A – Atividade Enzimática

°P - Grau Plato

rpm – Rotações por minuto

A_0 - Atividade enzimática no início do experimento

t – Tempo

k - Fator de decaimento

Lista de Abreviaturas e Siglas

EBC – European Brewery Convection

FAN – Free Amino Nitrogen

PIB – Produto Interno Bruto

1 Introdução

Na indústria cervejeira, existe uma grande diversidade nos estilos e características que podem ser conferidas às cervejas. A etapa de mosturação é a primeira operação unitária de todo o processo e é onde são definidas as composições de açúcares e nutrientes que irão compor o perfil sensorial do produto. A sua finalidade é recuperar, no mosto, a maior quantidade possível de extrato a partir de malte ou da mistura de malte e adjuntos.

As reações enzimáticas que ocorrem na tina de mostura são controladas segundo uma curva de temperatura, composta por rampas de aquecimento e patamares de repouso. Cada patamar de repouso corresponde à atividade de uma enzima. As principais enzimas que atuam na mostura são as proteases, as amilases e as glucanases. As proteases produzem peptídeos e aminoácidos pela digestão das proteínas, sendo responsáveis pela quebra das cadeias peptídicas em nitrogênio livre e proteínas, que servirão como nutriente para a levedura durante a fermentação e definirão a consistência da espuma, respectivamente. A reação de hidrólise do amido é catalisada pelas amilases, e a atividade enzimática das mesmas definirá a proporção entre açúcares fermentescíveis e não fermentescíveis. As glucanases são responsáveis pela degradação dos beta-glucanos, que conferem a viscosidade ao mosto, influenciando na filtrabilidade do mesmo. As enzimas citadas tem seu início no processo de maltagem e são aceleradas na mosturação, onde encontram condições ótimas de pH e temperatura, além da presença de grande quantidade de água.

Os fatores avaliados neste trabalho são parâmetros que influenciam na fermentação, etapa posterior a brassagem, onde ocorre a produção da cerveja em si. O equilíbrio entre o FAN (aminoácidos livres) do mosto e a espuma é essencial e pode ser obtido com um repouso proteolítico controlado. A proporção entre açúcares fermentescíveis e não fermentescíveis pode ser manipulada no segundo e terceiro repousos, momento em que atuam as amilases. Além disso, análises inerentes ao processo como teste de iodo e grau de sacarificação auxiliam na avaliação dos parâmetros de qualidade.

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar a influência da temperatura e dos tempos de repouso da rampa de mosturação. Através deste estudo, será proposta uma nova curva de mosturação, visando aumentar a produtividade do processo.

Os objetivos específicos do trabalho são:

1. Avaliar a influência do tempo do primeiro repouso no FAN do mosto para diminuir a duração do mesmo;
2. Avaliar a elevação da concentração de maltose de acordo com a alteração das condições do segundo repouso;
3. Avaliar a influência dos tempos e temperaturas do terceiro repouso através do teste de iodo e sacarificação;
4. Analisar a atividade enzimática da alfa-amilase no terceiro repouso.

2 Revisão Bibliográfica

Para desenvolver um projeto de melhoria para a etapa de mosturação em uma cervejaria, é necessário o entendimento das diversas etapas da produção de cerveja, seus objetivos e quais características serão influenciadas pela alteração da composição da mostura. Além disso, é necessário compreender os parâmetros de qualidade do mosto e quais destes devem ser avaliados para obter os resultados desejados. Por fim, o conhecimento da cinética das reações enzimáticas é essencial para a definição das condições ótimas de mosturação.

2.1 Cerveja: História e Classificação

Cerveja, produto tradicionalmente aceito e em evidência por milhares de anos, pode ser definida como sendo uma bebida carbonatada de baixo teor alcoólico, preparada a partir da fermentação do malte de cevada, contendo lúpulo e água, podendo ainda utilizar outras matérias-primas como arroz, trigo ou adjuntos (Silva 2005).

Embora o homem já dominasse a técnica de produzir bebidas fermentadas há muitos anos, pelo processo de malteação de grãos, estima-se que por volta de 8000 anos A.C os sumérios e os assírios desenvolveram a arte de fabricar cerveja (Aquarone 2013).

O setor cervejeiro em 2013, segundo dados da CervBrasil (2014), produziu 13,5 bilhões de litros do líquido no Brasil, gerando um faturamento da ordem de R\$ 70 bilhões e movimentando uma cadeia produtiva responsável por 2 % do PIB (Produto Interno Bruto) e 15 % da indústria de transformação nacional.

As cervejas são classificadas pela legislação brasileira de diferentes formas, em função das características da fermentação e do produto acabado (SINDICERV 2015; Aquarone 2013).

- Quanto ao extrato primitivo: leve (> 5 % e < 10,5 %), comum (> 10,5 % e < 12 %), extra (>12,0 % e <14 %) e forte (> 14 %);
- Quanto à cor: clara (menos de 2 unidades EBC) e escura (20 ou mais unidades EBC(*European Brewery Convention*));
- Quanto ao teor alcoólico: sem álcool (menos de 0,5 % em volume de álcool), alcoólica (igual ou maior a 0,5 % em volume de álcool);
- Quanto à proporção de malte de cevada: cerveja puro malte (100 %, em peso, de malte de cevada), cerveja (>50 %, em peso, de malte de cevada) e cerveja com o nome do vegetal predominante (<20 % e <50 % em peso de malte de cevada);
- Quanto à fermentação: *Ale* ou alta fermentação, cujas leveduras flutuam ao final da fermentação; *Lager* ou baixa fermentação, cujo levedo fica depositado no fundo do tanque no final do processo fermentativo.

2.2 Matérias-primas

A antiga lei da pureza da cerveja (*Reinheitsgebot*) publicada em 1516, na Bavária – região meridional da Alemanha –, estabelece que esta bebida deva ser produzida exclusivamente com malte, lúpulo e água, sem qualquer aditivo (Aquarone 2013). Vários outros países produtores, no entanto, adicionam também adjuntos aos três ingredientes básicos.

2.2.1 Malte

Segundo (Palmer 1995), estudos mostram evidências de que a cevada é um grão utilizado desde o Antigo Egito na produção de pães e bebidas. Apesar de vários cereais como trigo, sorgo, aveia, arroz e milho poderem ser transformados em malte, através dos processos de maceração e germinação, o malte de cevada é o preferido na produção de cervejas do tipo *Lager*, *Ale* e *Stout*. A quantidade e a qualidade do malte utilizado possuem efeito direto em propriedades características da cerveja produzida, dentre elas, cor, espuma e aroma (Bamforth 2009).

A eficiência da malteação depende da operação ótima das funções fisiológicas da cevada que está sendo maltada (Palmer 2004). Cada estrutura que compõem o grão é responsável por uma característica do malte produzido. O processo é dividido em 3 etapas: maceração, germinação e secagem, como ilustrado na Figura 2.1.

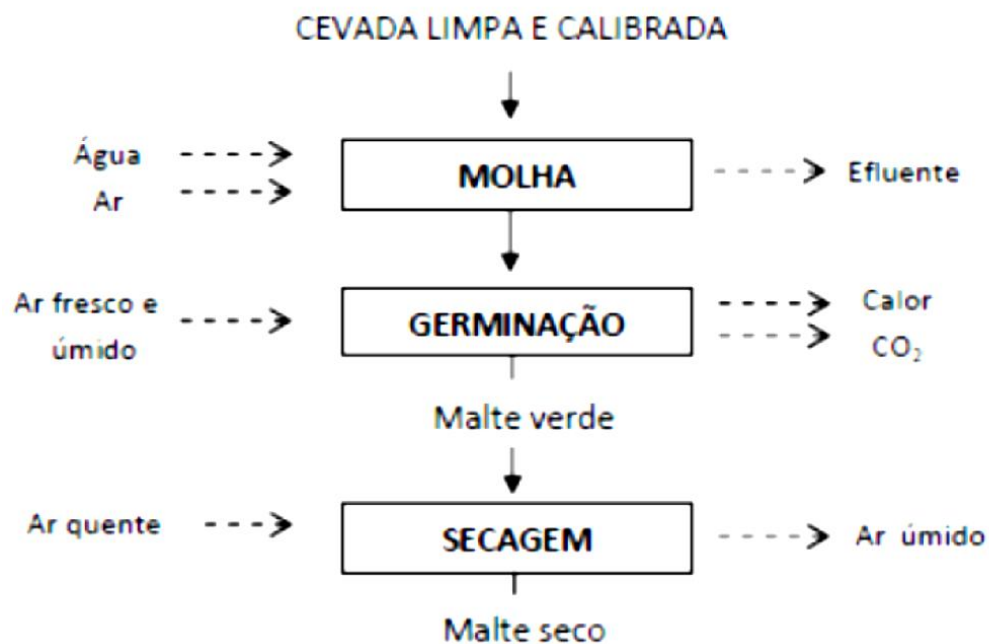


Figura 2.1. Etapas do processo de malteação. Fonte: (EBC 2004)

A primeira fase da malteação é a maceração. Nesta etapa, a umidade relativa do grão é aumentada de aproximadamente 11 % até 45 % para que a cevada fique em condições adequadas para germinar. O oxigênio necessário à respiração do embrião da cevada é fornecido através da injeção de ar nos tanques durante as trocas das águas de maceração (Aquarone 2013).

A segunda fase do processo é a germinação. O potencial de germinação é um dos índices mais importantes para a qualidade do processo de malteação (Bryce et al. 2010). É nesta etapa que ocorre o aumento do poder diastático do malte, ou seja, a elevação do conteúdo enzimático através da síntese e ativação das enzimas amilases, glucanases e proteases, de acordo com a Figura 2.2. , que apresenta as organelas do grão e as enzimas produzidas.

A aleurona é a organela responsável pela produção destas enzimas e é estimulada pelo ácido giberélico proveniente do embrião que está germinando. As enzimas produzidas quebram as cadeias de amido e proteínas do grão disponibilizando substrato solúvel e aminoácidos essenciais para etapas posteriores do processo cervejeiro (Palmer 1995). A solubilização do amido e das proteínas são medidas, respectivamente, pela densidade do mosto e pela razão do nitrogênio solúvel e o total de nitrogênio no grão (Bryce et al. 2010).

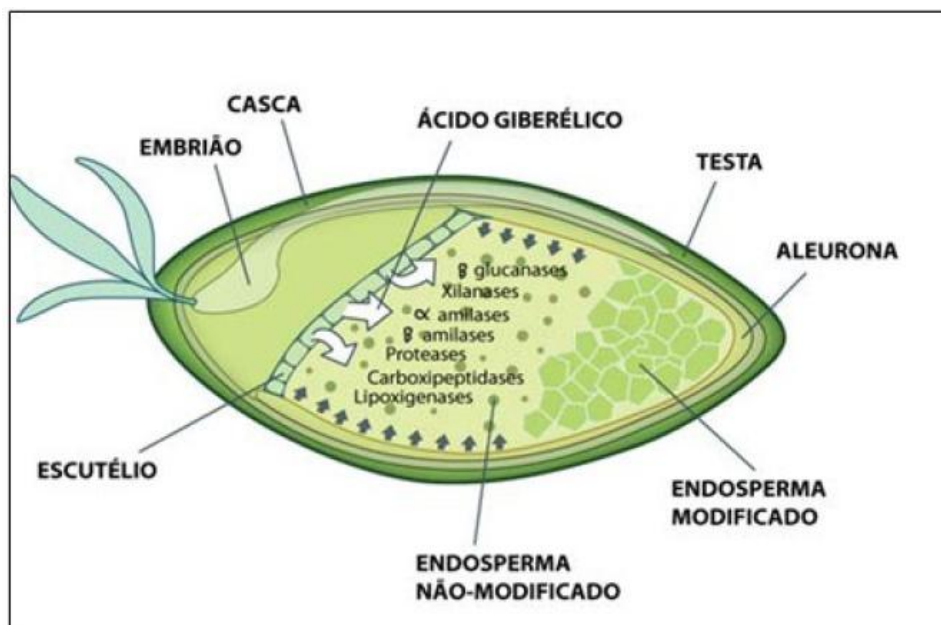


Figura 2.2. Grão de malte durante o processo de germinação. Fonte: (<http://www.camunbeer.com.br/>)

A etapa final do processo de malteação é a secagem. Nesta etapa, ocorre a inibição da atividade enzimática e a redução da umidade do grão de 45 % para 5 %, a fim de interromper as reações bioquímicas de dentro do grão. Outros efeitos como a definição de características organolépticas do produto ocorrem neste momento. A resultante do processo são grãos com alto potencial enzimático, extrato e proteínas solubilizadas para serem utilizados durante o processo de produção de cerveja (Palmer 2004).

2.2.2 Lúpulo

O lúpulo utilizado na fabricação da cerveja são as flores secas da planta fêmea do lúpulo (*Humulus lupulus*), que é natural de zonas temperadas no hemisfério norte (Feistler 2014). O objetivo principal do lúpulo é conferir amargor e aroma à cerveja, duas características sensoriais muito importantes (Lewis e Bamforth 2006). Os alfa-ácidos são os compostos responsáveis pelo sabor característico do lúpulo dentro da cerveja. Quando

adicionadas ao mosto, na etapa de fervura do mosto, as moléculas de alfa-ácidos são isomerizadas e solubilizam-se no mosto (Aquarone 2013).

2.2.3 Água Cervejeira

A água representa a maior parte da cerveja, em torno de 90 % em volume, exercendo grande influência sobre a qualidade da mesma. A água a ser utilizada no processo de produção de cerveja não deve apenas satisfazer os requisitos de uma água potável, mas deve apresentar características específicas para assegurar um pH desejável da mistura de malte e adjunto durante a mosturação, promover extração de princípios amargos e aromáticos do lúpulo, bem como uma boa coagulação proteica durante a fervura do mosto; permitir uma fermentação asséptica e desenvolver cor, aromar e sabor característicos do tipo de cerveja a ser fabricada (Lewis e Bamforth 2006).

A cerveja *Pilsen*, por exemplo, necessita de água mole para a sua produção, isto é, pobre em cálcio e magnésio, na forma de cloretos, sulfatos e bicarbonatos (Aquarone 2013).

2.2.4 Adjuntos

Com intuito de aumentar a produção sem a necessidade de aumentar a dimensão das instalações, tem-se tornado comum em cervejarias com alta escala de produção a utilização da tecnologia de *high-gravity brewing* (Mikulski, Kłosowski, e Rolbiecka 2015). Esta forma de produção do mosto é também conhecida como de alta densidade, onde o mosto poderá ter elevadas concentrações de açúcar, requerendo então uma diluição da cerveja em uma etapa posterior. Não há regra geral com relação à utilização de adjunto, cada cervejaria deve definir a proporção malte/adjunto para cada tipo de cerveja que produz (Aquarone 2013).

Adjuntos são materiais formados por carboidratos não maltados, com composição e propriedades que complementam ou suplementam de forma benéfica o malte de cevada. Os adjuntos podem ser divididos em dois grupos: um necessita de tratamento enzimático para a quebra das cadeias de amido na sala de brassagem e o outro não, pois passou por este tratamento antes de sua comercialização (Ryder e Power 2004). Segundo D'Avila *et al* (2012), o *grits* é um exemplo de adjunto com alta concentração de amido que necessita receber o tratamento dentro da sala de brassagem. Ele é produzido a partir do milho degerminado, após moagem e classificação granulométrica. A alta maltose também é um composto proveniente do milho, no entanto não requer tratamento dentro da cervejaria e pode ser adicionada no cozinhador de mosto.

2.3 Processo Fermentativo

O processo fermentativo é a etapa da produção de cerveja em que ocorre a conversão dos açúcares do mosto cervejeiro em etanol e gás carbônico. Para realizar este processo são utilizadas leveduras. As leveduras utilizadas na produção de cerveja pertencem à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. A seleção de leveduras, que apresentam boas características cervejeiras, pode ser feita a partir de cepas (raças) existentes na própria cervejaria, em outras fábricas que utilizam processo tecnológico semelhante ou, ainda, em coleções de cultivos mantidos por laboratórios em várias partes do mundo (Aquarone 2013).

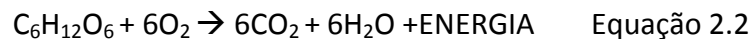
Na fabricação de cerveja, as leveduras são capazes de utilizar determinados açúcares com o auxílio de enzimas: sacarose, glicose, frutose, maltose e maltotriose (Russell 2004). Estes açúcares são definidos como açúcares fermentescíveis. A maioria de cepas de cerveja não consegue metabolizar açúcares com cadeias maiores, como a maltotetraose e outras dextrinas. Estes, portanto, são os açúcares não-fermentescíveis.

A glicose é o açúcar preferencialmente consumido pelos microorganismos do processo cervejeiro, porém, um excesso deste açúcar no fermentador pode inibir o consumo de maltose e maltotriose (Russell 2004). Como estes dois açúcares representam a maior parte da composição do mosto cervejeiro, a disposição da levedura para consumi-los é vital para a ocorrência de uma boa fermentação.

As leveduras cervejeiras podem catabolizar (quebrar) açúcares seguindo dois caminhos metabólicos distintos. Sob condições de anaerobiose elas fermentam uma molécula simples de açúcar, glicose, por exemplo, produzindo duas moléculas de etanol, duas de gás carbônico e energia, conforme mostra na Equação 2.1 .



Na presença de oxigênio, a levedura pode oxidar completamente as moléculas de açúcar e produzir gás carbônico, água e energia (Aquarone 2013), conforme mostrado na Equação 2.2.



Para o cervejeiro as duas vias metabólicas são importantes. A via respiratória – energeticamente mais eficiente – é utilizada no início do processo de fermentação, com a finalidade de promover o crescimento e o revigoramento do fermento. A via fermentativa tem a função de promover a transformação do mosto em cerveja, através da conversão do açúcar em álcool e gás carbônico (Aquarone 2013).

Na fermentação conduzida pelo processo de batelada, o tipo de levedura determina o tipo de fermentação: alta ou baixa. Na alta fermentação, o agente fermentativo é a levedura *ale* e no final do processo o microorganismo tende a subir para a superfície do mosto. Durante a inoculação, o mosto deve estar na temperatura entre 14 °C e 18 °C. A baixa fermentação é conduzida utilizando a levedura *lager* em tanques com fundo cônico, por causa da decantação do microorganismo que ocorre no final do processo. A inoculação do mosto deve ocorrer de 10 a 15 °C (Oetterer 2010).

2.4 Tecnologia na Elaboração da Cerveja

O processo de produção de cerveja tem seu início na sala de brassagem de uma cervejaria, que engloba operações unitárias como a moagem do malte, mosturação, filtração, fervura, decantação, aeração e resfriamento do mosto. O processo de brassagem é a etapa onde o subtrato que entrará na fermentação é preparado. É na fermentação que o substrato transforma-se na cerveja propriamente dita, que será filtrada e envasada posteriormente.

2.4.1 Moagem

Na moagem do malte, o grão deve ter sua casca rasgada longitudinalmente, para deixar exposto o endosperma amiláceo. Este, deve ser triturado para facilitar o ataque

das enzimas durante a mosturação. É importante que, na moagem do malte, a produção de farinha fina seja mínima, a fim de evitar o entupimento da malha filtrante durante a filtração do mosto. O tipo de moinho (de rolos ou de martelo) a ser utilizado está diretamente relacionado com o equipamento de filtração, tina filtro ou filtro prensa (Aquarone 2013).

2.4.2 Mosturação

Ao processo de transformação das matérias-primas cervejeiras (água, malte, lúpulo e adjunto) em mosto, denomina-se mosturação ou brassagem (Aquarone 2013). O objetivo principal da mosturação é solubilizar através de ação enzimática o amido contido nos grãos de malte produzindo extrato e outros nutrientes (Green 2015). A hidrólise do amido durante este processo ocorre pela ação do complexo enzimático fornecido pelo malte, principalmente as enzimas alfa e beta-amilase. Estas enzimas formam açúcares fermentescíveis e açúcares não fermentescíveis. O mosto cervejeiro é composto geralmente de 75 % de açúcares fermentescíveis, sendo 10 % de glicose, 45 % maltose, 15 % maltotriose e 5 % sacarose. Os 25 % de açúcares não fermentescíveis são divididos em 10 % maltotetraose e 15 % dextrinas (Barnes 2004).

A mosturação ocorre em um tanque denominado tina de mosturação ou mosturador, como ilustrado na Figura 2.3 . Para adjuntos amiláceos, como o grits de milho, é necessário preparar o adjunto juntamente com malte e água em um cozedor de cereal. Neste segundo tanque, as enzimas do malte solubilizam o amido do adjunto. Quando o amido estiver solubilizado, esta massa é transferida para a tina de mosturação e continua-se o processo. Quando se utilizam adjuntos amiláceos pré-gomificados, como os flocos de milho, dispensa-se a utilização deste segundo tanque (Aquarone 2013).



Figura 2.3 Tina de mostura ou Mosturador de uma cervejaria. Fonte: (<http://www.engenharia-brasil.com>)

As reações que ocorrem na tina de mostura são controladas segundo uma curva de temperatura, composta por rampas de aquecimento e patamares de repouso. Para que todas as enzimas de interesse estejam ativas, o pH do meio também deve ser ajustado. A Figura 2.1 apresenta um resumo da atuação das enzimas e suas respectivas condições ótimas de pH e temperatura.

Tabela 2.1 Atuação enzimática e suas respectivas condições ótimas de pH e temperatura.

Fonte: (Tschope 2001).

| Enzima | Atuação | pH | Temperatura [°C] |
|-------------------|--|-----------|------------------|
| Hemicelulase | Decomposição da hemicelulose para glucanos de baixa e média massa molar | 4,5 a 4,7 | 40 a 45 |
| Exo-Peptidade | Decomposição das proteínas de alta e média massa molar | 5,2 a 8,2 | 40 a 50 |
| Endo-Peptidase | Decomposição das proteínas para produtos intermediários de alta e média massa molar | 5,0 | 50 a 60 |
| Dextrinase | Desagregação do amido para maltose e maltotriose pela desagregação das combinações 1-6 | 5,1 | 55 a 60 |
| β - amilase | Decomposição do amido para maltose pela desagregação das combinações 1-4 | 5,4 e 5,6 | 60 a 65 |
| α -amilase | Decomposição do amido para dextrinas inferiores pela desagregação das combinações 1-4 | 5,6 e 5,8 | 70 a 75 |

Por ser um processo dependente da temperatura, o equipamento utilizado é revestido com uma camisa de vapor (Barnes 2004). Para assegurar uma homogeneidade na temperatura da mostura, as tinas são providas de um agitador, normalmente com duas hastes, instalados no fundo do equipamento. A Figura 2.4 ilustra o sistema de controle de temperatura e agitação do equipamento. Na entrada da camisa de vapor há uma válvula que tem sua abertura controlada conforme a pressão de vapor necessária para o aquecimento. Há também três saídas de vapor condensado, para que o mesmo retorne para a área de utilidades da cervejaria.

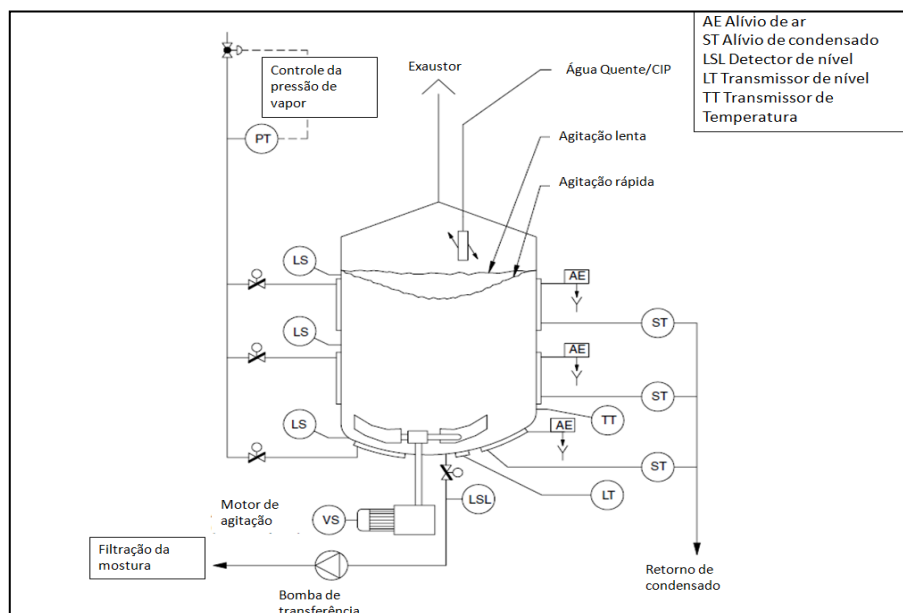


Figura 2.4 Sistema de controle de temperatura em um mosturador. Fonte: Adaptado de (Barnes 2004)

2.4.2.1 Enzimas Importantes no Processo de Mosturação

O sistema de aquecimento de temperatura em patamares permite ao cervejeiro manipular a composição da mostura para adquirir o mosto desejado de acordo com o

tipo de cerveja. Além do mais, a eficiência na remoção dos compostos do malte como extrato e proteínas pode ser aumentada utilizando esta tecnologia (Green 2015). Cada patamar de repouso está relacionado com a ação de uma enzima sobre algum composto do malte. O número de etapas de repouso, a duração de cada uma delas e as temperaturas utilizadas definirão características do mosto como fermentabilidade e filtrabilidade (Muller 1991). O entendimento do comportamento das enzimas portanto, é essencial para a manipulação dos tempos e temperaturas dos repousos da curva de mosturação.

As enzimas são moléculas de proteína que atuam como catalisadores biológicos. A atividade de uma enzima é definida pelo formato do seu sítio ativo, ou seja, existe apenas um tipo de molécula na qual a enzima pode atuar (Branco *et al.* 2009). As enzimas são ativadas e produzidas no processo de malteação da cevada, portanto elas estão presentes no malte (Pozen 1934). As principais enzimas do malte são as amilases, as proteases e as glucanases.

São seis os fatores que influenciam na atuação das enzimas: concentração da mostura, temperatura da mostura, pH da mostura, tempo de repouso na mostura, concentração de cálcio na mostura e composição da moagem (Feistler 2014). Quando a estrutura de uma enzima é quebrada por excesso de temperatura, ou seja, a enzima é desnaturada, ocorre uma deformação permanente do sítio ativo da mesma, inativando-a (Nelson e Cox 2002).

2.4.2.1.1 Amilases

As amilases são carboidrases capazes de hidrolisar ligações glicosídicas α -1,4 e/ou α -1,6 presentes no amido, no glicogênio e nos sacarídeos derivados. Na mosturação, as amilases têm por função quebrar o amido, polissacarídeo cujo monômero constituinte é a glicose, em moléculas menores (Nelson e Cox 2002). Estes servirão de substrato para a levedura no processo de fermentação (Green 2015).

As alfa-amilases (EC 3.2.1.1) são enzimas largamente distribuídas na natureza, produzidas por animais, vegetais (principalmente em sementes amiláceas, especialmente durante a germinação) e microrganismos. São endocarbohidrases que hidrolisam ligações α -1,4, existentes na amilose e amilopectina de forma aleatória, na porção central das moléculas (Koblitz 2013).

As beta-amilases (EC 3.2.1.2) são exoenzimas que hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,4 do amido, a partir da extremidade não redutora, liberando unidades de maltose. O resultado da hidrólise de amilose por beta-amilases é cerca de 90 % de maltose e 10 % de glicose e maltotriose (Koblitz, 2013). A Figura 2.4 representa a interação das amilases com o amido e os respectivos açúcares produzidos.

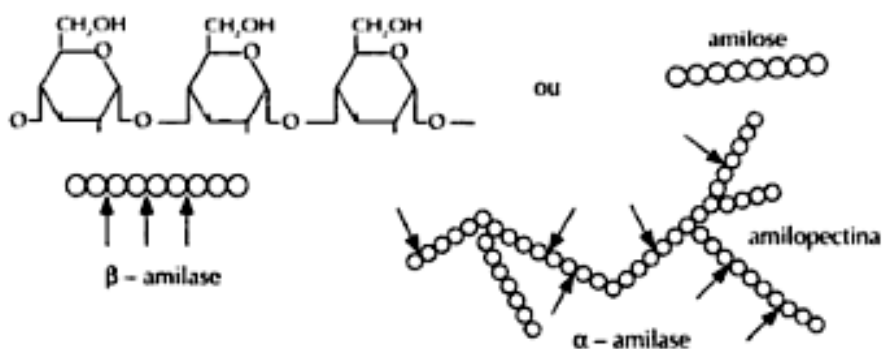


Figura 2.5 Representação esquemática das reações enzimáticas das amilases. Fonte: (Gava, Da Silva, e Frias 1978)

2.4.2.1.2 Proteases

As proteases (EC 3.4) são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases. Elas catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e podem ainda apresentar atividade sobre ligações éster e amida (Koblitz 2013). As enzimas proteolíticas (proteases) atuam na decomposição das proteínas. Proteínas já solubilizadas durante o processo de malteação continuam sendo degradadas (Pozen 1934). Proteínas ainda insolúveis serão degradadas pelas enzimas. Grande parte das enzimas que não foram degradadas durante os processos de malteação e mosturação são eliminadas no bagaço de malte, na etapa de filtração do mosto (Silva 2005).

As proteases podem ser divididas em dois tipos: as endo-peptidases e as exo-peptidases. As endo-peptidases quebram as longas cadeias de aminoácidos na sua parte central, produzindo proteínas de médio e baixo peso molecular. As exo-peptidases quebram as cadeias pelas extremidades, produzindo aminoácidos livres (Nelson e Cox 2002).

2.4.2.1.3 Beta-glucanases

As beta-glucanases (E.C.3.2.1.6) são celulases que realizam a endohidrólise das ligações 1,3- ou 1,4- dos beta-D-glucanos de alto peso molecular (Polaina e Maccabe 2007). Os beta-glucanos são também chamados substâncias gomosas e atuam na decomposição e solubilização do malte durante o processo de malteação. Estas substâncias de alto peso molecular solubilizam-se em água durante a mosturação aumentando a viscosidade do mosto (Nelson e Cox 2002).

2.4.2.2 Influência de Adjuntos no Processo com Elevadas Concentrações

Segundo Muller (1991), mostos de baixa densidade apresentaram amido residual após a mosturação e menos açúcares fermentescíveis, em comparação com mostos de alta densidade. De acordo com o autor, isto ocorre devido às enzimas amilolíticas nas tinas com alta razão cereal/água que tornam-se mais resistentes à inativação térmica e, portanto, ocorre uma atuação enzimática mais prolongada.

Em processos que utilizam a tecnologia de mostos com alta densidade, é comum a utilização de adjunto como, por exemplo, flocos de milho, para diminuir o custo de

produção de cerveja. A adição destes adjuntos, no entanto, deve ser controlada para não afetar a qualidade do mosto (D'Avila *et al.* 2012). O principal impacto da adição de adjuntos é a concentração de compostos nitrogenados, medidos pelo FAN, que servem de nutrientes para as leveduras durante a fermentação.

Uma alternativa para suprir a falta de compostos nitrogenados é a adição de complexos enzimáticos para aumentar a digestão de proteínas na massa e fornecer o nitrogênio mais solúvel (Ryder e Power 2004). Os complexos enzimáticos também são utilizados para suprir ocasionais não homogeneidades de enzimas no malte, resultantes de alguma alteração durante a malteação da cevada (Bamforth 2009).

2.4.2.3 Influência da temperatura e do tempo de repouso na atividade enzimática

Para decidir o número de repouso, as temperaturas e as durações de cada um, é necessário levar em conta o tipo de cerveja e qual o perfil sensorial da mesma. A curva de mosturação para uma cerveja *Stout*, por exemplo, não apresenta repouso proteolítico, como é ilustrado na Figura 2.6 . O repouso proteolítico é responsável pela quebra das cadeias de proteínas que compõe a espuma da cerveja. Tendo em vista que esta cerveja tem como característica uma espuma mais consistente, o repouso proteolítico não foi utilizado, para evitar o rompimento das cadeias peptídicas de alto peso molecular (Papazian 2004).

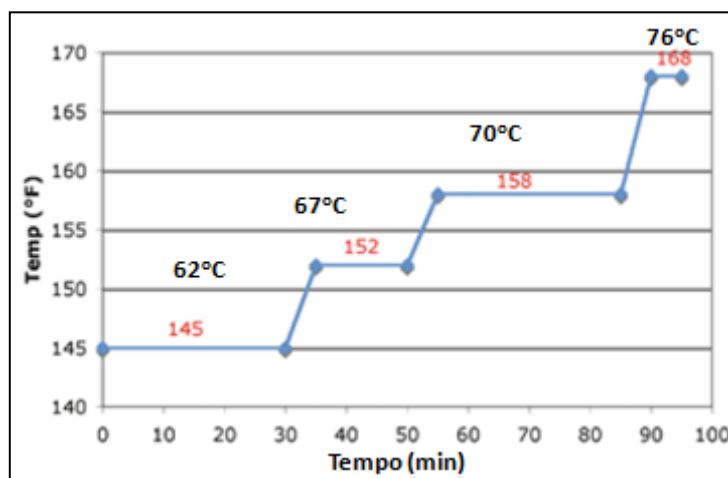


Figura 2.6 Curva de mosturação em patamares de temperatura para cerveja *Stout/Ale*. Fonte: Adaptado de (Green 2015).

Para cervejas do tipo *Pilsen*, pode-se utilizar 5 repouso referentes às enzimas beta-glucanases, proteases, beta-amilases, amilases e inativação enzimática, como ilustrado na Figura 2.7 .

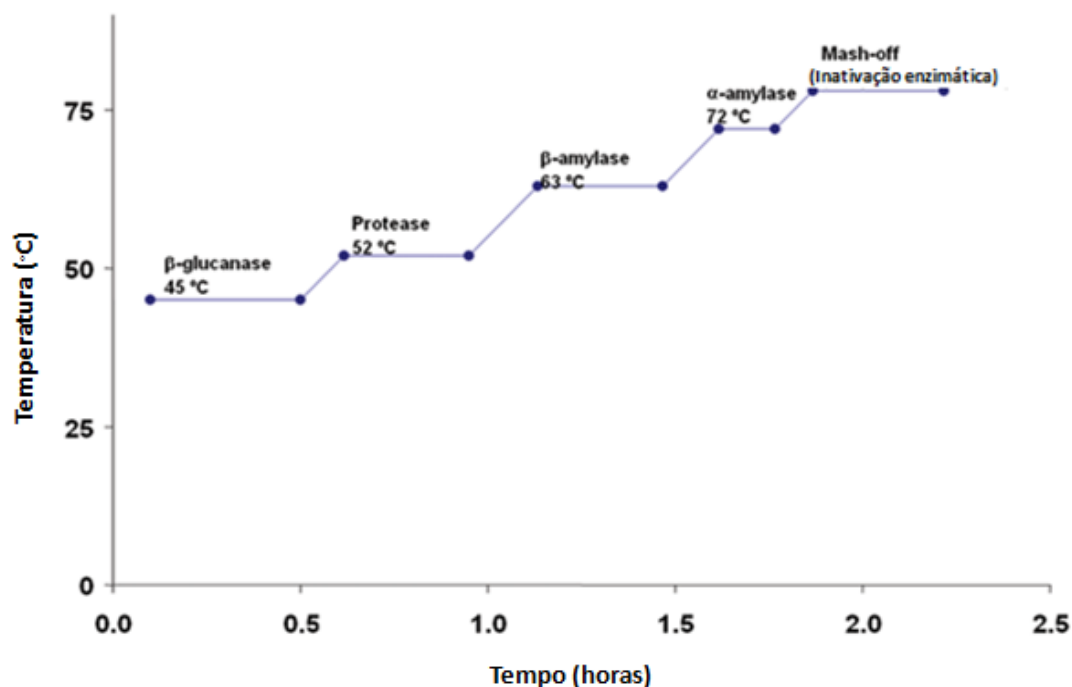


Figura 2.7 Curva de mosturação em patamares de temperatura para cerveja *Pilsen/Lager*.
Fonte: Adaptado de (Green 2015)

Várias glucanases são ativas por até cerca de 60 °C, mas a mais importante glucanase, (1,3,1,4)-betaglucanase, tem uma temperatura ótima em torno de 45 °C. Betaglucanos são encontrados em concentrações mais elevadas em centeio, trigo, aveia e maltes que não tiveram o amido totalmente solubilizado (Green 2015). Tendo em vista que os maltes utilizados para fabricações de cerveja *Pilsen* tem seu conteúdo amiláceo totalmente solubilizado no processo de malteação, pode-se desconsiderar o repouso das beta-glucanases (Beleti, Duarte, e Georg-Kraemer 2012).

Sendo assim, o primeiro repouso da rampa de mosturação de uma cerveja *Pilsen* é o repouso proteolítico. Este repouso normalmente opera na temperatura de 44 °C a 59 °C, com uma duração de 15 a 30 minutos (Green 2015). Os dois tipos de proteases, as endo e as exo, possuem faixas de temperatura ótima de operação diferente de 50 a 60 °C e 40 a 50 °C, respectivamente (Feistler 2014). Lei e colaboradores (2013), estudando a mudança na concentração de aminoácidos livres através da adição de proteases comerciais (Neutrase, Flaorzyme e Protamex) no mosto, mostraram que uma otimização na atuação enzimática das proteases afeta diretamente a quantidade de FAN do mosto e consequentemente melhora a fermentação. Uma liberação excessiva de aminoácidos causada por atividade excessiva das proteases, no entanto, impacta na espuma de cerveja que é composta por proteínas. Um equilíbrio entre FAN e espuma, portanto, deve ser encontrado para satisfazer os requisitos sensoriais de cada cerveja.

O segundo e o terceiro repouso é quando ocorre a atuação das amilases. Muller (1991), utilizando um sistema de mosturação em pequena escala, com a adição de 1,5 kg de malte de cevada e 3,75 L de água (razão água/malte de 2,5:1), comparou a estabilidade das enzimas alfa e beta-amilase na temperatura de 65°C. Após 60 minutos de teste, a atividade da alfa-amilase manteve-se em 50 % e a da beta-amilase caiu para

menos de 10 % da atividade no início do processo. O fator de decaimento da atividade enzimática pode ser representado pela Equação 2.1, onde A_0 é atividade da enzima no início do experimento, t é o tempo e k o fator de decaimento.

$$A = A_0 e^{-kt} \quad \text{Equação 2.3}$$

O fator de decaimento k foi quase 4 vezes maior para a enzima beta-amilase, como ilustrado na Figura 2.8. Além disso, o autor calculou o potencial de atividade das enzimas, ou seja, a conversão do composto respectivo de cada uma por grama de malte presente na mostura. A atividade total da alfa-amilase foi aproximadamente 25 vezes maior que a atividade da beta-amilase, ou seja, a alfa-amilase converteu 25 vezes mais amido por grama de malte, do que a beta-amilase produziu de maltose por grama de malte. Com isso, o autor concluiu que a perda de atividade da alfa-amilase influenciaria menos a concentração de amido do que a perda de atividade da beta-amilase influenciaria a concentração de maltose.

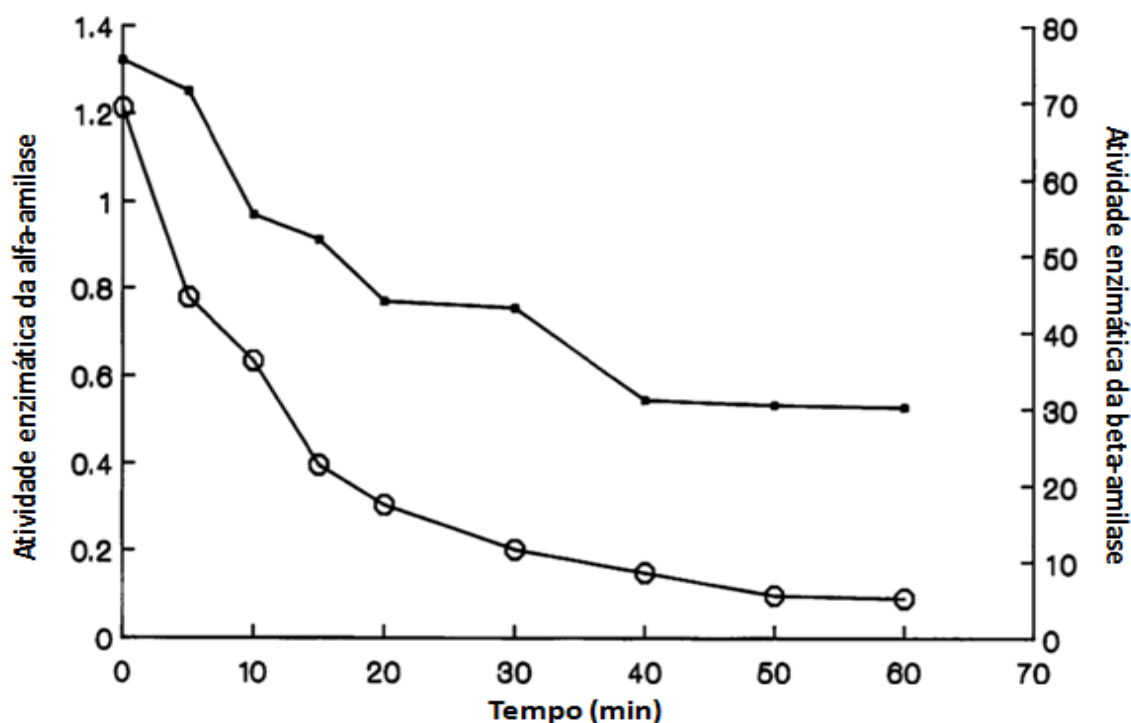


Figura 2.8 Inativação das enzimas amilolíticas do malte na temperatura de 65°C. A atividade da alfa-amilase (■-■) é apresentada em gramas de dextrinas hidrolisadas por minuto por grama de malte. A atividade da beta-amilase (o-o) é apresentada em gramas de maltose produzida por minuto por grama de malte). Fonte: (Muller 1991)

Segundo Bamforth (2009), o terceiro repouso pode ter até 60 minutos de duração. No entanto, Green (2015), fala que para diversos tipos de malte a conversão do amido ocorre de forma mais rápida e o repouso pode ser interrompido assim que a reação com o iodo não apresentar mais mudanças de coloração.

Temperaturas de terceiro repouso fora da especificação impactarão no aumento do tempo necessário para a reação negativa ao iodo pela redução da atividade da alfa-amilase (Feistler 2014).

No último repouso, realizado a temperaturas acima de 75 °C, ocorre a inativação enzimática por temperatura (Bamforth 2009). A inativação das enzimas ou redução significativa da sua atividade tem como objetivo estabilizar a composição de extrato do mosto (Lewis e Bamforth 2006). O tempo deste repouso normalmente é apenas o tempo de transferência do mosto para a próxima etapa.

2.4.3 Filtração, Fervura e Preparo do Mosto

Ao final da mosturação, quando as enzimas já estão inativas, o mosto procede para a etapa de filtração ou clarificação, para ser realizada a retirada do bagaço, massa resultante da aglutinação da casca com resíduos do processo (Oetterer 2010). Esta etapa pode ser realizada em tinas filtro, por sedimentação natural, ou em filtros prensa, que utilizam telas para reter a massa que deseja ser separada do mosto (Silva 2005).

Na etapa seguinte, há acréscimo de lúpulo e o mosto é fervido. Os objetivos desta etapa são a inativação das enzimas, esterilização do mosto, coagulação proteica, extração de compostos aromáticos e amargos do lúpulo, formação de substâncias constituintes do aroma e sabor, evaporação de água excedente e de componentes aromáticos indesejáveis no produto final (Barnes 2004).

Antes do mosto seguir para a etapa de fermentação, é necessário finalizar o seu tratamento através da retirada do precipitado, também chamado de *trub*, em um decantador; resfriar o mosto e aerar o mesmo com o objetivo de melhorar a atuação das leveduras (Silva 2005).

2.4.4 Obtenção da Cerveja

No processo cervejeiro, vários subprodutos desenvolvem-se durante a fermentação, produtos intermediários permanecem no líquido e componentes do mosto são assimilados pela levedura (Silva 2005). As leveduras produzem os compostos ativos do aroma e do sabor da cerveja como subprodutos da síntese necessários ao seu crescimento e metabolismo. Além da influência das condições de fermentação, temperatura e duração do processo fermentativo, a concentração e composição do mosto influenciam diretamente nas características sensoriais da cerveja (Barnes 2004).

2.5 Parâmetros de Qualidade do Mosto

A determinação das características do mosto através de parâmetros de qualidade é importante na obtenção de informações quanto ao desenvolvimento do processo de mosturação e na identificação do impacto desse mosto no processo de fabricação de cerveja (Barnes 2004).

Esses parâmetros de qualidade são compostos por análises físico-químicas, sensoriais e fisiológicas realizadas através de métodos oficiais e padronizados por entidades reconhecidas, tais como *European Brewery Convention* (EBC 2004).

2.5.1 Extrato do Mosto Primário

A análise de extrato determina todas as substâncias que foram solubilizadas no processo de mosturação. Quanto maior seu valor, melhor será o rendimento da sala de brassagem, na fabricação de cerveja (Feistler 2014). A análise é realizada em um densímetro digital, que mede a densidade do mosto em grau plato (°P), unidade que representa a concentração (em massa) das substâncias dissolvidas no mosto (EBC 2004).

2.5.2 FAN

Free Amino Nitrogen, abreviado como FAN, é a quantidade de nitrogênio livre na forma de aminoácidos que compõem o mosto. Este composto serve de nutriente para a levedura e tem impacto no aumento da multiplicação celular e fermentabilidade do microrganismo. A concentração de FAN no mosto está diretamente associada ao desempenho das proteases durante a mosturação (Lei *et al* 2013). Concentrações em torno de 160 mg.L^{-1} são consideradas aceitáveis (Feistler 2014)

2.5.3 Grau de Fermentação Aparente Final (GFAF)

Indica a relação entre o extrato fermentável e o extrato original do mosto. Considerando um mesmo extrato original, quanto maior o GFAF, maior será o teor de álcool na cerveja pronta, menor será o extrato aparente (teor de dextrinas) e mais leve e menos encorpada será a cerveja (Feistler 2014).

2.5.4 Reação com Iodo

Moléculas de alto peso molecular (como a amilose e a amilopectina) podem sofrer reações de complexação, com formação de compostos coloridos (Nelson e Cox 2002). Um exemplo importante é a complexação da amilose e da amilopectina com o iodo, resultando em complexo azul e vermelho-violáceo, respectivamente. A Figura 2.9 esquematiza a interação do iodo com a estrutura do amido. O aprisionamento do iodo dá-se no interior da hélice formada pela amilose. Como a amilopectina não apresenta estrutura helicoidal, devido à presença das ramificações, a interação com o iodo será menor e a coloração, menos intensa.



Figura 2.9 Aprisionamento da molécula de iodo na cadeia helicoidal da amilose.

Fonte: (http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_ch/teste_amido.html)
acessado em 15 de novembro de 2015.

O teste do iodo é realizado através da adição de gotas de solução de iodo 0,02 % a 1 mL de mostura. Resultados positivos (coloração azul ou violácea) indicam a presença de amido não degradado e impedem a continuidade do processo devido a problemas de filtrabilidade, turbidez e estabilidade do produto. O resultado desejado é a reação negativa ao iodo, que apresenta coloração amarela (Feistler 2014).

2.5.5 Grau de Sacarificação

Quanto maior for o grau de sacarificação menor terá sido a conversão amilolítica. Resíduos de amido não degradado podem provocar problemas de fermentação, filtrabilidade, turbidez e estabilidade coloidal da cerveja pronta (Feistler 2014).

3 Materiais e Métodos

O estudo de caso de melhoria no processo de mosturação foi desenvolvido em uma Sala de Brassagem de uma cervejaria situada no Rio Grande do Sul, portanto o mapeamento e a descrição do processo produtivo característico da unidade estão diretamente ligados a metodologia aplicada.

3.1 Descrição do Processo

A capacidade produtiva nominal da planta da empresa é de 700000 hL de cerveja por mês. O processo de produção de cerveja inicia em duas Salas de Brassagem, com a produção de bateladas de mosto de alta densidade, que serão posteriormente diluídas 1,4 vezes na etapa de Filtração da Cerveja. O experimento foi realizado na Sala 2 de Brassagem do departamento de Processo Cerveja, que produz 1100 hL de mosto por fabricação.

A etapa inicial da sala de Brassagem é a arriada do malte, também chamada de *mashing-in*. Nessa etapa, o malte previamente moído em um moinho tipo martelo é transferido para a tina de mostura. Antes da adição do malte, a tina de mostura recebe uma quantidade de água quente a 47 °C, o qual tem a função de evitar grumos e promover uma mistura homogênea. O controle da temperatura da água é fundamental, porque as reações enzimáticas iniciam nesta etapa e cada enzima possui uma faixa de temperatura ideal.

Na sequência da operação, a água base é adicionada na tina de mostura até a concentração desejada, que é definida pela relação de água e malte estipulada na receita. É importante salientar que uma quantidade de *flakes* de milho é dosada durante a arriada juntamente com o malte, para complementar de forma benéfica e rentável o teor de carboidratos do mosto.

A próxima etapa é a dosagem de cloreto de cálcio em quantidade suficiente para garantir a concentração de íon Ca^{2+} . Este íon presente na mostura protege a atividade da alfa amilase e melhora a filtrabilidade do mosto.

O ajuste do pH é feito pela adição de ácido fosfórico. Quanto maior a dosagem de ácido, menor será o pH de início de mostura. O ácido deve ser dosado, logo após a dosagem de cloreto. A faixa de pH aceitável na mostura é de 5,10 a 5,50.

Após o ajuste do pH, há a adição de complexos enzimáticos de alfa-amilase, beta-glucanase e xilanase que tem por objetivo suprir possíveis não homogeneidades de enzimas no malte.

A tina de mostura utilizada é um tanque de alumínio com volume nominal de 1500 hL, acoplado com um agitador com 2 pás que fornece uma agitação de 500 rpm. O equipamento é dotado de uma camisa de vapor para controle da temperatura. A injeção de vapor é controlada por válvulas reguladoras. O vapor é fornecido a uma pressão de 7 bar por um departamento próprio da fábrica, que utiliza uma caldeira a óleo e 4 caldeiras alimentadas com casca de arroz.

As temperaturas e tempos de repouso são alimentados no sistema de controle pelo operador e, inicialmente, seguia a curva apresentada na Figura 3.1 com pequenas variações entre as fabricações.

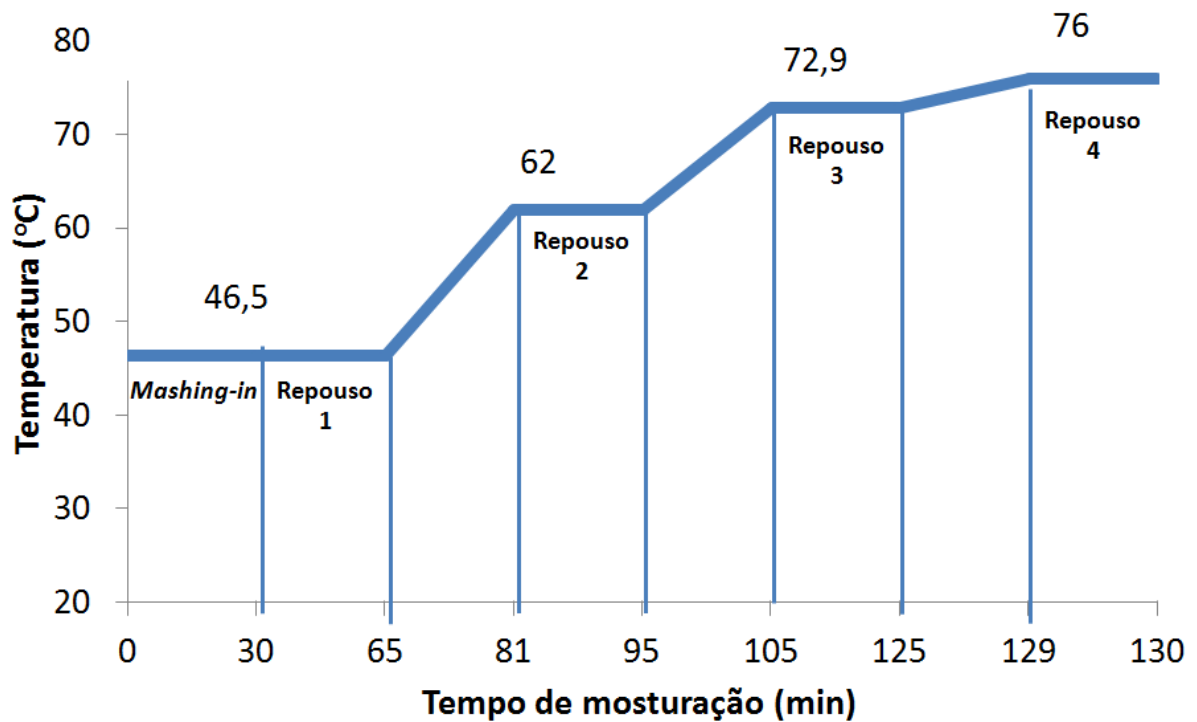


Figura 3.1 Curva de mosturação original da cervejaria.

Ao final do terceiro repouso, é realizado o teste de iodo na mostura. O teste serve para analisar se todo amido da mostura foi hidrolisado e o processo pode continuar elevando a temperatura para inativação das enzimas.

Para análise dos itens de qualidade da mostura, são coletadas amostras do mosto já resfriado, antes de entrar no tanque de fermentação. As amostras são enviadas ao laboratório de qualidade da unidade, afim de que sejam realizadas as análises de FAN, GFAF e Grau de Sacarificação. A análise de extrato do mosto primário é coletada após a primeira etapa de filtração do mosto e analisada pelos próprios operadores.

3.2 Modificações realizadas na Etapa de Mosturação

A modificação nas curvas de temperatura foi realizada com o objetivo de diminuir o tempo de mosturação total no processo sem causar a diminuição dos índices de qualidade do mosto. Primeiramente, foram coletadas amostras da fabricação realizada com a curva original de temperatura utilizada pela unidade. Foram realizadas outras 4 bateladas de fabricações variando as curvas de temperatura e tempos de repouso como ilustrado na Figura 3.1 .

Tabela 3.1 Testes realizados e os respectivos tempos e temperaturas.

| Teste A | Tempo(min) | Temperatura(°C) |
|--------------------|------------|------------------|
| Repouso 1 | 27 | 46,5 |
| Repouso 2 | 14 | 62 |
| Repouso 3 | 16 | 72,9 |
| Repouso 4 | - | 76 |
| | | |
| Teste B (original) | Tempo(min) | Temperatura (°C) |
| Repouso 1 | 35 | 46,5 |
| Repouso 2 | 14 | 62 |
| Repouso 3 | 20 | 72,9 |
| Repouso 4 | - | 76 |
| | | |
| Teste C | Tempo(min) | Temperatura (°C) |
| Repouso 1 | 27 | 50 |
| Repouso 2 | 14 | 65 |
| Repouso 3 | 16 | 69 |
| Repouso 4 | - | 76 |
| | | |
| Teste D | Tempo(min) | Temperatura (°C) |
| Repouso 1 | 20 | 46,5 |
| Repouso 2 | 10 | 62 |
| Repouso 3 | 9 | 72,9 |
| Repouso 4 | - | 76 |
| | | |
| Teste E | Tempo(min) | Temperatura (°C) |
| Repouso 1 | 24 | 46,5 |
| Repouso 2 | 12 | 62 |
| Repouso 3 | 9 | 72,9 |
| Repouso 4 | - | 76 |

3.3 Avaliação dos Parâmetros de Qualidade

Para as amostras coletadas de cada curva foram feitos testes com Iodo, análise da atividade enzimática para amilase e quantificação da concentração de glicose e maltose.

3.3.1 Teste de Iodo

Para a verificação da presença de amido na mostura utilizou-se o teste de iodo. O teste foi realizado utilizando uma solução de iodo 0,02 %. Um cadinho de porcelana com 6 espaços foi utilizado. Cada espaço foi preenchido com 1 mL de amostra e 2 gotas de iodo foram adicionadas a cada espaço. Aguardou-se um minuto para a reação ocorrer e a cor da solução foi conferida.

3.3.2 Atividade Amilolítica

Para a determinação da atividade de α -amilase utilizou-se o método de determinação da atividade amilolítica sacarificante, que é dada pela medida da liberação de grupos redutores utilizando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Branco et al.(2009) com algumas modificações. Primeiramente uma alíquota de cada amostra foi diluída em água destilada na proporção 1:100. A reação contendo 0,1 mL da amostra diluída e 1 mL do reagente DNS, foi incubada em banho-maria a 100 °C por 10 min. Em seguida foi retirada do banho e aguardou-se 15 min para o resfriamento da amostra. Após o resfriamento foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto, utilizando uma curva padrão da glicose de 0,5 g.L⁻¹ (0,55 mmol.mL⁻¹) até 4g.L⁻¹ (22,22 mmol.mL⁻¹) apresentada no Anexo B.

3.3.3 Concentração de Glicose e Maltose

As concentrações de açúcares (glicose e maltose) das amostras coletadas durante as fabricações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento (Shimadzu Corp.) equipado com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) e detector de índice de refração (RID- Shimadzu Corp). A fase móvel usada foi ácido sulfúrico 0,005 M com fluxo de 0.6 mL.min⁻¹ e temperatura do forno de 65°C. Segundo dados do fornecedor da coluna, a maltose elue no tempo de 7,89 minutos e a glicose elue no tempo de 10,16 minutos. Curvas padrões dos dois açúcares preparadas no laboratório foram utilizadas para quantificação.

4 Resultados e Discussão

4.1 Impacto do Tempo do Repouso Proteolítico no FAN do Mosto

O primeiro patamar de temperatura de uma curva de mostura é referente ao repouso proteolítico, responsável pela quebra das proteínas em aminoácidos e em proteínas de alto e médio peso molecular. Os aminoácidos liberados durante este repouso são denominados de *Free Amino Nitrogen* (FAN) e representam a quantidade de nitrogênio livre na mostura, que é um importante nutriente para a levedura nas etapas posteriores do processo.

O *setpoint* dos parâmetros do primeiro repouso anteriormente configurados no programa de controle da tina de mostura da cervejaria eram de 35 minutos de duração a uma temperatura de 46,5 °C. Os valores de FAN resultantes ficavam em torno de 300mg.L⁻¹, valores acima do mínimo descrito por Feister (2014) de 160 mg.L⁻¹, que é utilizado como valor padrão na cervejaria, para fornecer o nível de nutrição necessário para as leveduras.

Tendo em vista a redução do tempo total de residência do mosto na tina de mostura e a possibilidade de redução do tempo do primeiro repouso, devido aos valores acima do limite inferior de FAN requerido pela cervejaria, realizou-se testes para verificar o quanto seria possível reduzir a duração do repouso proteolítico. A análise de FAN dos testes realizados no presente trabalho foram realizadas no laboratório físico-químico da cervejaria.

Inicialmente foi testado o valor de 27 minutos para o repouso. O valor obtido de FAN foi de 281 mg.L⁻¹, ainda acima do limite inferior padrão da cervejaria de 160 mg.L⁻¹. Após o primeiro teste, foi testado o valor de 20 minutos, limite inferior do tempo do primeiro repouso definido pelos padrões técnicos da cervejaria. Foi observado que os valores de FAN ficaram no limite, ficando em 159,9 mg.L⁻¹. O último teste foi realizado com um valor intermediário entre 20 e 27 minutos, definido em 24 minutos gerando um resultado de 207 mg.L⁻¹.

A comparação entre os diferentes tempos do repouso proteolítico mostra que a melhor duração para o primeiro repouso é de 24 minutos. A Figura 4.1 apresenta os resultados obtidos de FAN no mosto em função do tempo do repouso proteolítico. De acordo com Lei et al. (2013), quanto maior for o tempo do primeiro repouso, maior será a atuação das proteases e conseqüentemente mais cadeias peptídicas serão quebradas, aumentando a concentração de aminoácidos livres no mosto.

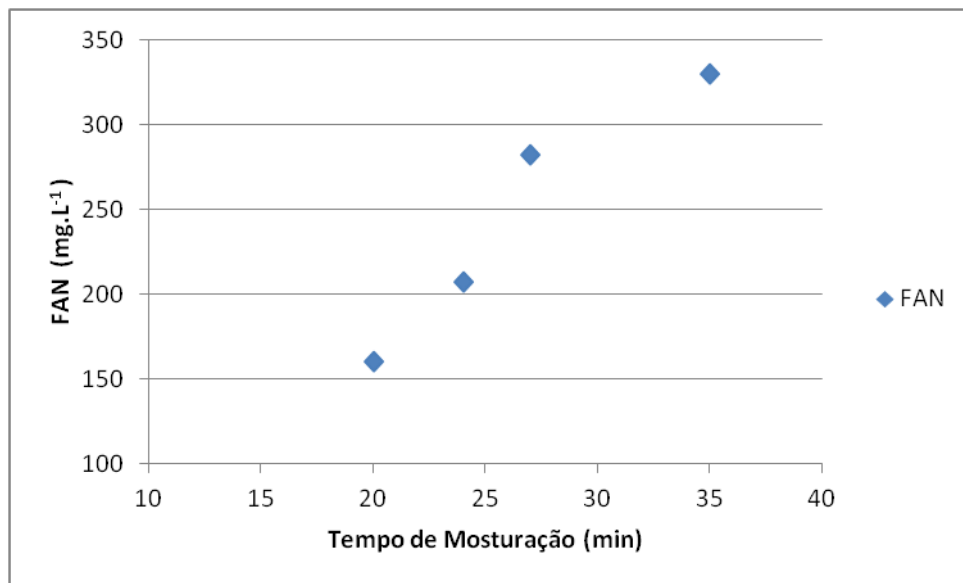


Figura 4.1 Influência do tempo do repouso proteolítico no FAN do mosto.

4.2 Influência da temperatura e do tempo de repouso na atividade da Beta-amilase

A enzima beta-amilase é a responsável pela quebra das cadeias de amido em maltose. A maltose é o principal açúcar que compõe o mosto sendo, portanto, a principal fonte de carboidrato para a levedura durante a fermentação. A atuação desta enzima é controlada pelo segundo repouso.

O *setpoint* dos parâmetros do segundo repouso, anteriormente configurados no programa de controle da tina de mostura da cervejaria, eram de 14 minutos de duração a uma temperatura de 62 °C. Foram testados os tempos de 10 e 12 minutos a temperatura de 62 °C. Foram coletadas amostras a cada início e final de repouso e realizada a quantificação da maltose na amostra.

A maior elevação da concentração de maltose em todas as amostras ocorreu durante a elevação do primeiro para o segundo repouso, como mostra a Figura 4.2 (as linhas que ligam os pontos são meramente ilustrativas e não representam uma tendência de comportamento). Isto ocorreu, pois, conforme descrito anteriormente, é na condição próxima a 62 °C que ocorre em maior intensidade a ação das enzimas beta-amilase, provocando a decomposição do amido para maltose pelo rompimento das combinações 1-4, respectivamente. Após esta etapa, foi verificada uma desaceleração no aumento da concentração de maltose e o término da etapa de mosturação. Koljonen et al. (1995) realizou experimentos em escala industrial, com um volume de 40m³ de mostura, utilizando uma razão de malte e água de 0,25, a fim de avaliar o comportamento da enzima beta-amilase e a variação da concentração de maltose. Os autores verificaram que a desaceleração na taxa de elevação da concentração de maltose coincidiu com o início do decaimento da atividade enzimática da beta-amilase, o que explica os resultados do presente trabalho.

Os cromatogramas referentes à análise das concentrações de maltose encontram-se no Anexo A.

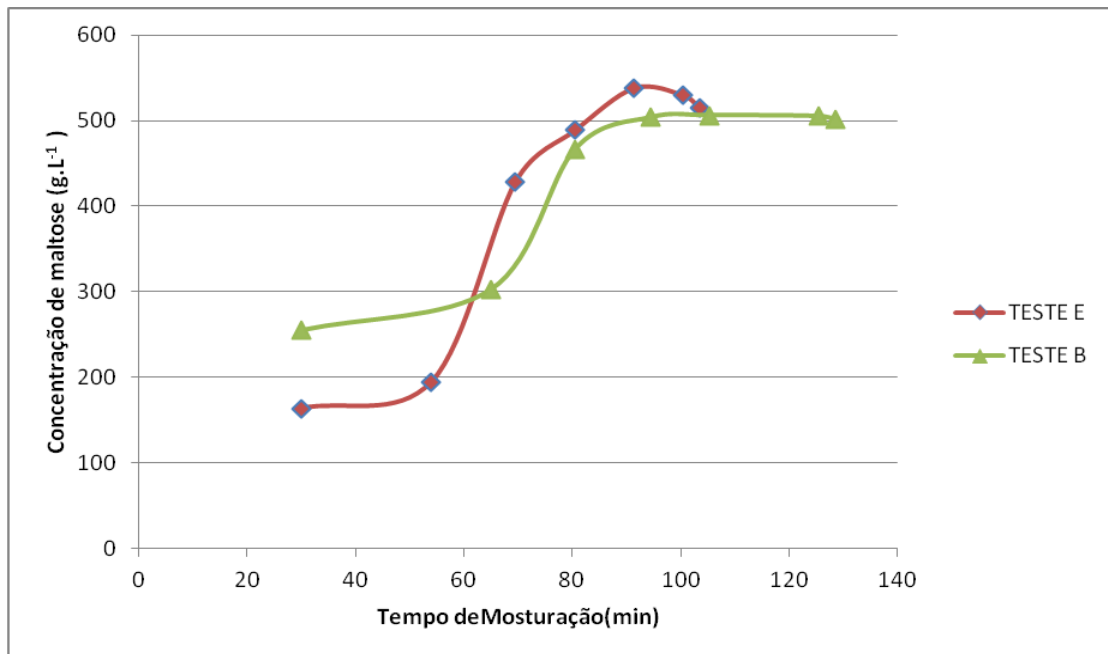


Figura 4.2 Concentração de maltose em diferentes curvas de mosturação.

4.3 Influência da temperatura e dos tempos de repouso na atividade da alfa-amilase

A enzima alfa-amilase é a responsável pela quebra das cadeias de amido em dextrinas, maltotriose e glicose. Amido residual não degradado impacta na filtrabilidade, turbidez e estabilidade do produto. Além disso, a diminuição do tempo de atividade da alfa-amilase diminui a concentração de açúcares fermentescíveis e conseqüentemente o substrato disponível para a levedura na etapa de fermentação. A atuação da mesma ocorre no terceiro repouso.

Em todas as fabricações realizadas em uma cervejaria, é necessário um teste de iodo qualitativo para a verificação rápida da sacarificação da mostura. Este teste é realizado pelos próprios operadores e tem um resultado instantâneo. Além deste teste, é realizado um teste no laboratório físico-químico da unidade, que avalia o amido residual quantitativamente, através de uma reação com iodo, e análise no espectrofotômetro.

4.3.1 Influência avaliada pelo Teste de Iodo

O *setpoint* dos parâmetros do terceiro repouso anteriormente configurados no programa de controle da tina de mostura da cervejaria eram de 20 minutos de duração a uma temperatura de 72 °C. Através da coleta das amostras a cada início e final de repouso foi observado que o teste de iodo já apresentava resultado negativo (coloração dourada) no início do terceiro repouso, como mostra a Figura 4.3. Além disso, os valores das análises de grau de sacarificação resultantes apresentavam valor abaixo de 0,2 dE, valor definido pelos padrões técnicos de processo da cervejaria.

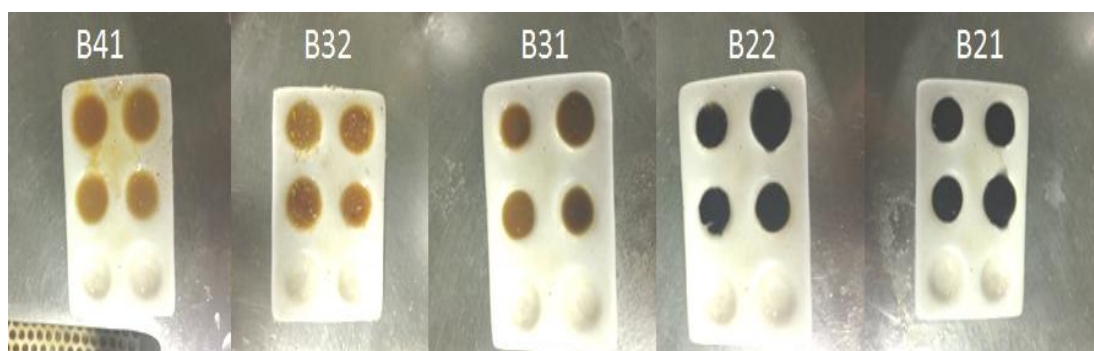


Figura 4.3 Teste de iodo para as amostras da curva de mosturação original utilizada pela cervejaria (B41 = início do repouso 4, B32 = final do repouso 3, B31 = início do repouso 3, B22 = final do repouso 2 e B21 = início do repouso 2).

Tendo em vista a redução do tempo total de residência do mosto na tina de mostura e a possibilidade de redução do tempo do terceiro repouso, devido aos valores abaixo do limite superior da análise de grau de sacarificação e ao teste de iodo qualitativo, realizou-se testes para verificar o quanto seria possível reduzir a duração do terceiro repouso.

Além das análises realizadas na cervejaria, as amostras coletadas em cada início e final de repouso foram analisadas através do método DNS para verificação da atividade enzimática da alfa-amilase e quantificação da concentração de glicose.

Inicialmente foi testado o tempo de 16 minutos a temperatura de 72 °C. O teste de iodo e sacarificação apresentaram resultados similares aos da curva original como mostrado anteriormente na Figura 4.3. Após o primeiro teste foi testado a temperatura de 69 °C e tempo de 16 minutos para verificar o comportamento da enzima-alfa amilase. Escolheu-se diminuir a temperatura, pois o aumento da mesma teria risco de desnaturação, já que segundo Brandam et al. (2003) a inativação da mesma ocorre a 76 °C. O teste de iodo não foi satisfatório ao final do terceiro repouso, permanecendo mais escuro do que o ideal, como mostrado na Figura 4.4 Feistler (2014) afirmou que a diminuição na temperatura do terceiro repouso iria aumentar o tempo do repouso para atingir a coloração dourada, portanto os resultados do teste C (terceiro repouso a 69°C e 16 minutos) condizem com a afirmação do autor. O grau de sacarificação não teve elevações significativas. O último teste, (teste D, tabela 3.1), foi realizado com a mesma temperatura de 72°C e tempo de 9 minutos. O resultado do teste de iodo foi satisfatório, como mostrado na Figura 4.5, pois no final do repouso, a reação já apresentou coloração adequada. O grau de sacarificação também não teve elevações significativas.

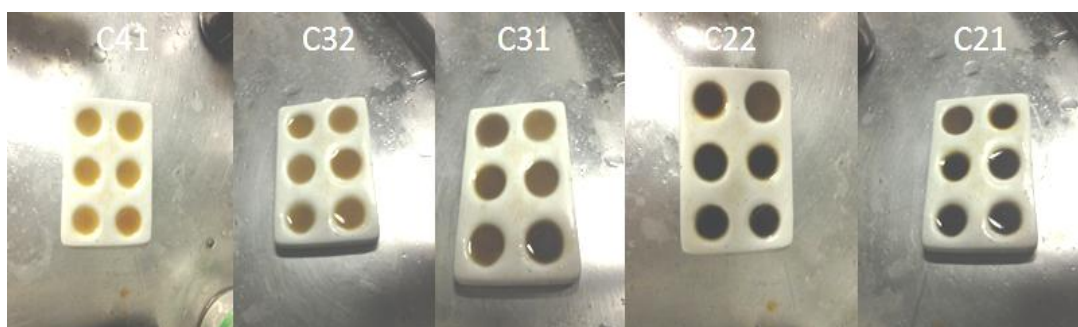


Figura 4.4 Teste de iodo para o Teste C a temperatura de 69 °C e tempo de 16 minutos (C41 = início do repouso 4, C32 = final do repouso 3, C31 = início do repouso 3, C22 = final do repouso 2 e C21 = início do repouso 2).

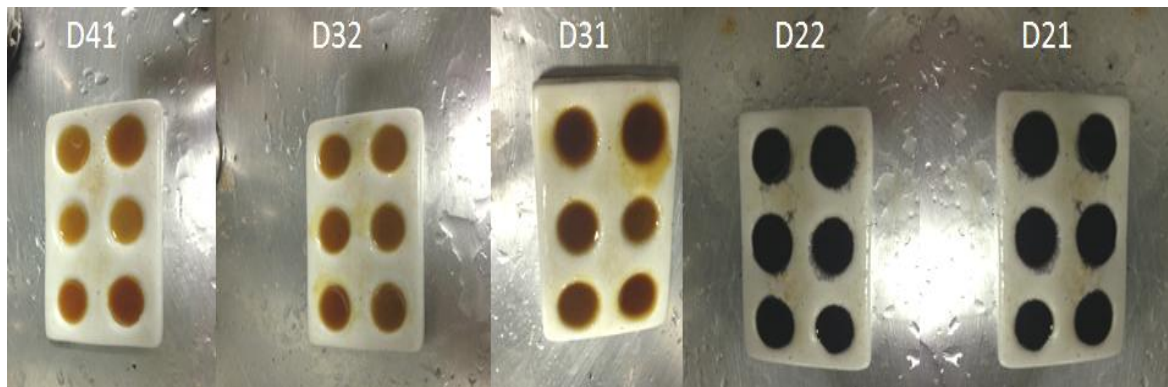


Figura 4.5 Teste de lodo para o Teste D, a temperatura de 72°C e tempo de 9 minutos (D41 = início do repouso 4, D32 = final do repouso 3, D31 = início do repouso 3, D22 = final do repouso 2 e D21 = início do repouso do 2).

4.3.2 Influência avaliada através da Atividade Enzimática

A análise da atividade enzimática apresentou resultados diferentes de Koljonen et al. (1995). Os autores estudando a atividade da alfa-amilase através de experimentos em escala industrial, com um volume de 40m³ de mostura, utilizando uma razão de malte e água de 0,25, mostraram que a elevação da atividade enzimática ocorreu nos primeiros 20 minutos de mosturação durante o primeiro repouso.

A análise da atividade enzimática do presente trabalho, no entanto, apresentou uma maior elevação desta durante a elevação da temperatura do primeiro para o segundo repouso, como mostrado na Figura 4.6 (as linhas que ligam os pontos são meramente ilustrativas e não representam uma tendência de comportamento). Esta diferença pode ser explicada pela adição de complexos enzimáticos contendo a enzima alfa-amilase originada de fermentação submersa de *Bacillus amyloliquefacien*. Devido a utilização de flocos de milho no processo, a dosagem de enzimas é necessária conforme descrito anteriormente. Além disso, o adiantamento do pico de atividade enzimática pode ter ocorrido devido a diferença na taxa de elevação de temperatura dos dois experimentos. Como a atividade enzimática depende da temperatura, como descrito anteriormente, se a taxa de elevação da temperatura for menor, a taxa de elevação da atividade enzimática também será menor. A taxa de elevação da temperatura utilizada pelos autores foi de 2°C.min⁻¹, enquanto a taxa utilizada neste trabalho foi de 1°C.min⁻¹. O pico da atividade enzimática neste trabalho foi , portanto, alcançado após o pico da atividade enzimática do artigo citado, pois a temperatura demorou mais para ser elevada.

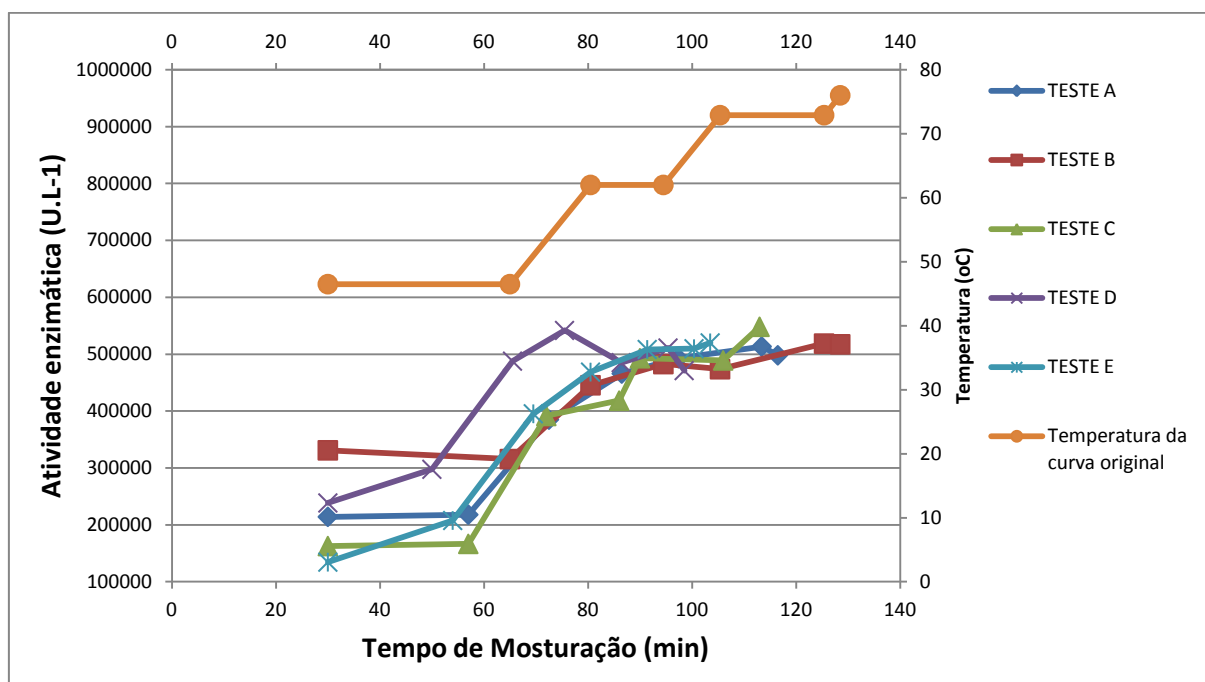


Figura 4.6 Variação da atividade enzimática da alfa-amilase em diferentes curvas de mostura.

Confirmando os dados de Koljonen *et al.* (1995), a concentração de glicose não sofreu grandes alterações entre testes com curvas de mostura diferentes. Durand *et al.* (2009) utilizaram as cinéticas de reação modeladas através dos experimentos de Koljonen *et al.* (1995) e através da simulação da produção de glicose durante a mosturação obtiveram variações menores que 10 g.L^{-1} para uma mesma curva. Os dados do presente trabalho confirmaram os resultados dos autores, como ilustrado na Figura 4.7. Os cromatogramas encontram-se no Anexo A.

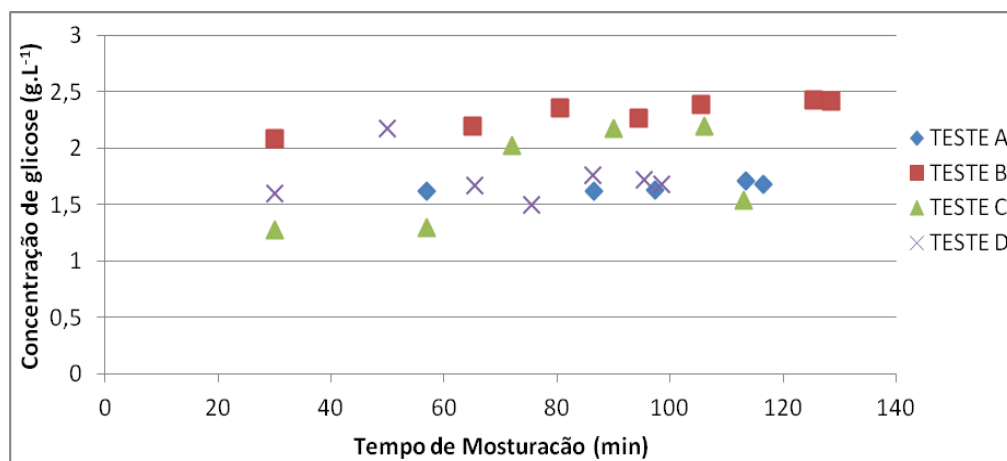


Figura 4.7 Variação da concentração de glicose em diferentes curvas de mosturação

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O processo de mosturação é de extrema importância para a indústria cervejeira, uma vez que é a etapa que define a composição do substrato que será utilizado na etapa de fermentação. A composição é definida por reações enzimáticas que são adequadas ao perfil sensorial da cerveja. A redução do tempo de duração desta etapa pode ter grande impacto na produtividade de uma sala de brassagem.

Utilizando-se da característica inerente ao processo de que as temperaturas e os tempos de repouso são os parâmetros de maior influência nas atividades enzimáticas, foi proposta uma alteração na curva de mosturação. Essa alteração consiste na utilização de tempos de repouso menores, de modo a permitir uma operação com itens de qualidade adequados ao processo.

O acompanhamento da concentração de FAN no mosto mostrou que a mudança de curva conseguiu reduzir a duração do repouso em 11 minutos, mantendo a concentração de aminoácidos livres do mosto adequada para a fermentação.

A manipulação do segundo repouso mostrou que a maior elevação da concentração de maltose ocorreu durante a elevação da temperatura do primeiro para o segundo repouso. Esse resultado mostra que a taxa de elevação da temperatura pode influenciar mais a atividade da beta-amilase do que a duração do segundo repouso.

O acompanhamento do terceiro repouso mostrou que a temperatura de 69°C não é interessante para a atividade da alfa-amilase. Além disso, pode-se constatar que a 72°C o tempo do terceiro repouso pôde ser reduzido em 11 minutos. A validação destes resultados foi realizada através de parâmetros de qualidade como reação ao iodo e grau de sacarificação.

Através da análise das atividades enzimáticas e de parâmetros de qualidade foi possível concluir que uma redução de 26 minutos no tempo de mosturação é possível.

Como trabalhos futuros, sugere-se a análise do impacto da curva de mosturação no consumo energético e o impacto das quantidades de compostos enzimáticos dosados, a fim de reduzir o custo do processo.

6 Referências

- Aquarone, E. 2013. "Biotecnologia na Produção de Alimentos." P. 91–144 in *Biotecnologia Industrial*.
- Bamforth, C. W. 2009. "Current perspectives on the role of enzymes in brewing." *Journal of Cereal Science* 50(3):353–57.
- Barnes, Z. C. 2004. "Brewing Process Control." P. 447–56 in *Handbook of Brewing*.
- Beleti, M. A., Duarte, F. e Georg-Kraemer, J.E. 2012. "A temperatura no desenvolvimento da atividade das enzimas (1-3, 1-4)- β -glucanases e degradação de β -glucanos durante a malteação." *Ciência Rural* 42(3):467–73.
- Branco, N., Milton, C., Mary, J. e Neves, L. 2009. "Propriedades das enzimas α -amilase e xilanase comerciais e sua influência na reologia da massa e na qualidade do pão de forma." *Joaçaba Evidência* 9:67–82.
- Brandam, C., Meyer, X.M. , Proth, J., Strehaiano, P. e Pingaud, H. 2003. "An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing." *Biochemical Engineering Journal* 13(1):43–52.
- Bryce, J. et al. 2010. "Effect of different steeping conditions on endosperm modification and quality of distilling malt." *J. Inst. Brew.* 116:125–33.
- D'Avila, R., Luvielmo, M. , Mendonça, C.R. e Jantzen, M. 2012. "Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações." *Estudos Tecnológicos em Engenharia* 8(2):60–68.
- Durand, G. , Corazza, M. L., Blanco, M. e Corazza, F. C .2009. "Dynamic optimization of the mashing process." *Food Control* 20(12):1127–40.
- EBC, European Brewery Convention. 2004. *Analytica - EBC*.
- Feistler, O. 2014. "Apostila Operador Cervejeiro - AMBEV". Porto Alegre.
- Gava, A. J., Da Silva, C.A. e Frias, J.R. 1978. *Tecnologia de Alimentos - Princípios e Aplicações*. Editora No. São Paulo.
- Green, D. 2015. "The Science of Step Mashing." 1–18. Acessado em 15 de outubro de 2015 (<http://byo.com/aging/item/1497-the-science-of-step-mashing>).
- Koblitz, M. G. B. 2013. *Bioquímica de alimentos: Teoria e aplicações práticas*. Rio de Janeiro, RJ.
- Lei, H. , Zheng, L. , Wang, C. , Haifeng, Z. e Mouming, Z. 2013. "Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast." *International Journal of Food Microbiology* 161(2):76–83.

- Lewis, M.J. e Bamforth, C.W. 2006. *Essays in Brewing Science*.
- Mikulski, D., Kłosowski, G. e Rolbiecka, A. 2015. "Influence of phytase and supportive enzymes applied during high gravity mash preparation on the improvement of technological indicators of the alcoholic fermentation process." *Biomass and Bioenergy* 80:191–202.
- Muller, R.. 1991. "THE EFFECTS OF MASHING TEMPERATURE AND MASH THICKNESS ON WORT CARBOHYDRATE COMPOSITION." *J. Inst. Brew.* 97:85–92.
- Nelson, D.L. e Cox, M.M. . 2002. *Lehninger Princípios de Bioquímica-3 edição*.
- Oetterer, M. 2010. "Tecnologia de Obtenção de Cerveja". USP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição.
- Palmer, G. H. 1995. "Structure of ancient cereal grains." 101(August 1994):103–12.
- Palmer, G. H. 2004. "Barley and Malt." P. 139–50 in *Handbook of Brewing*.
- Papazian, C. 2004. "Beer Styles: Their Origins and Classification." P. 51–74 in *Handbook of Brewing*.
- Polaina, J. e Maccabe, A.P. 2007. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Valencia, Spain.
- Pozen, M. 1934. "Enzymes in Brewing." *Industrial* 26(11):1127–33.
- Russell, I. 2004. "Yeast." P. 282–301 in *Handbook of Brewing*.
- Ryder, D.S. e Power, J. 2004. "Miscellaneous Ingredients in Aid of the Process." P. 334–78 in *Handbook of Brewing*.
- Silva, D.P. 2005. "PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO SENSORIAL DE CERVEJA OBTIDA A PARTIR DE MOSTOS COM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE AÇUCARES". Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia.
- SINDICERV. 2015. "A Cerveja." Acessado em 12 de novembro de 2015 (<http://www.sindicerv.com.br/tipo-serveja.php>).
- Tschope, E. C. 2001. *Microcervejarias e Cervejarias. A História, a Arte e a Tecnologia*. Editora Ad. São Paulo.

Anexo A

O anexo A apresenta a curva padrão utilizada para a maltose e os cromatogramas obtidos no HPLC para análise das concentrações de glicose e maltose.

Curva para Maltose

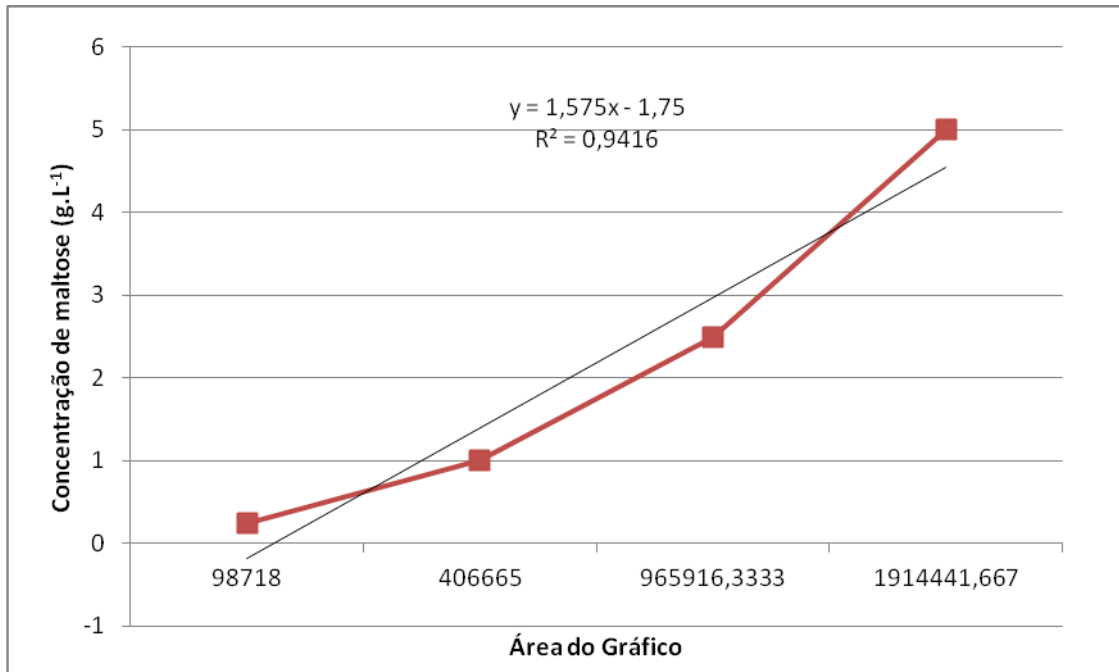
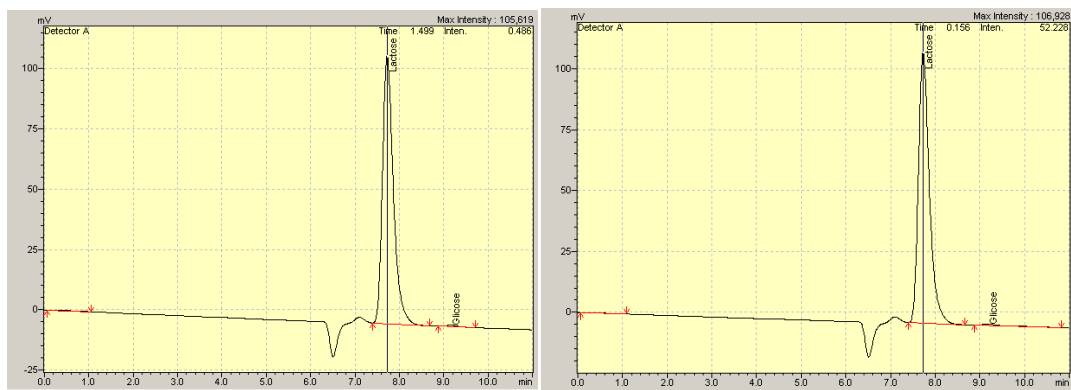


Figura 6.1 Curva padrão para maltose.

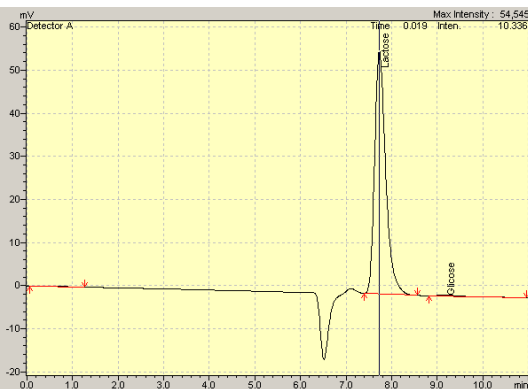
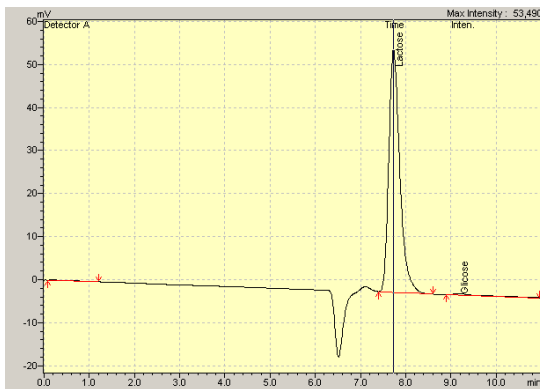
Cromatogramas

Curva de Maltose

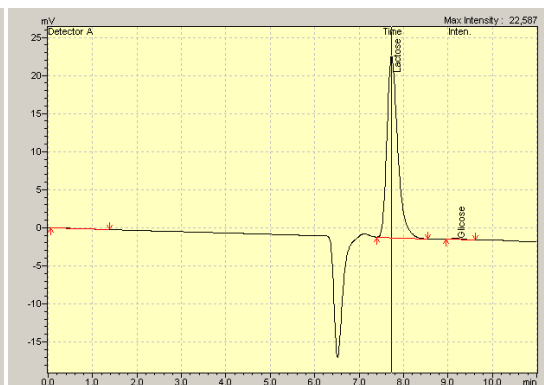
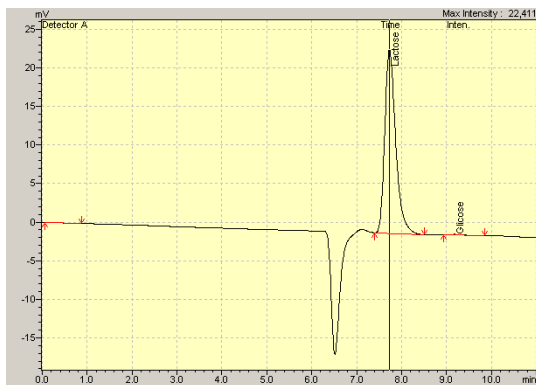
5 g.L⁻¹



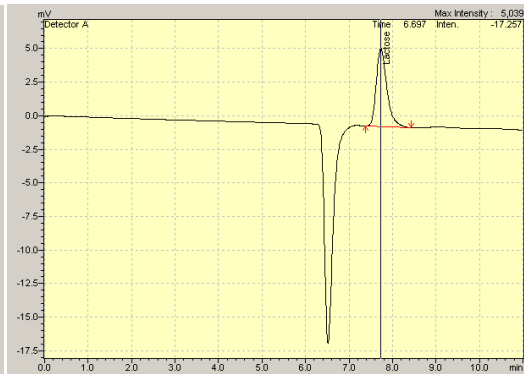
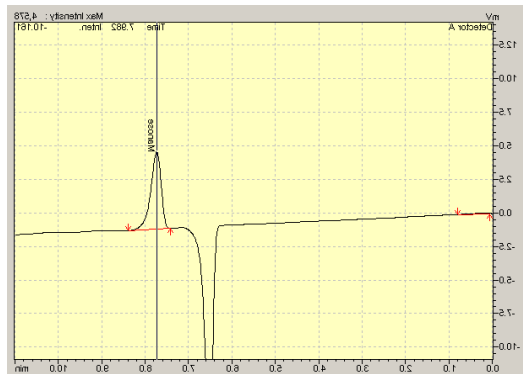
2,5 g.L⁻¹



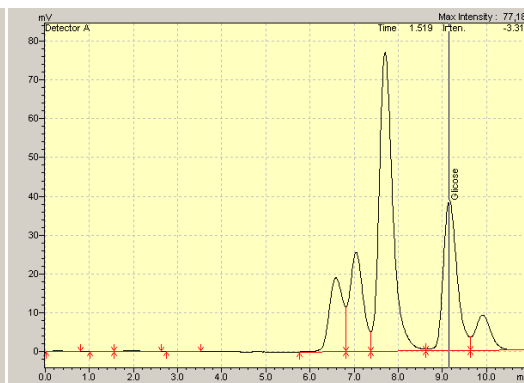
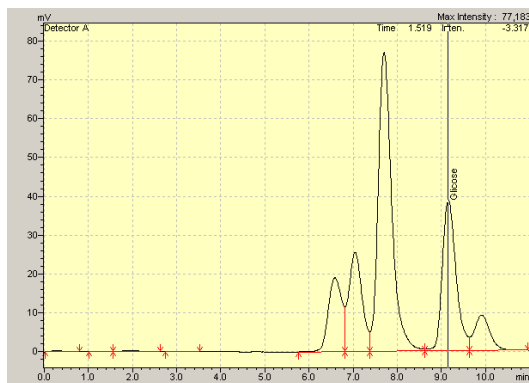
1 g.L⁻¹

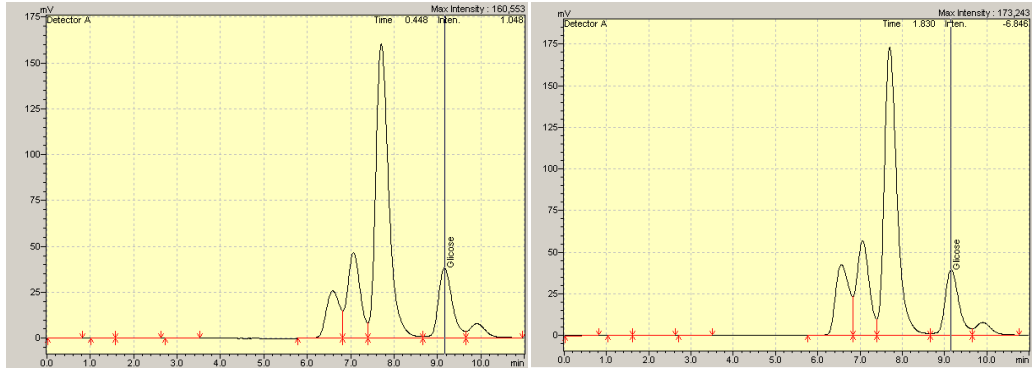
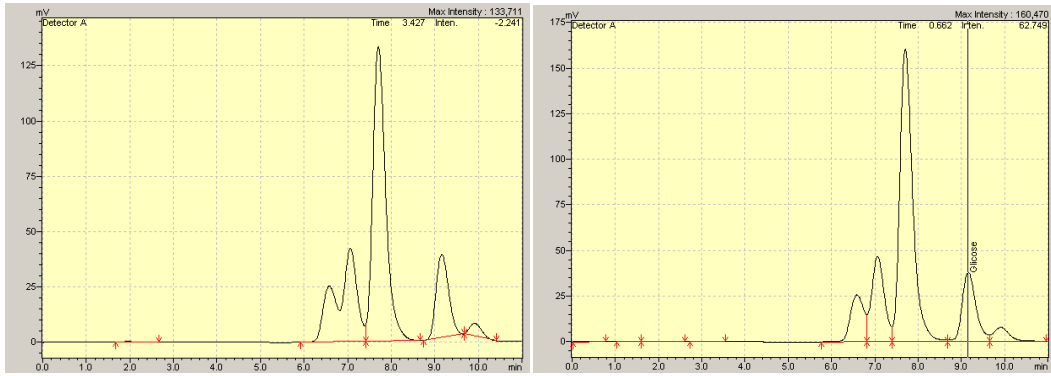


0,25 g.L⁻¹

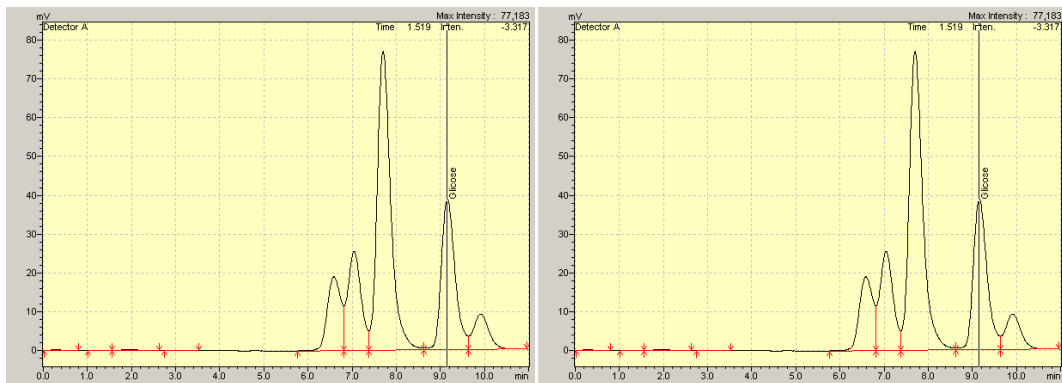


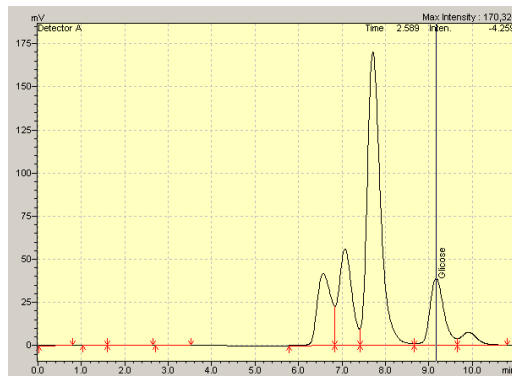
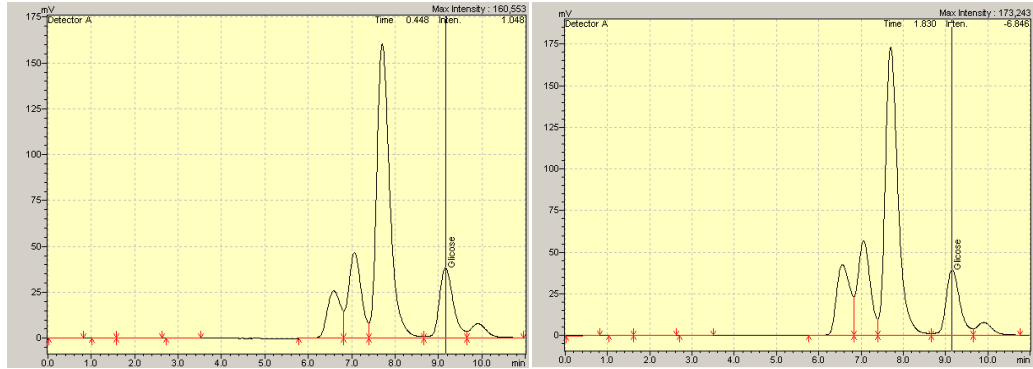
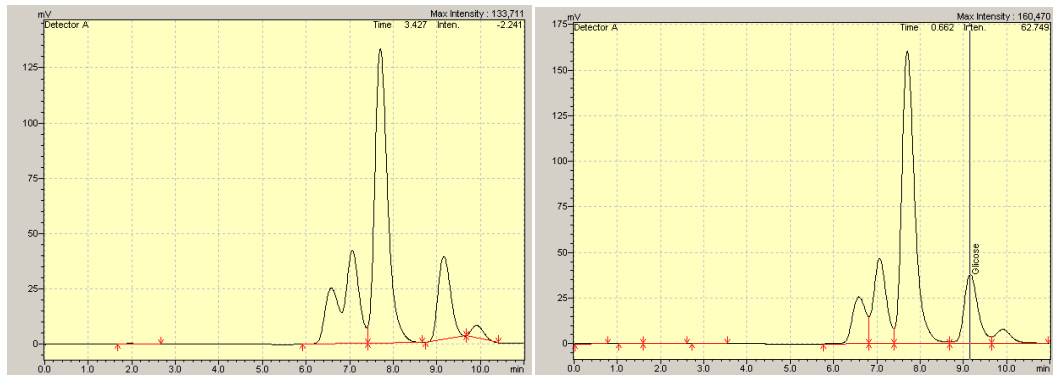
Teste A: A11,A12,A21,A22,A31,A32,A41



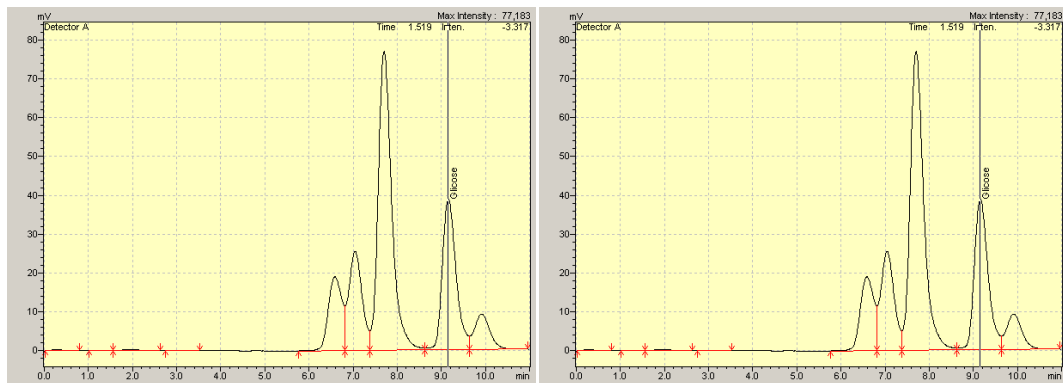


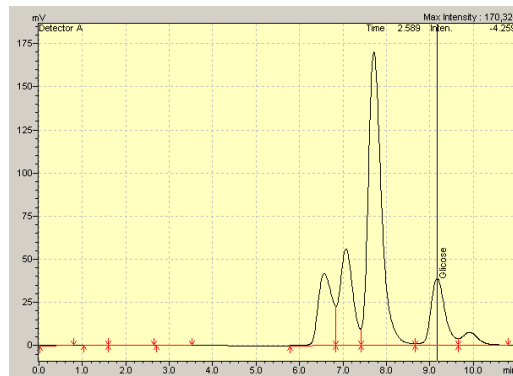
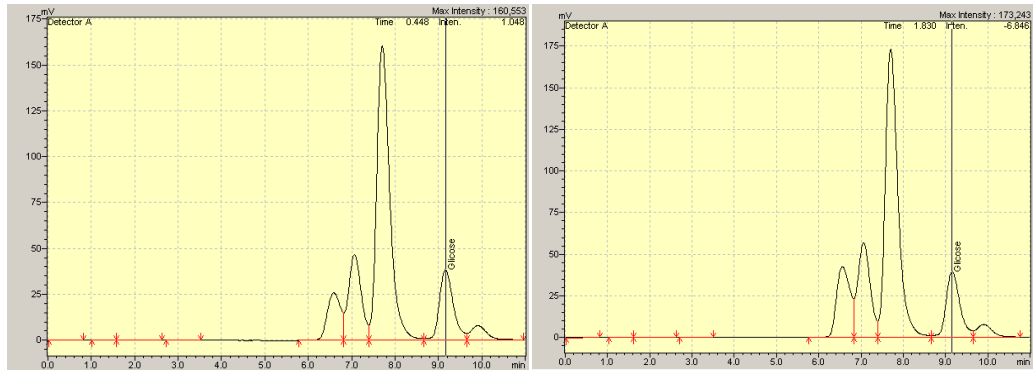
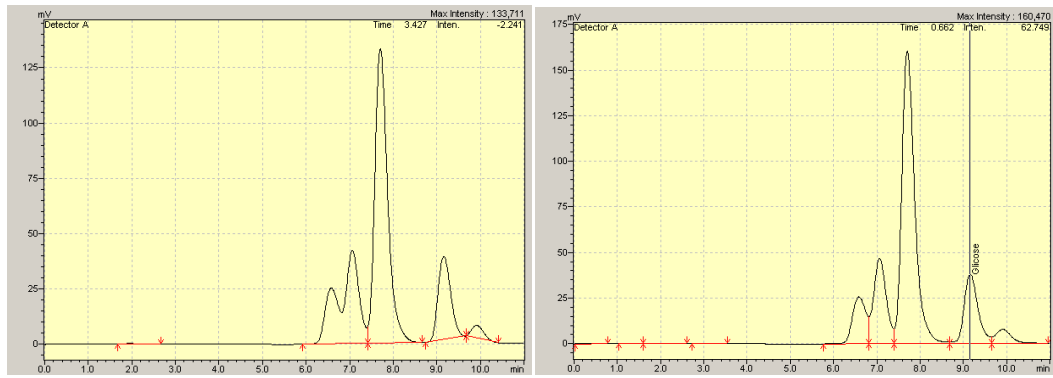
Teste B: B11,B12,B21,B22,B31,B32,B41



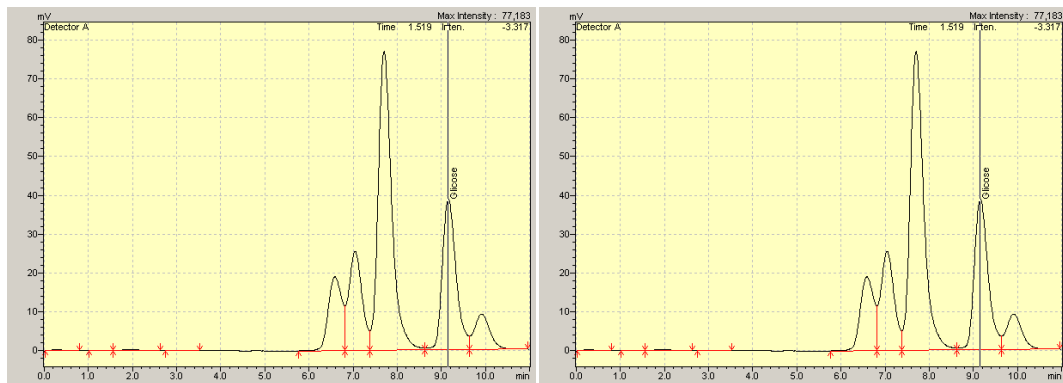


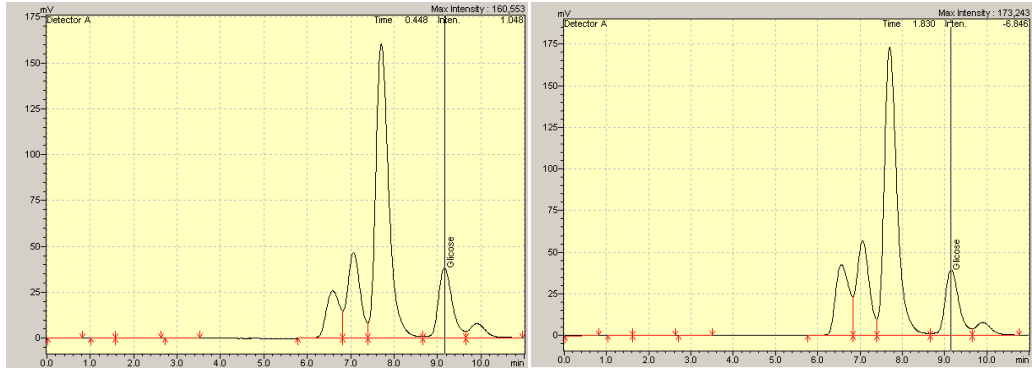
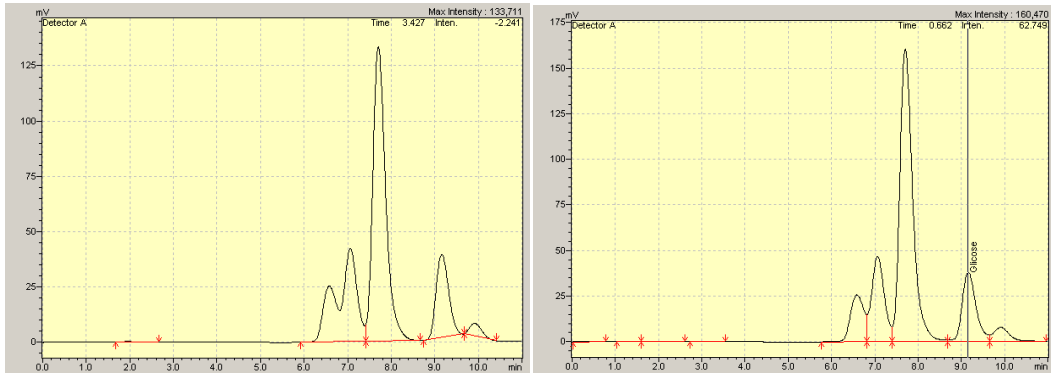
Teste C: C11,C12,C21,C22,C31,C32,C41



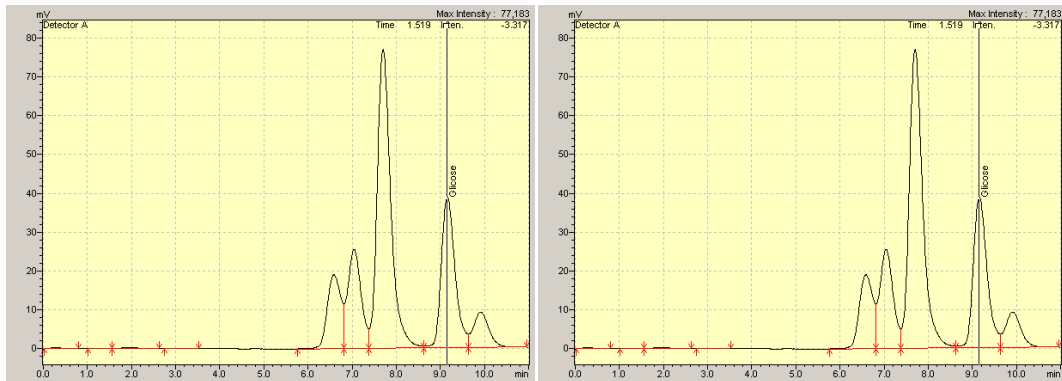


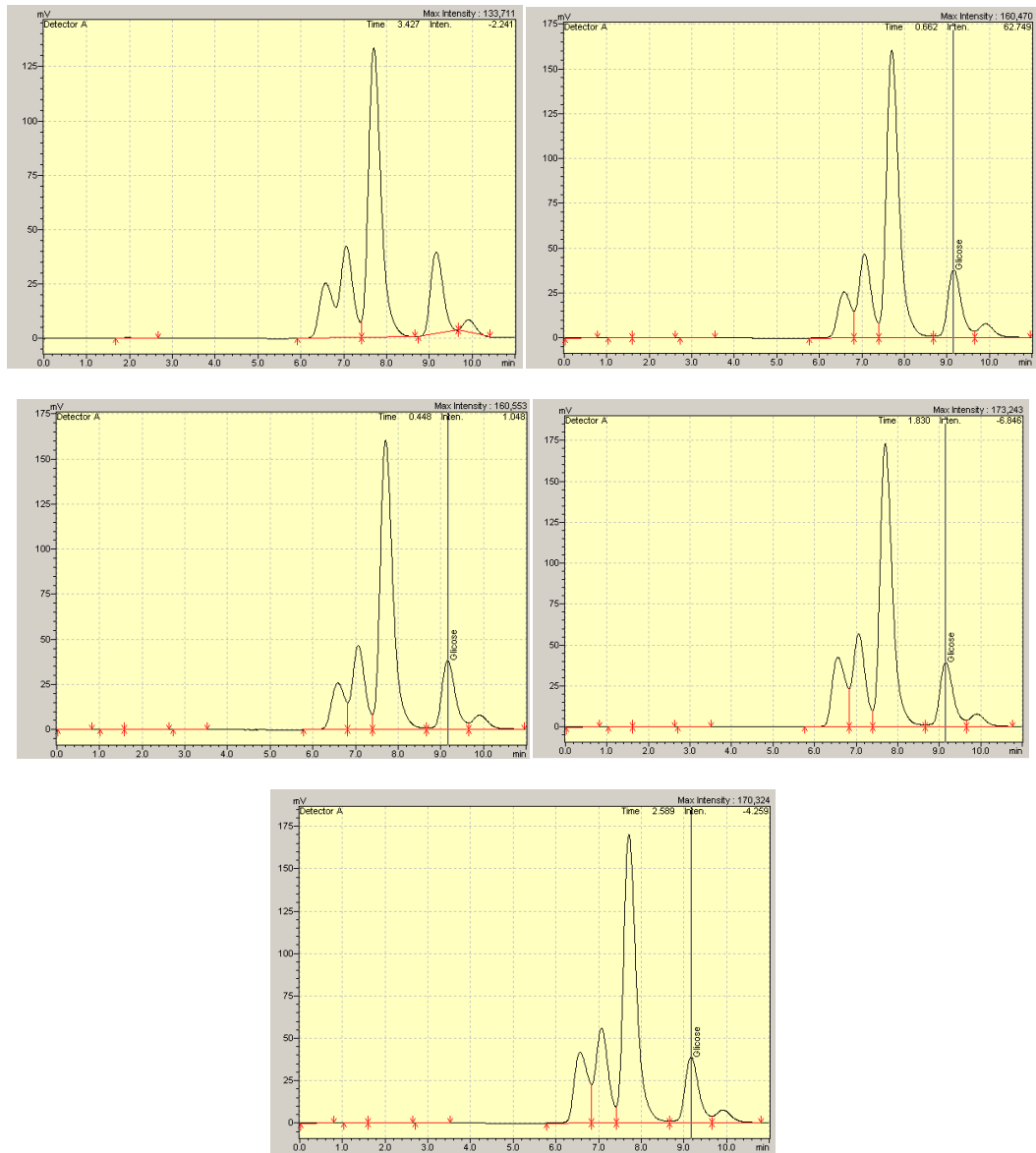
Teste D: D11,D12,D21,D22,D31,D32,D41





Teste E: E11,E12,E21,E22,E31,E32,E41





Anexo B

O anexo B apresenta a curva padrão utilizada para a análise da atividade enzimática.

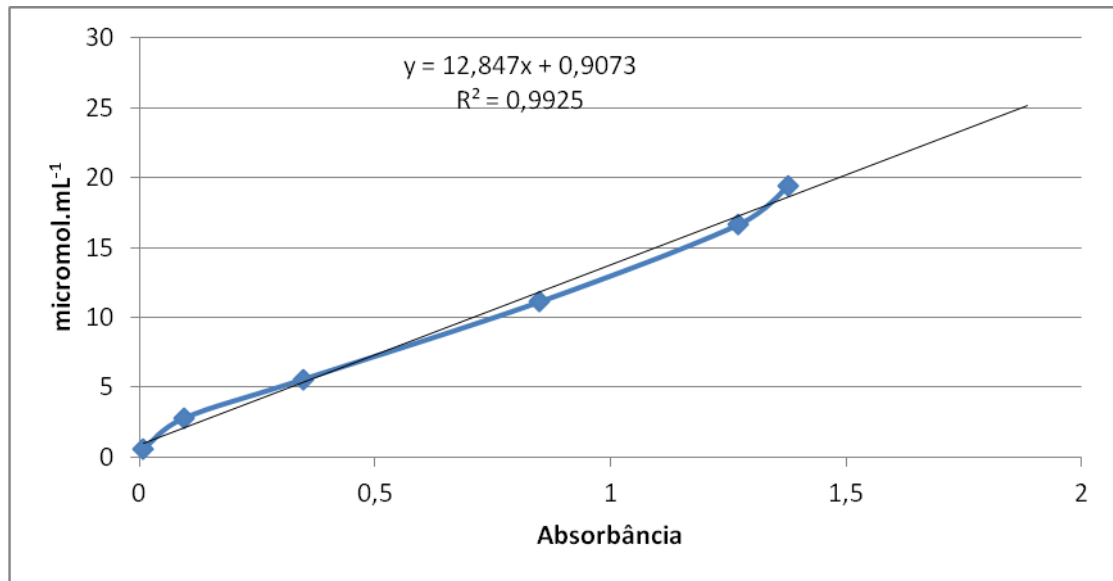


Figura 6.2 Curva padrão de glicose para a análise da atividade enzimática.