



**Ana Sofia Pontes Calado**  
Licenciada em Engenharia Alimentar

## **Avaliação de um novo processo de produção de Cerveja sem álcool**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão  
Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL  
Co-orientador: Doutor Pedro Vicente, Brewing Manager, SCC

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Vogal(ais): Doutora Teresa Sampaio Gueirinhas  
Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2017**





**Ana Sofia Pontes Calado**  
Licenciada em Engenharia Alimentar

## **Avaliação de um novo processo de produção de Cerveja sem álcool**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão  
Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL  
Co-orientador: Doutor Pedro Vicente, Brewing Manager, SCC

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Vogal(ais): Doutora Teresa Sampaio Gueirinhas  
Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2017**

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

**“Avaliação de um novo processo de produção de cerveja sem álcool”** Copyright © 2017 de Ana Sofia Pontes Calado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

## Agradecimentos

Após mais uma meta alcançada, não poderia esquecer e deixar de agradecer a todos aqueles que estiveram e compartilharam comigo momentos bons e menos bons, que me ajudaram a tornar na pessoa que sou hoje e que tiveram um papel fundamental na minha formação acadêmica.

Um OBRIGADO,

À Sociedade Central de Cervejas e bebidas, pela possibilidade de realizar o estágio numa empresa, com elevado prestígio e reconhecimento e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do mesmo.

À professora Ana Lúcia Leitão, não só por me ter proporcionado esta oportunidade de estágio, mas também por todo o apoio, dedicação e disponibilidade prestada, durante a realização do estágio e da dissertação.

Ao Dr. Pedro Vicente, pela orientação, por toda a disponibilidade e apoio e pela transmissão dos seus conhecimentos, de forma a que fosse possível chegar aos objetivos pretendidos não só durante a realização do estágio como também durante a realização da dissertação.

À Dr. Teresa Sampaio e à Engenheira Maria José, por me terem recebido tão bem, por todo apoio que me deram durante os meses de estágio, pelo esclarecimento de muitas dúvidas, e por toda a disponibilidade que tiveram sempre comigo.

Aos colegas do laboratório de físico-química e de microbiologia, por todo o apoio, ajuda e paciência.

Aos amigos de faculdade, à Catarina, à Carolina, à Lena, à Tânia e à Marisa, por todos os momentos, pelo apoio e pela paciência por muitas vezes não poder estar presente nos nossos jantares, para que fosse possível concluir mais esta etapa.

Aos meus amigos de sempre, em especial à Beatriz, por estarem presentes em muitos dos momentos importantes da minha vida, pelo apoio e pelos conselhos.

À minha família, que esteve sempre presente.

Ao João, por me ter sempre apoiado nas minhas escolhas e decisões, mesmo quando não são as mais acertadas, pelo incentivo e pela sua enorme paciência. Sem ti, tudo seria mais complicado!

E por último, aos meus pais e ao meu irmão, porque sem eles não teria conseguido chegar onde cheguei hoje. Obrigada, por me terem apoiado em todas as etapas e em todas as minhas escolhas, por todo o amor, carinho, esforço e dedicação.

A TODOS ELES O MEU MUITO OBRIGADO!

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

## Resumo

Numa altura em que os consumidores se encontram cada vez mais atentos ao desenvolvimento de novos produtos, surge a necessidade das empresas inovarem e tentarem ganhar vantagem competitiva em relação aos seus concorrentes de mercado.

Desta forma, e, sabendo que a cerveja sem álcool para alguns consumidores, se encontra apenas direcionada para certas ocasiões, como em casos de gravidez, condução, doença, entre outros, e, devido às suas características organoléticas, nomeadamente o seu sabor doce e a mosto, surge a necessidade de encontrar soluções que tornem esta cerveja mais atrativa para os consumidores.

Como tal, este trabalho de dissertação, desenvolvido na Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, pretendeu avaliar um novo processo de produção de cervejas sem álcool, nomeadamente, recorrendo à adição de uma enzima, glucose oxidase. Esta enzima converte a glucose em ácido glucónico, diminuindo a doçura e aumentando a acidez, o que promove uma melhoria das suas características organoléticas, sem que seja necessário recorrer à adição de ácidos, como é feito atualmente.

Assim, foram realizados vários ensaios em laboratório, simulando diversas condições de produção, de forma a avaliar o comportamento desta enzima.

Os objetivos propostos para a fase laboratorial seriam, atingir o pH previsto inicialmente de X a uma temperatura de Y °C e com condições de arejamento normais, ou seja, aquelas que são utilizadas em produção, com uma posterior inativação da enzima por pasteurização.

Apesar dos inúmeros constrangimentos encontrados durante a realização dos ensaios, os objetivos propostos inicialmente foram cumpridos. No entanto, a passagem deste novo processo para uma fase industrial, não foi possível, uma vez que as condições de pasteurização utilizadas em produção não são suficientes para uma inativação enzimática.

**Palavras-chave:** Cerveja, Cerveja sem álcool, enzima, glucose oxidase.

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

## **Abstract**

In a time that the consumers become increasingly aware of new products development, companies need to innovate and try to gain a competitive advantage over their market competitors.

In this way, and knowing that non-alcoholic beer, for some consumers, is only directed to certain occasions, like pregnancy, before driving, disease and others, and, by its organoleptic characteristics, particularly its sweet and warty taste, there is a need to find solutions that make this beer more attractive to consumers.

The present work that was, developed in the Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, aimed to evaluate a new process of production of non-alcoholic beer, using the addition of an enzyme, glucose oxidase. This enzyme converts glucose to gluconic acid, reducing sweetness and increasing acidity, which promotes an improvement of its organoleptic characteristics, without the need to resort to the addition of acids, as it is currently done.

In order to achieve this goal, several laboratory tests simulating different production conditions were performed, to evaluate enzyme behavior.

The objectives initially proposed for the laboratory phase was to reach the initially expected pH of X at a temperature of Y °C and normal aeration conditions, that is, those used in production, and a subsequent inactivation of the enzyme by pasteurization.

Despite the many constraints found during the trials, the objectives initially proposed were met. However, the transition from laboratory to industrial phase was not possible, since the pasteurization conditions used in production aren't enough for the enzymatic inactivation.

**Keywords:** Beer, Non-alcoholic beer, enzymes, glucose oxidase

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

## Índice de Matérias

Introdução .....	1
1. Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, S.A.....	5
1.1. Descrição da Empresa.....	7
1.2. História.....	7
1.3. Marcas e Produtos.....	8
1.3.1. Sagres .....	8
1.3.2. Heineken.....	9
1.3.3. Internacionais.....	9
1.3.4. Sidras .....	10
1.3.5. Águas .....	10
1.4. Inovação.....	10
2. A cerveja .....	13
2.1. Definição .....	15
2.2. História.....	15
2.3. Matérias Primas.....	16
2.3.1. Água .....	16
2.3.2. Malte de Cevada .....	17
2.3.3. Lúpulo.....	18
2.3.4. Leveduras .....	18
2.3.5. Outros Produtos: .....	19
2.5. Processo de produção de cerveja.....	19
2.5.1. Maltagem.....	19
2.5.2. Brassagem.....	20
2.5.3. Fermentação.....	21
2.5.4. Guarda.....	21
2.5.5. Filtração.....	21
2.5.6. Engarrafamento .....	22
2.6. Produção de cerveja sem álcool .....	22
2.6.1. Processos Biológicos .....	22
2.6.2. Processos físicos .....	23

## AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

2.7. Características Organoléticas da cerveja sem álcool .....	26
2.8. Cerveja e a saúde.....	27
3. Enzimas.....	29
3.1. Definição .....	31
3.2. Mecanismo .....	31
3.3. Fatores que influenciam a atividade enzimática .....	33
3.3.1. Concentração de enzima e substrato.....	33
3.3.2. Temperatura .....	34
3.3.3. pH.....	34
3.3.4. Atividade da água.....	34
3.3.5. Pressão.....	34
3.4. Tipos de enzimas .....	34
3.5. Enzimas na indústria alimentar .....	35
3.6. Glucose oxidase .....	37
3.6.1. Oxigénio molecular.....	38
3.6.2. Temperatura .....	38
3.6.3. pH.....	38
3.6.4. Glucose oxidase na indústria alimentar .....	38
4. Metodologia.....	41
4.1. Objetivos .....	43
4.2. Monitorização da reação enzimática.....	43
4.3. Metodologia geral dos ensaios.....	44
4.4. Metodologia dos equipamentos utilizados em laboratório.....	44
5. Trabalho Experimental .....	47
5.1. Caracterização do mosto.....	49
5.2.1. Metodologia .....	49
5.2.2. Resultados e discussão.....	50
5.3. Ensaio com glucose oxidase.....	51
5.3.1. Ensaio 1 - Condições ótimas da enzima .....	52
5.3.1.1. Metodologia.....	52
5.3.1.2. Resultados e discussão .....	53

5.3.2 Ensaio 2 - Tubos EBC.....	54
5.3.2.1. Metodologia.....	55
5.3.2.2. Resultados e discussão.....	55
5.3.3. Ensaio 3 - Frascos Schott.....	57
5.3.3.1. Metodologia.....	57
5.3.3.2. Resultados e discussão.....	58
5.4. Inativação da enzima.....	64
5.4.1. Ensaio 4 - Inativação da enzima por pasteurização.....	64
5.4.1.1 Metodologia.....	64
5.4.1.2. Resultados e discussão.....	65
5.4.2. Ensaio 5 – Simulação da adição de enzima na etapa de brassagem e posterior inativação da enzima por fervura.....	67
5.4.2.1. Metodologia.....	68
5.4.2.2. Resultados e discussão.....	69
5.4.3. Ensaio 6 - Inativação da enzima por pasteurização (90 °C/95 °C – 10minutos).....	73
5.4.3.1. Metodologia.....	73
5.4.3.2. Resultados e discussão.....	74
5.5. Determinação da concentração de glucose no mosto.....	81
5.5.1. Metodologia.....	81
5.5.2. Resultados e discussão.....	81
5.6. Ensaio organolético.....	82
5.6.1. Metodologia.....	82
5.6.2. Resultados e discussão.....	82
6. Conclusão.....	85
Bibliografia.....	89
Anexo 1 – Diagrama das Unidades de Pasteurização.....	99

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

## Índice de figuras

Figura 1.1. Símbolo da Sociedade Central de Cervejas e Bebidas.....	7
Figura 1.2. Cervejas Produzidas Pela SCC. Adaptado de: SCC, 2017b .....	8
Figura 1.3. Cerveja Heineken. Adaptado de: SCC, 2017b.....	9
Figura 1.4. Marcas Internacionais Comercializadas pela SCC. Adaptado de: SCC, 2017b .....	9
Figura 1.5. Sidras produzidas pela SCC. Adaptado de: SCC, 2017b.....	10
Figura 1.6. Água Produzidas pela SCC. Adaptado de: SCC, 2017b .....	10
Figura 1.7. Produtos desenvolvidos em 2016/2017. Adaptado de: SCC, 2017b. ....	11
Figura 2.1. Matérias primas da Cerveja. Adaptado de: Como fazer cerveja, 2009 .....	16
Figura 2.2. Água. Adaptado de: Cervalaria, 2017.....	16
Figura 2.3. Composição da Cevada. Adaptado de: Flores, D. 2015 .....	17
Figura 2.4. Lúpulo Adaptado de: Inbarco, 2016.....	18
Figura 2.5. Leveduras. Adaptado de: Heineken, 2014.....	18
Figura 2.6. Processo de Produção de Cerveja. Adaptado de: Novozymes, 2017c.....	19
Figura 3.1. Descrição da enzima. Adaptado de: Sobiologia, 2017 .....	31
Figura 3.2. Modelo Chave-fechadura. Adaptado de: Gallo, 2017 .....	32
Figura 3.3. Modelo Encaixe Induzido. Adaptado de: Gallo, 2017.....	32
Figura 3.4. Inibidores enzimáticos. Adaptado de: Novozymes, 2017b .....	33
Figura 3.5. Representação da glucose oxidase. Adaptado de: Tribst et al., 2014 .....	37
Figura 3.6. Reação da Glucose oxidase. Adaptado de: Bankar et al., 2009.....	37
Figura 4.1. Oxidação da glucose pela glucose oxidase. Adaptado de: Vicente, 2016 .....	43
Figura 4.2. Esquematização geral dos ensaios .....	44
Figura 4.3. Potenciômetro de pH .....	45
Figura 4.4. Orbisphere 6101 TPO Analyzer .....	45
Figura 4.5. Medidor de oxigénio.....	45
Figura 4.6. Banho-Maria.....	45
Figura 4.7. Banho termostático .....	46
Figura 4.8. Banho de óleo .....	46
Figura 4.9. Banho com Sistema de Agitação .....	46
Figura 4.10. Espectrofotómetro.....	46
Figura 5.1. Ensaio para caracterização do mosto.....	50
Figura 5.2. Adição da enzima no processo de produção. Adaptado de: Novozymes, 2017c.....	51
Figura 5.3. Condições finais pretendidas no ensaio com a glucose oxidase .....	52
Figura 5.4. Ensaio 1 - Condições ótimas da enzima.....	53
Figura 5.5. Ensaio 1 – Condições ótimas da enzima: variação do pH e oxigénio ao longo do tempo .....	54
Figura 5.6. Ensaio 2 - Tubos EBC: efeito da quantidade de enzima e arejamento.....	55
Figura 5.7. Ensaio 2 - Tubos EBC: efeito da quantidade de enzima e arejamento no pH do mosto ..	56
Figura 5.8. Ensaio 3 - Frascos Schott: efeito do arejamento e quantidade de enzima .....	57

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Figura 5.9. Análise de pHs no ensaio 3.1: efeito do arejamento .....	59
Figura 5.10. Análise de pH no ensaio 3.2: efeito da nova enzima.....	60
Figura 5.11. Análise dos pHs dos ensaios 3.3 e 3.4: efeito de diferentes concentrações de oxigénio dissolvido no mosto .....	61
Figura 5.12. Análise de pHs no ensaio 3.5: efeito de diferentes quantidades de enzima .....	63
Figura 5.13. Condições validadas .....	63
Figura 5.14. Ensaio 4 - Inativação da enzima por pasteurização.....	64
Figura 5.15. Análise de pHs do ensaio 4 - Inativação da enzima por pasteurização .....	67
Figura 5.16. Representação da adição da enzima em produção. Adaptado de: Novozymes, 2017c	68
Figura 5.17. Ensaio 5 - Inativação da enzima por fervura.....	69
Figura 5.18. Ensaio 5.1 (1hora a Y+60 °C).....	70
Figura 5.19. Ensaio 5.2 (4 horas a Y+60 °C).....	71
Figura 5.20. Ensaio 5.3 (24 horas a Y+60 °C).....	72
Figura 5.21. Ensaio 6 – Inativação por pasteurização (Y+80 °C/Y+85 °C – 10 minutos) .....	73
Figura 5.22. Análise de pHs no ensaio 6.....	75
Figura 5.23. Análise de pHs no ensaio 6.1: efeito da pasteurização Y+80 °C (10 minutos).....	76
Figura 5.24. Análise de pHs no ensaio 6.2: Pasteurização Y+85 °C (10 minutos).....	77
Figura 5.25. Variação do pH ao longo do tempo de ensaio realizado pelo laboratório que forneceu a enzima. ....	78
Figura 5.26. Amostras utilizadas no ensaio organolético.....	83
Figura 5.27. Avaliação organolética das amostras .....	83

## Índice de tabelas

Tabela 2.1. Processos de produção de cervejas sem álcool. Adaptado de: Ambrosi, 2016; Costa, 2016; Catarino & Mendes, 2011 .....	24
Tabela 2.1. Processos de produção de cervejas sem álcool (continuação). Adaptado de: Ambrosi, 2016; Costa, 2016; Catarino & Mendes, 2011 .....	25
Tabela 2.2. Tabela nutricional Cerveja e Cerveja sem Álcool. Adaptado de: SCC, 2017d; SCC, 2017e .....	27
Tabela 3.1. Tipos de enzimas e as suas funções. Adaptado de: FIB, 2011; Ferreira <i>et al.</i> , 2009; Novozymes, 2017a.....	35
Tabela 5.1. Caracterização do Mosto - Resultados pH e oxigénio do mosto.....	50
Tabela 5.2. Condições do Ensaio 1 - Condições ótimas da enzima.....	53
Tabela 5.3. Ensaio 1 – Variação do pH e O <sub>2</sub> nas condições ótimas da enzima.....	53
Tabela 5.4 - Condições do ensaio 2 - Tubos EBC: efeito da quantidade de enzima e arejamento ...	55
Tabela 5.5. Ensaio 2 - Tubos EBC: efeito da quantidade de enzima e arejamento .....	56
Tabela 5.6. Condições Ensaio 3 - Frascos Schott: efeito do arejamento e quantidade de enzima ...	58
Tabela 5.7. Ensaio 3.1 - Frascos Schott: efeito do arejamento.....	58
Tabela 5.8. Ensaio 3.2 - Frascos Schott: efeito da nova enzima .....	59
Tabela 5.9. Ensaio 3.3 e 3.4 - Frascos Schott: efeito das diferentes concentrações de oxigénio .....	61
Tabela 5.10. Ensaio 3.5 - Frascos Schott: efeito de diferentes quantidades de enzima .....	62
Tabela 5.11. Condições de Ensaio 4 - Inativação da enzima por pasteurização .....	64
Tabela 5.12. Ensaio 4 - Inativação da Enzima por pasteurização.....	65
Tabela 5.13. Condições do Ensaio 5 - Inativação da enzima por fervura.....	69
Tabela 5.14. Ensaio 5.1 - Inativação da enzima por fervura: 1 hora a Y+60 °C .....	69
Tabela 5.15. Ensaio 5.2 - Inativação da enzima por fervura: 4 horas a Y+60 °C.....	70
Tabela 5.16. Ensaio 5.3 - Inativação da enzima por fervura: 24 horas a Y+60 °C.....	71
Tabela 5.17. Condições Ensaio 6 – Inativação da enzima por pasteurização .....	73
Tabela 5.18. Análise de pHs no ensaio 6.....	74
Tabela 5.19. Ensaio 6.1 – Pasteurização Y+80 °C (10 minutos).....	75
Tabela 5.20. Ensaio 6.2 - Pasteurização Y+85 °C (10 minutos) .....	76
Tabela 5.21. Resultados obtidos pelo laboratório que forneceu a enzima. ....	78
Tabela 5.22. Resumo final dos vários ensaios realizados .....	79
Tabela 5.22. Resumo final dos vários ensaios realizados (continuação) .....	80
Tabela 5.23. Valores de absorvância.....	82
Tabela 5.24. Resultados variação de absorvância e concentração de glucose.....	82

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

**ADN**, ácido desoxirribonucleico

**CE**, Comunidade Europeia

**cL**, centilitro

**CO<sub>2</sub>**, Dióxido de Carbono

**E.P**, Empresa Pública

**EUA**, Estados Unidos da América

**FDA**, *Food and Drugs Administration*

**g**, gramas

**GRAS**, *Generally Recognized As Safe*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, peróxido de hidrogénio

**kcal**, Quilocalorias

**L**, litro

**mL**, mililitro

**nm**, nanometros

**O<sub>2</sub>**, Oxigénio

**OMS**, Organização Mundial da Saúde

**pH**, potencial de Hidrogénio

**ppm**, partes por milhão

**S.A**, Sociedade Anónima

**S.A.R.L**, Sociedade Anónima de Responsabilidade Limitada

**SCC**, Sociedade Central de Cervejas e Bebidas

**SGPS**, Sociedades Gestoras de Participações Limitadas

**UP's**, unidades de pasteurização

**°C**, grau Celsius

**µg**, micrograma

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

## Introdução

O presente trabalho foi realizado na Sociedade Central de Cervejas e Bebidas (SCC), em Vialonga, com o intuito de avaliar um novo processo de produção de cerveja sem álcool, nomeadamente a cerveja Sagres sem Álcool.

Com uma quota de mercado de apenas 2% em relação às restantes cervejas, a cerveja sem álcool é caracterizada pelo seu sabor adocicado e a mosto, proveniente dos processos que são utilizados para a remoção ou inibição da produção de álcool. De forma a contornar o impacto que estes processos causam nas cervejas, muitas cervejeiras sentem necessidade de recorrer à adição de alguns ácidos, conseguindo assim baixar o pH destas cervejas e conseqüente diminuição da sua doçura.

Apesar dos vários esforços por parte destas indústrias para melhorarem as características organoléticas dos seus produtos, parece não ser suficiente para estas aumentarem o número de vendas de cerveja sem álcool e atrair os consumidores para este tipo de produto.

Destinado, para muitos, como uma bebida para certas ocasiões de consumo, nomeadamente para quando se vai conduzir, em casos de gravidez ou doença, a cerveja sem álcool é considerada mais saudável e com um baixo teor de calorías em relação às restantes bebidas alcoólicas.

Uma vez que atualmente a SCC utiliza um processo de produção de cerveja sem álcool por fermentação interrompida/limitada, que para além de evitar a formação de álcool da cerveja durante a fermentação, leva a que não haja formação de compostos aromáticos, e conseqüentemente torna necessário recorrer à adição de ácidos para diminuir o seu sabor doce.

Neste sentido, o presente trabalho, pretende avaliar um novo processo de produção, de forma a melhorar as características organoléticas do produto final.

Desta forma, estudou-se a utilização de uma enzima, glucose oxidase, que promove a oxidação da glucose a ácido glucónico, sendo possível diminuir o sabor doce da cerveja ao mesmo tempo que aumentamos a sua acidez.

Atualmente esta enzima é utilizada em várias áreas da indústria alimentar, no entanto, na remoção do álcool das bebidas, só é utilizada para produção de vinhos sem álcool.

Para a realização deste trabalho foi necessário estudar o comportamento da enzima quando sujeita a diversas condições. Assim, foram realizados ensaios com as condições ótimas da enzima e ensaios onde se aplicou algumas das condições de produção, uma vez que as condições utilizadas durante a produção da cerveja, poderiam ser condicionantes para a que a reação ocorresse. Validou-se vários parâmetros como: o efeito da temperatura, do arejamento e da pasteurização na inativação da enzima. Por último fez-se uma prova de análise sensorial, para avaliar as suas características organoléticas, comparando o mosto onde se utilizou enzima com uma cerveja sagres sem álcool.

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

## **Descrição dos capítulos**

### **Capítulo 1: Sociedade Central de Cervejas e Bebidas**

Neste capítulo são desenvolvidos vários aspetos inerentes à empresa onde foi realizado o estágio para a presente dissertação. É feita uma breve introdução da mesma e da sua história, apresentados os vários produtos produzidos por esta e é referida a importância que a inovação de produtos ou processos têm numa empresa como a Sociedade Central de Cervejas.

### **Capítulo 2: A cerveja**

A presente dissertação foi realizada no sentido de melhorar as características organolépticas da cerveja sem álcool. Assim, neste capítulo pode-se encontrar a definição da cerveja segundo a legislação portuguesa bem como a sua história. As matérias primas para a sua produção bem como o seu processo produtivo são também aqui apresentados, focando ainda aspetos importantes da produção de cerveja sem álcool e os benefícios da mesma a nível da saúde.

### **Capítulo 3: As enzimas**

Uma vez que a melhoria das características organolépticas da cerveja sem álcool seria realizada com recurso a uma enzima, é fundamental que se conheça o seu conceito, o mecanismo, os vários fatores que vão influenciar a sua atividade, as várias classes de enzimas, bem como as suas aplicações na indústria alimentar e cervejeira. Posto isto, é feito um enquadramento da enzima utilizada neste processo assim como os fatores que influenciam a sua reação. Por último as suas aplicações atuais na indústria alimentar.

### **Capítulo 4: Metodologia**

Neste capítulo é explicado o objetivo do trabalho, como é realizada a monitorização da atividade enzimática e descrita a metodologia geral dos ensaios realizados, bem como dos equipamentos utilizados em laboratório.

### **Capítulo 5: Parte experimental**

Aqui são descritos os vários ensaios que foram realizados. Inicialmente caracterizou-se o mosto, posteriormente realizou-se ensaios com utilização da enzima e ensaios para a inativação da mesma. Foram ainda realizados ensaios para avaliar a concentração de glucose no mosto com e sem a utilização da enzima. Por fim foi realizada uma prova de análise de sensorial.

## **Capítulo 6: Conclusões**

Neste capítulo são descritas as várias conclusões que se obteve com a realização destes ensaios, bem como a viabilidade da utilização desta enzima no processo de produção de Cerveja sem álcool.

# Capítulo 1:

## **Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, S.A**

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

## 1. Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, S.A

### 1.1. Descrição da Empresa

A Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, **figura 1.1**, surgiu em 1934 e desde 2008 que faz parte do grupo Heineken, e, assenta em quatro eixos de negócio: o mercado nacional, exportação, as águas e refrigerantes e distribuição.

A sua fábrica está situada em Vialonga, concelho de Vila Franca De Xira, e, é aí que é produzida e engarrafa a Cerveja Sagres com e sem álcool. Para além da produção de cerveja, aqui, é também produzido e comercializado o malte. Detém ainda

uma Unidade Industrial na Vacariça, Mealhada, onde são captadas e engarrafadas as águas minerais e de nascente, Luso e Cruzeiro, as Termas do Luso e a empresa de Distribuição Novadis (SCC, 2017a).

A sua visão é: *“Juntos, fazemos as marcas que as pessoas adoram beber”*.



Figura 1.1. Símbolo da Sociedade Central de Cervejas e Bebidas.

(SCC, 2017a)

### 1.2. História

A Sociedade Central de Cervejas, foi constituída em 1934 com o objetivo de comercializar as cervejas produzidas pelas antigas: Companhia Produtora de Malte e Cerveja Portugália, Companhia de Cervejas Estrela, Companhia de Cervejas Coimbra e Companhia da Fábrica de Cerveja Jansen.

Em 1977 a Centralcer – Central de Cervejas, E.P. foi constituída em consequência da fusão da Sociedade Central de Cervejas, S.A.R.L e da Cergal – Cervejas de Portugal, S.A.R.L, sendo em 1990, o seu capital totalmente privatizado e o grupo empresarial Bavaria adquirido uma participação no capital da Centralcer - Central de Cervejas, S.A., tornando-se um dos seus principais acionistas.

Em 2000, dá-se uma nova alteração na constituição do capital acionista, como resultado da sua venda à VTR-SGPS, S.A., um grupo de investidores portugueses. Meses mais tarde este grupo viria a ceder uma posição de 49% ao grupo cervejeiro internacional Scottish & Newcastle.

Em dezembro de 2001 houve uma reestruturação do grupo passando a Centralcer – Central de Cervejas, S.A. a incorporar a Centralcontrol S.G.P.S., S.A.. A nova entidade resultante desta fusão alterou a sua denominação para SCC - Sociedade Central de Cervejas, S.A., bem como a sua sede para as atuais instalações fabris, em Vialonga.

Em 2003, a Scottish & Newcastle adquiriu a totalidade das ações, o que lhe permitiu passar a deter o controlo total da Sociedade Central de Cervejas e da Sociedade da Água de Luso.

A partir de 2004, a empresa passou a designar-se, SCC – Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, S.A., nome que reflete melhor o âmbito da sua atividade que, para além da cerveja inclui outras bebidas como a água e refrigerantes.

Em 2007, após ter sido estabelecido um Consórcio entre a Carlsberg e a Heineken, teve lugar um processo de oferta de compra do Grupo Scottish & Newcastle por este Consórcio. Como resultado

das negociações, a Heineken assumiu, em 2008, o controlo da Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, após a conclusão do processo de compra da Scottish & Newcastle (SCC, 2017a).

### 1.3. Marcas e Produtos

A Sociedade Central de Cervejas e Bebidas conta com diversos produtos produzidos e comercializados, tais como: a cerveja Sagres, a Heineken, as sidras e as águas de Luso, para além das marcas internacionais (SCC, 2017b).

#### 1.3.1. Sagres

Dentro da marca sagres, podemos encontrar uma grande variedade de produtos, tais como os descritos seguidamente na **figura 1.2** (SCC, 2017b).

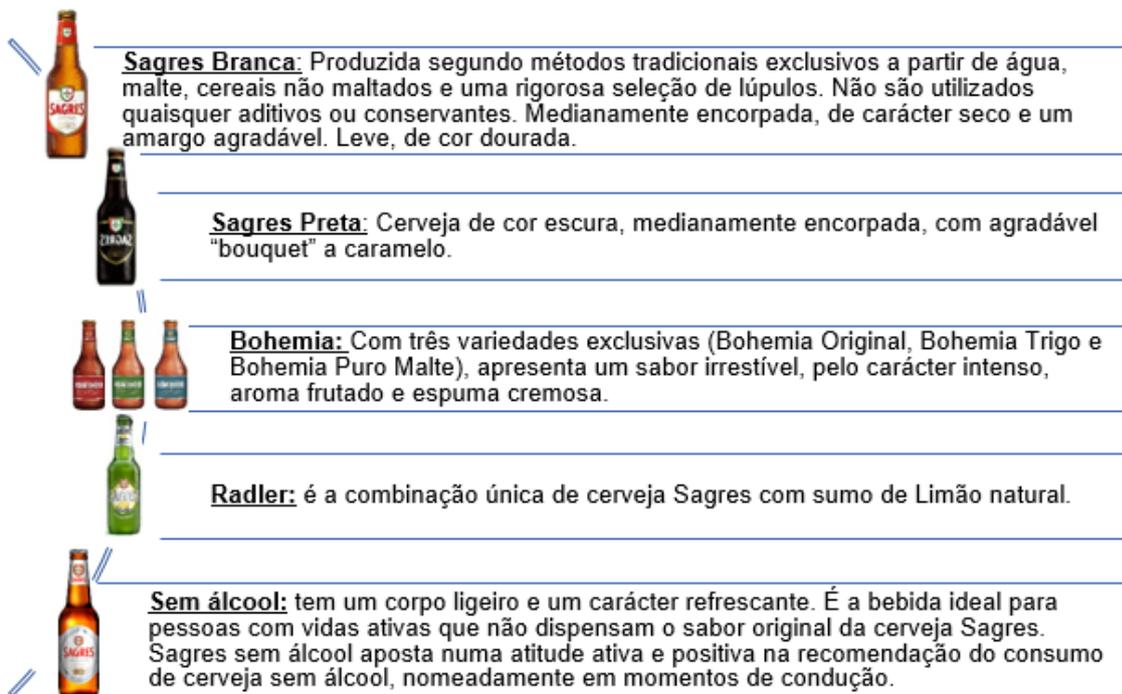


Figura 1.2. Cervejas Produzidas Pela SCC. **Adaptado de:** SCC, 2017b

### 1.3.2. Heineken

Atualmente a marca Heineken, **figura 1.3**, faz parte do portefólio de bebidas comercializadas pela Sociedade Central de Cerveja (SCC, 2017b).



A marca Heineken tornou-se na cerveja internacional *premium* mais reconhecida em todo o Mundo. A Heineken é produzida com malte, água e lúpulo possuindo um aroma bem balanceado, com algumas notas frutadas, amargor equilibrado e sabor refrescante

Figura 1.3. Cerveja Heineken. **Adaptado de:** SCC, 2017b

### 1.3.3. Internacionais

São várias as bebidas internacionais que fazem parte dos produtos da Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, os quais se encontram descritos na **figura 1.4** (SCC, 2017b).

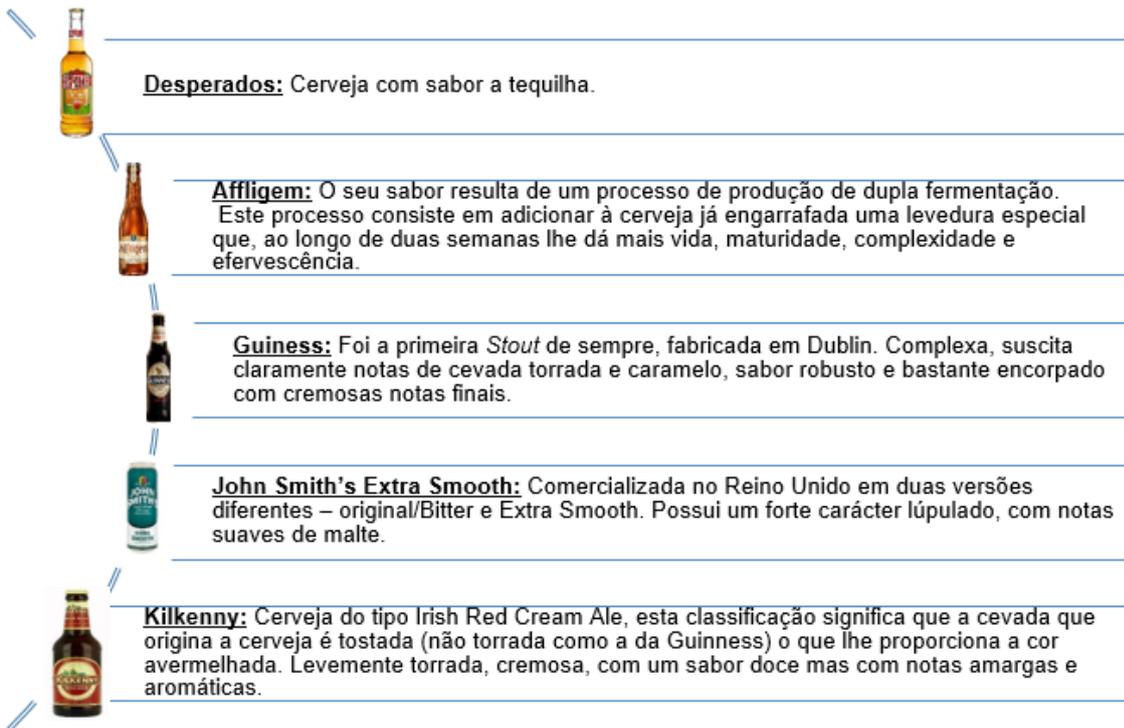


Figura 1.4. Marcas Internacionais Comercializadas pela SCC. **Adaptado de:** SCC, 2017b

### 1.3.4. Sidras

A Bandida do Pomar e a Strongbow, **figura 1.5**, são as duas sidras pertencentes aos produtos produzidos pela Central de Cervejas (SCC, 2017b).

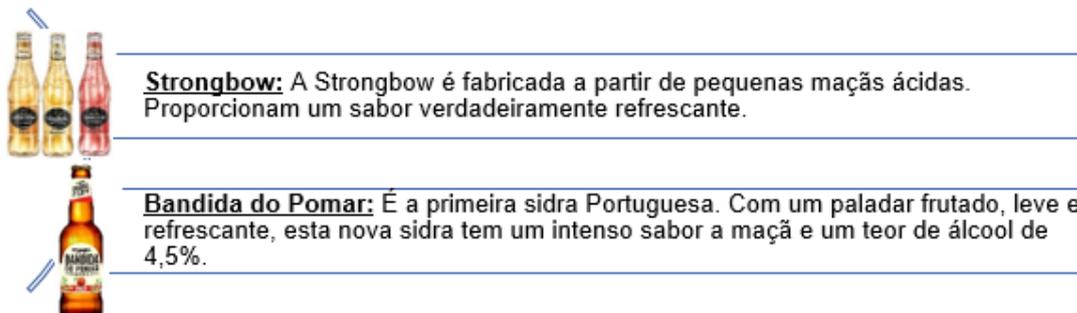


Figura 1.5. Sidras produzidas pela SCC. **Adaptado de: SCC, 2017b.**

### 1.3.5. Águas

Dentro do grupo das águas, existe a água Luso lisa e com gás, e Luso de fruta, e água Cruzeiro, as mesmas encontram-se descritas na **figura 1.6** (SCC, 2017b).

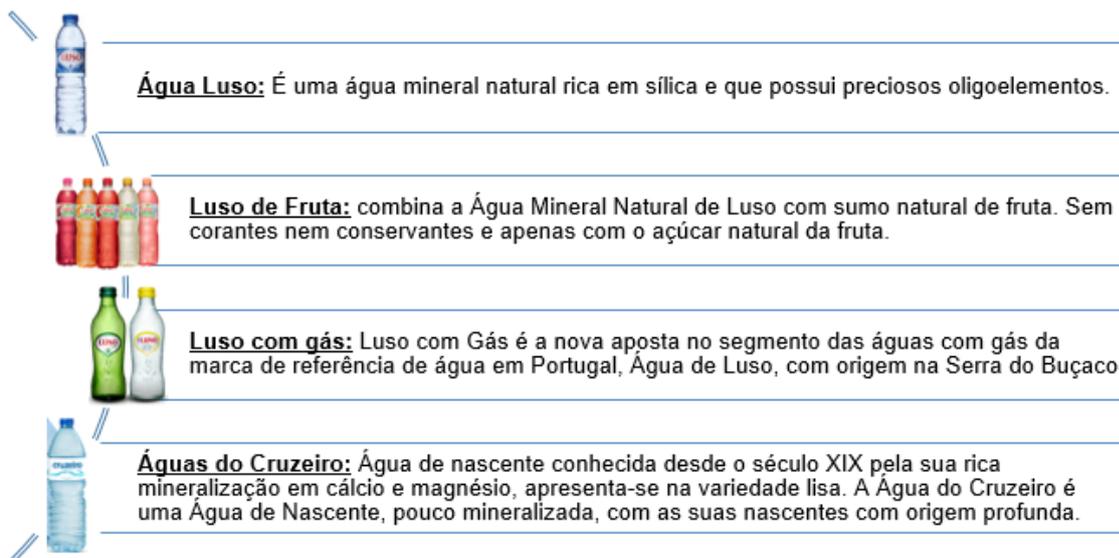


Figura 1.6. Água Produzidas pela SCC. **Adaptado de: SCC, 2017b**

## 1.4. Inovação

Entende-se por inovação o processo que inclui as atividades técnicas, a conceção, o desenvolvimento e a gestão e que resulta na venda de novos produtos ou produtos melhorados, ou na utilização de novos processos ou processos melhorados.

Desta forma, podemos dizer que inovação é a introdução da invenção no mercado de algo novo ou melhorado, enquanto a invenção é a criação do processo, de uma técnica ou de um produto (Sidónio *et al.*, 2013).

Um dos seus objetivos é entregar ao consumidor um produto com a melhor relação qualidade/preço possível e atender às necessidades deste, ou se possível antecipá-las, antes e melhor que a concorrência (Krücken-Pereira *et al.*, 2002).

Até ao produto inovado chegar ao consumidor, este passa por várias fases de desenvolvimento e validação, podendo ser classificada em cinco categorias: os novos produtos, novos métodos de produção, novos mercados, novas fontes de matéria-prima e novas formas de organização.

A inovação não é linear, resultando desta forma, de uma interação entre diversos agentes e envolvendo conhecimentos e experiências, provenientes das mais diversas áreas de atividade de uma empresa (Sidónio *et al.*, 2013).

A necessidade de uma empresa inovar surge, não só como consequência do dinamismo do mercado, resultando este de fatores de ordem económica, social, demográfica, política, ambiental, cultural e tecnológica, mas também por mudanças na legislação, mudanças tecnológicas e mudanças no comportamento dos consumidores (Krücken-Pereira *et al.*, 2002).

Assim, a Central de Cervejas decidiu apostar no desenvolvimento de novos produtos com o aparecimento da Luso Fresh, Sagres Bohemia e Sagres Zero, em 2005.

Desde aí, foram vários os produtos desenvolvidos nestes últimos dez anos. No entanto este último ano foi marcado pelo desenvolvimento de produtos, **figura 1.7**, como Luso de fruta, com um novo sabor de Goiaba e Toranja; a Sagres Radler que lança o novo sabor, de Lima-frutos vermelhos, juntando-se esta à de Limão; e a Bohemia que apresenta três variedades, a Bohemia original, a puro malte e trigo. No final de 2016 foi lançada a Bohemia Bock e já no ano de 2017 a Bohemia IPA. 2017 foi ainda marcado pelo lançamento da primeira sidra portuguesa, a Bandida do Pomar, que apresenta um paladar frutado, leve e refrescante (SCC, 2017c).



Figura 1.7. Produtos desenvolvidos em 2016/2017. Adaptado de: SCC, 2017b.



## **Capítulo 2:**

# **A Cerveja**



## 2. A cerveja

### 2.1. Definição

Segundo a *Portaria nº 1/96 de 3 de Janeiro*, cerveja é uma bebida obtida por fermentação alcoólica, através da utilização de leveduras selecionadas do género *Saccharomyces*, de um mosto preparado a partir de malte de cereais, principalmente cevada e outras matérias primas amiláceas ou açucaradas, ao qual foram adicionadas flores de lúpulo ou os seus derivados, bem como água potável. A mesma Portaria define ainda que o teor alcoólico da cerveja sem álcool tem de ser igual ou inferior a 0.5% volume, estabelecendo um valor de pH entre 3,5 e 5,0, inclusive.

### 2.2. História

A cerveja já era conhecida por várias civilizações antigas, sendo muito popular em regiões onde o clima não era propício ao cultivo de uvas. A cerveja é uma bebida de ampla difusão e intenso consumo, sendo conhecida desde a antiguidade em diversos países do mundo. No entanto, não há nenhuma certeza quanto à sua origem (Scheffer *et al.*, 2013).

No antigo Egipto os faraós consumiam a bebida há aproximadamente 6000 anos a.C.. Em 3000 a.C. os sumérios, foram considerados pioneiros na elaboração da cerveja, sendo sucedidos por outros povos, que tornaram esta bebida popular (Scheffer *et al.*, 2013).

Na Idade Média os conventos assumiram o controlo sobre a produção da cerveja, uma vez que estes detinham os manuscritos onde ensinavam os métodos de produção (Ambrosi, 2016). No século XVIII surgiram as primeiras técnicas científicas da produção desta bebida, como o controlo da temperatura de maltagem, bem como a medição sistemática dos ingredientes usados (Scheffer *et al.*, 2013). Com o aumento da produção surgiram as cervejarias independentes, que contribuíram para o estudo de técnicas de produção e para a evolução do produto final (Ambrosi, 2016).

Por outro lado, sabe-se que a cerveja sem álcool surgiu no ano 2000 a.C, no templo dedicado à deusa Athor, no antigo Egipto. Os recipientes que continham cerveja eram posicionados junto à estátua e aquecidos. Deste modo, o vapor da cerveja (álcool) era oferecido à deusa. O líquido remanescente (cerveja sem álcool) era vendido entre os seus seguidores (Costa, 2016).

Apesar disto, os produtos associados a este mercado podem ser considerados relativamente novos (Costa, 2016). Pois foi durante as guerras mundiais que a escassez de matérias primas levava à produção de cervejas com baixo extrato original e reduzido conteúdo alcoólico.

No início do século XX com o aparecimento da lei seca, nos EUA, Canada e alguns países europeus, foi proibida a produção, venda e consumo de álcool, o que levou à produção de cervejas com um baixo conteúdo alcoólico (Brányik *et al.*, 2012; Ambrosi, 2016; Leite *et al.*, 2013).

No final da década de 70 a produção de cervejas sem álcool voltou a ter importância, visto que neste período, devido a alterações na legislação, iniciou-se as restrições relacionadas com o consumo de álcool e condução de veículos motorizados (Costa, 2016).

O aumento da produção e consumo, deste tipo de produto no final do século XX, foi motivado pelo aumento do número de pessoas que se converteram a religiões que proíbem o consumo de álcool, a uma maior preocupação com a saúde e intervenções legislativas que consciencializam os consumidores sobre o consumo moderado de cerveja. Esta cerveja apresenta-se também como uma alternativa a grupos específicos da população, como mulheres grávidas ou que estão no período de amamentação, pessoas que estão sob tratamento médico ou ainda durante o expediente de trabalho (Scheffer *et al.*, 2013; Ambrosi, 2016; Brányik *et al.*, 2012; Costa, 2016).

### 2.3. Matérias Primas

Para a produção de cerveja sem álcool, são utilizadas as mesmas matérias primas, utilizadas no processo da cerveja com álcool, apresentadas na **figura 2.1** (Costa, 2016). A água, o malte de cevada, o lúpulo e a levedura, que contribuem para o sabor e qualidade da cerveja.

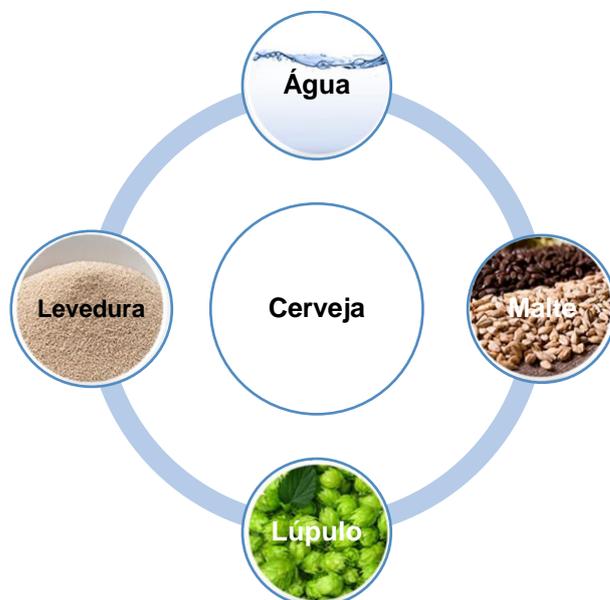


Figura 2.1. Matérias primas da Cerveja. Adaptado de: **Como fazer cerveja, 2009**

#### 2.3.1. Água



Figura 2.2. Água. Adaptado de: **Cervalaria, 2017**

A água, **figura 2.2**, é a matéria-prima mais importante no processo de produção da cerveja, pois corresponde a aproximadamente a 92% do seu peso (Costa, 2016; Scheffer *et al.*, 2013; Heineken, 2014). O conteúdo mineral, como o cálcio, o cloreto e os sulfatos presentes na água podem alterar não só o sabor, mas também a cor, o aroma e até a aparência da cerveja. As características das diferentes cervejas são influenciadas pela composição da água utilizada na sua produção. A concentração de sais, tais como o cálcio e o magnésio vão influenciar a dureza da água, as águas com elevadas concentrações de sais minerais apresentam maior dureza, sendo indicadas para a produção

de cervejas mais escuras e fortes, já as águas que apresentam uma menor concentração destes sais, são indicadas para a produção de cervejas mais claras e leves (Costa, 2016).

Toda a água deve ser tratada antes de ser utilizada no processo produtivo, não só para a produção de cerveja, mas também para o malte, para a limpeza e arrefecimento. Sendo também necessário para a sua utilização, a realização de algumas análises químicas, tais como: a cor, turvação, dureza, pH, para que se possa definir o tipo de tratamento a utilizar. Quase todas as cervejeiras têm o seu próprio ponto de recolha de água, o que permite conferir à água diferentes tratamentos, consoante o tipo de cerveja que será fabricado (Scheffer *et al.*, 2013; Heineken, 2014).

### 2.3.2. Malte de Cevada

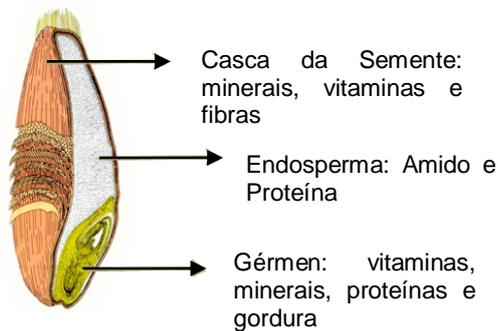


Figura 2.3. Composição da Cevada. Adaptado de: Flores, D. 2015

A cevada, **figura 2.3**, é o cereal mais utilizado na fabricação de cerveja. Os grãos de cevada são constituídos por uma casca externa, endosperma amiláceo e o gérmen. A casca para além de proteção externa ao grão, serve também como elemento filtrante na etapa de filtração do mosto. O endosperma amiláceo é um tecido de reserva que acumula amido no interior das suas células, sendo este constituído por dois tipos de moléculas, a amilose e a amilopectina, que são hidrolisadas durante a etapa de produção de mosto,

compondo o extrato fermentável (Costa, 2016). O grão de cevada, deve-se apresentar seco, com alto teor de amido e baixo teor de proteína, pois as proteínas contribuem para a turvação da cerveja (Scheffer *et al.*, 2013; Heineken, 2014).

O malte é o produto obtido pela germinação controlada das sementes, neste caso da cevada, para uso industrial. É através deste que se determina as características da cerveja, pois a combinação correta irá determinar, a cor final, o sabor, a sensação na boca e o aroma da cerveja (Schuh & Preci, 2014).

A este processo de germinação do malte, designa-se por maltagem e tem como objetivo, aumentar o conteúdo enzimático dos grãos de cevada através da síntese de enzimas, o que aumenta o poder diastásico (Costa, 2016). A maltagem é constituída por três etapas: a molha, germinação e secagem, sendo esta última que determina, a cor, o aroma e algumas outras características do produto final. Alguns maltes especiais passam igualmente por uma etapa de torrefação, o que lhes confere uma cor mais escura e um sabor torrado (Costa, 2016).

### 2.3.3. Lúpulo



Figura 2.4. Lúpulo  
Adaptado de:  
Inbarco, 2016

O lúpulo, **figura 2.4**, inicialmente utilizado na produção de cerveja por apresentar propriedades antissépticas, é agora também utilizado para dar amargor, equilibrando desta forma, a doçura do malte (Ambrosi, 2016). Os compostos amargos do lúpulo são os  $\alpha$ -ácidos, por ser através destes que a cerveja apresenta o seu sabor amargo, para além disso, beneficiam a estabilidade da espuma e evitam o desenvolvimento de alguns microrganismos (bactérias gram-negativas). Outra substância presente no lúpulo, são os óleos essenciais que contribuem para o aroma da cerveja (Costa, 2016; Scheffer *et al.*, 2013; Heineken, 2014).

As diferentes variedades de lúpulo apresentam um sabor e perfil de aroma próprio, podendo ser classificados em lúpulos de amargor e lúpulos de aroma. Os lúpulos de amargor, são ricos em  $\alpha$ -ácidos, enquanto que os lúpulos de aroma, têm uma baixa concentração de  $\alpha$ -ácidos e maior teor de óleos essenciais. Desta forma, é possível escolher qual o utilizado, conforme o paladar da cerveja pretendida, bem como pelas exigências do mercado (Costa, 2016; Schuh & Preci, 2014).

### 2.3.4. Leveduras

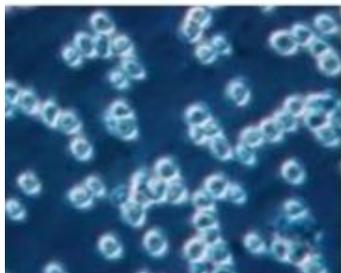


Figura 2.5. Leveduras.  
Adaptado de: Heineken, 2014

As leveduras, **figura 2.5**, utilizadas para a produção de cerveja, desempenham um papel importante no aroma e sabor da mesma (Scheffer *et al.*, 2013). Estes são microrganismos eucariontes, unicelulares que pertencem ao Reino *Fungi*. Dentro deste grupo de microrganismos, destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*, que é utilizada na produção de alimentos e bebidas, pela sua capacidade de converter açúcares em etanol e CO<sub>2</sub> na ausência de oxigénio, apresentando ainda uma elevada atividade fermentativa, por conseguir fermentar uma grande variedade de açúcares (Schuh & Preci, 2014; Scheffer *et al.*, 2013; Costa, 2016).

As leveduras do tipo Ale são habitualmente designadas pelas *Saccharomyces cerevisiae*, já as do tipo Lager, são habitualmente designadas por *Saccharomyces pastorianus*. As do tipo Ale, são utilizadas a temperaturas entre 15 °C a 22 °C, sendo consideradas leveduras de fermentação de topo, pois sobem à superfície durante a fermentação, formando uma camada extensa, rica em leveduras. Por outro lado, as leveduras do tipo Lager, utilizam temperaturas entre 7 °C a 15 °C, crescendo de forma mais lenta e com menos espuma, sedimentando no fundo do fermentador no final do processo de fermentação (Schuh & Preci, 2014).

As leveduras utilizam uma ampla variedade de nutrientes para manter o seu crescimento e consequentemente produzir energia, entre eles destacam-se os açúcares e aminoácidos, por apresentarem uma maior importância para o desempenho da fermentação, e desta forma, para a qualidade da cerveja (Costa, 2016).

### 2.3.5. Outros Produtos:

Durante o processo podem ainda ser utilizados adjuntos como por exemplo, milho e cevada e ingredientes como: o açúcar amarelo, mel, lactose, xarope de ácer, ervas, especiarias e frutas, de forma a melhorar o seu aroma e sabor (Teixeira, 2014).

Outros auxiliares tecnológicos que podem ser adicionados são: os antioxidantes, estabilizantes, estabilizadores de espuma, acidificantes e enzimas, com o intuito de manter ou melhorar algumas das características da cerveja (Schuh & Preci, 2014; Teixeira, 2014; Scheffer *et al.*, 2013).

## 2.5. Processo de produção de cerveja

O processo de produção de cerveja consiste numa série de etapas, as mesmas encontram-se descritas na **figura 2.6**, sendo o seu principal objetivo converter a fonte de amido em mosto, e os açúcares deste em álcool pela fermentação através das leveduras (Ambrosi, 2016).

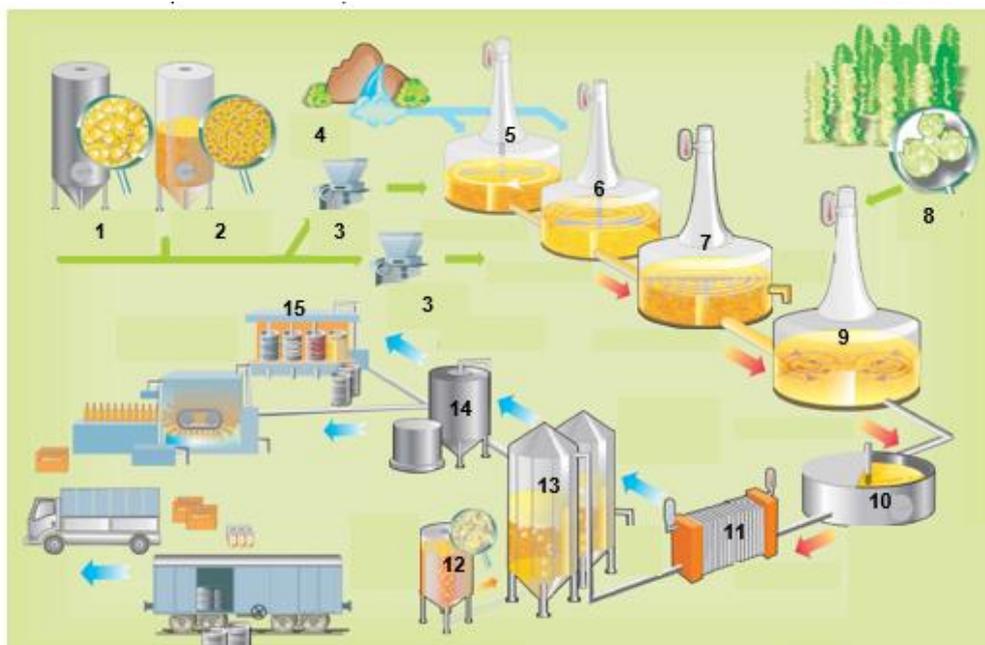


Figura 2.6. Processo de Produção de Cerveja. Adaptado de: Novozymes, 2017c

**Legenda:** 1 – Silos adjuntos (cereais não maltados: cevada, milho, arroz, trigo); 2- Silo Malte; 3- Moinhos; 4- Água; 5- Caldeira caldas; 6 – Caldeira empastagem; 7- Filtração mosto; 8- Lúpulo; 9- Caldeira ebulição; 10 – whirlpool; 11 – Arrefecedor de mosto; 12- Tanque de leveduras; 13 - Fermentação e guarda; 14 – Filtração da cerveja; 15 – Enchimento e distribuição.

### 2.5.1. Maltagem

O processo de produção de cerveja inicia-se com a produção do malte. O amido presente na semente do grão, geralmente a cevada, não é solúvel em água, e, por isso passa por um processo de maltagem. Para tal é necessário que os cereais recebidos sejam limpos de forma a eliminar

impurezas como, ervas daninhas, palha, pedras, e calibrados segundo o seu tamanho, para que se obtenha um malte homogéneo.

A maltagem divide-se em três etapas: a molha, a germinação e a secagem (Heineken, 2014). Após serem limpos, seguem para um tanque com água, e, devido à sua absorção estes incham, iniciando-se o processo de germinação dos grãos.

Na fase de germinação, os grãos são enviados para as caixas de germinação, onde permanecem sob as condições ideais de temperatura e humidade, até começar a surgir as radículas. O principal objetivo desta etapa é produzir enzimas, para a degradação da parede celular e de proteínas da matriz, que envolvem os grânulos de amido, de forma a que estas estejam disponíveis para serem utilizadas em etapas posteriores.

Após esta etapa os cereais são encaminhados para fornos de secagem, a água é removida e o processo de germinação é interrompido, transformando-se em malte (Scheffer *et al.*, 2013; Schuh & Preci, 2014; Heineken, 2014).

Após a produção do malte, o cereal será moído, através da ação de moinhos de martelo ou rolo, de forma a expor o conteúdo amiláceo presente no seu interior, para facilitar a ação das enzimas na etapa seguinte. As cascas deverão ser rompidas e não trituradas, pois as mesmas servirão como meio filtrante na etapa seguinte à preparação do mosto (Ambrosi, 2016; Costa, 2016; Scheffer *et al.*, 2013).

### **2.5.2. Brassagem**

Os cereais já moídos são encaminhados para a caldeira de empastagem que contém água quente. Esta mistura é aquecida gradualmente entre 40 °C a 78 °C, para ativar algumas enzimas presentes no malte, sendo as duas principais a  $\alpha$ -amilase e a  $\beta$ -amilase, que são responsáveis pela hidrólise do amido, hidratos de carbono complexos e insolúveis (amilose e amilopectina) em outros mais simples, que podem ser fermentescíveis ou não, pelas leveduras durante o processo de fermentação, a hidrólise de proteínas em aminoácidos livres e a degradação das cadeias de  $\beta$ -glucano (Ambrosi, 2016; Costa, 2016; Heineken, 2014).

Na filtração, o mosto proveniente da etapa anterior é separado da fração insolúvel do malte, sendo o principal objetivo desta etapa, obter um mosto clarificado, ou seja, extrair as substâncias não dissolvidas (resíduos ou sedimentos) das substâncias dissolvidas (mosto). Na tina de filtração utiliza-se um fundo falso, que é utilizado para suportar as cascas que vão formar um meio filtrante para o mosto. O mosto circula nessa tina até se obter a limpidez desejada, sendo posteriormente removido. Os grãos são então lavados com água, a uma temperatura de 78 °C, para aumentar a recuperação dos açúcares (Ambrosi, 2016; Costa, 2016; Scheffer *et al.*, 2013; Heineken, 2014).

Após a filtração, o mosto é fervido até a ebulição, de forma a que se obtenha a sua estabilização. Aqui são também adicionados os lúpulos, para que sejam libertados os óleos essenciais que compõem parte do aroma e sabor da cerveja e para isomerização dos  $\alpha$ -ácidos, que lhe conferem o seu amargor. Nesta fase podem adicionar-se, para além do lúpulo, outros ingredientes que vão proporcionar as características organoléticas de cada tipo de cerveja como por exemplo, o caramelo, açúcar, mel, extratos vegetais, entre outros. Com a fervura, além da evaporação da água, que leva à

concentração do mosto, as temperaturas elevadas vão também permitir a inativação das enzimas, a esterilização do mosto, a transferência de compostos amargos e aromáticos do lúpulo, a coagulação de proteínas e a evaporação de outros compostos voláteis indesejáveis (Ambrosi, 2016; Costa, 2016; Scheffer *et al.*, 2013; Heineken, 2014).

Após a fervura, o mosto segue para um novo recipiente, o whirlpool. Aqui a entrada de forma tangencial à superfície do recipiente, provoca um movimento circular do líquido criando um vórtice, que permite aglomerar as proteínas e o material particulado no centro do tanque. Desta forma, o resíduo composto pelos materiais insolúveis do lúpulo e das proteínas coaguladas durante a fervura, vão ser separadas do mosto, pois a presença destas partículas, podem comprometer a qualidade da fermentação (Ambrosi, 2016; Costa, 2016; Schuh & Preci, 2014).

O mosto então separado, segue para uma etapa de arrefecimento. Esta deve ser realizada o mais rápido possível, de forma a evitar, não só a oxidação do mosto e a formação de aromas indesejáveis, devido às altas temperaturas, como também a sua contaminação (Ambrosi, 2016; Costa, 2016).

### **2.5.3. Fermentação**

Ao entrar nos tanques de fermentação, o mosto já frio é arejado para que as leveduras adicionadas possam obter oxigénio suficiente para a sua multiplicação. Estas são responsáveis pela conversão dos açúcares fermentescíveis, principalmente a maltose e glucose, em álcool e dióxido de carbono. A fermentação do mosto vai ser influenciada pela sua composição, nível de oxigénio inicial, concentração e viabilidade celular e temperatura de fermentação. Nos primeiros dias a levedura usa o oxigénio do mosto, cresce e reproduz-se. Quando o oxigénio é consumido, começa a fase anaeróbia. É durante esta etapa, que quase todo o extrato fermentescível é convertido em etanol, CO<sub>2</sub> e outros subprodutos, tais como: diacetilo, álcoois superiores, aldeídos, ésteres e ácidos carboxílicos, que vão influenciar o sabor da cerveja. Os álcoois superiores e os ésteres, são responsáveis pelas características frutadas que algumas cervejas podem apresentar. A temperatura e o tempo utilizados na fermentação vão depender do tipo de cerveja que se pretende produzir (Ambrosi, 2016; Costa, 2016; Schuh & Preci, 2014).

### **2.5.4. Guarda**

Após a fermentação a cerveja é maturada. Nesta fase, a maior parte dos açúcares já foi metabolizada e transformada em etanol, dióxido de carbono, glicerol, ácido acético e ésteres. Durante esta etapa, pode ocorrer uma fermentação complementar da cerveja, resultando em alterações do aroma e sabor e uma clarificação da cerveja pela precipitação das proteínas, leveduras e sólidos solúveis, a temperaturas muito baixas (Scheffer *et al.*, 2013; Schuh & Preci, 2014).

### **2.5.5. Filtração**

Após o processo de maturação, a cerveja é geralmente filtrada e carbonatada. A filtração é feita através de filtros com auxílio de terra de diatomácea devidamente calcinada e com concentração de ferro controlada. O processo de filtração permite melhorar a estabilidade microbiológica, coloidal

e organolética, uma vez que remove pequenas partículas e células de levedura, deixando a cerveja clara e brilhante (Ambrosi, 2016; Costa, 2016).

### **2.5.6. Engarrafamento**

Após a filtração e a carbonatação segue-se a pasteurização e o engarrafamento, sendo a pasteurização também responsável pela estabilização microbiológica da cerveja, permitindo aumentar o tempo de vida útil da mesma (Ambrosi, 2016; Costa, 2016).

## **2.6. Produção de cerveja sem álcool**

O consumo de cervejas sem álcool tem aumentado nos últimos anos, principalmente pelas novas regras aplicadas a quem conduz, a questões de saúde e a razões religiosas. No entanto, o seu baixo perfil aromático, o sabor doce e a mosto, bem como o seu baixo corpo, faz com que esta não seja bem aceite pelos consumidores (Costa, 2016; Ambrosi, 2016; Catarino & Mendes, 2011).

É durante a fermentação que a levedura produz subprodutos, como álcoois e ésteres, que vão contribuir para o aroma e sabor da bebida. Ao removermos o álcool da cerveja a única diferença deveria ser o seu teor alcoólico. No entanto, os diferentes processos de produção de cervejas sem álcool podem levar a produtos com características bem diferentes, nomeadamente a nível de sabor (Costa, 2016; Catarino & Mendes, 2011; Ambrosi, 2016).

Os processos de produção podem ser classificados em biológicos ou físicos. No caso dos processos biológicos, ocorre a restrição da formação do álcool, através de modificações no processo durante a etapa de fermentação. Já nos processos físicos, o etanol é removido da cerveja através da utilização de técnicas de separação, as quais ocorrem após a etapa de fermentação (Costa, 2016; Catarino & Mendes, 2011; Ambrosi, 2016).

### **2.6.1. Processos Biológicos**

Na produção de cerveja sem álcool pelos métodos biológicos, a produção de etanol é evitada pela alteração de uma ou mais etapas durante a produção da cerveja, seja pela utilização de ingredientes diferentes ou pela alteração das condições do processo. Estes processos são realizados em equipamentos tradicionais e desta forma não exigem investimentos adicionais. No entanto, a falta de compostos que são formados durante a fermentação vai afetar as características organoléticas da cerveja, fazendo com que a cerveja permaneça com o sabor doce e a mosto.

Dentro destes processos incluem-se a utilização de leveduras especiais, alteração na produção do mosto e fermentação interrompida/limitada (Ambrosi, 2016; Brányik *et al.*, 2012).

Atualmente na Sociedade Central de Cervejas, é utilizado o método de fermentação limitada/controlada.

Este processo consiste em conseguir uma baixa concentração de álcool na cerveja pela remoção da levedura do processo ou pela criação de condições que limitem o metabolismo da levedura (Ambrosi, 2016; Costa, 2016).

Na fermentação limitada utilizam-se baixas temperaturas, e através de um choque térmico consegue-se retardar o crescimento ou matar as leveduras, uma vez que se interrompe a fermentação na sua etapa inicial. A remoção das leveduras do meio fermentativo, por centrifugação ou filtração e o aumento de pressão, são também métodos alternativos para se limitar a fermentação. No entanto, quando estes procedimentos são aplicados há uma menor formação de ésteres e de álcoois superiores, devido à restrição da formação de etanol (Ambrosi, 2016; Costa, 2016).

No caso da fermentação controlada são utilizadas baixas temperaturas, de forma a controlar o metabolismo da levedura para não provocar aromas indesejáveis. Neste caso a formação de álcool é lenta, assim como outros processos bioquímicos, que conduzem à formação de ésteres e álcoois superiores e compostos carboxilo, conhecidos por contribuir com o sabor a mosto encontrado na maioria das cervejas sem álcool (Ambrosi, 2016; Costa, 2016).

### **2.6.2. Processos físicos**

Os métodos físicos para a remoção do álcool da cerveja requerem grandes investimentos no equipamento utilizado, porém apresentam a vantagem de remover o álcool presente da cerveja, mesmo quando este, se encontra em concentrações muito baixas (Brányik *et al.*, 2012).

Neste caso o etanol produzido durante a fermentação é removido da cerveja através de uma etapa extra ao processo de produção. Dentro do processo de produção de cerveja sem álcool com recurso a métodos físicos, existem dois principais: os processos térmicos e a utilização de membranas (Ambrosi, 2016; Catarino & Mendes, 2011; Brányik *et al.*, 2012).

Os processos térmicos são os mais utilizados, uma vez que conseguem remover praticamente todo o etanol da cerveja, e apresentam a possibilidade de comercializar separadamente o álcool, a operação é contínua e automática e ocorre num curto período de tempo, sendo flexível em termos de volume bem como da composição da cerveja. No entanto, para além dos custos de funcionamento elevados, este pode provocar alterações nas propriedades e características do produto, pelos danos térmicos causados e pela perda de voláteis da cerveja. No final de todos os processos térmicos, a cerveja sem conteúdo alcoólico tem de ser diluída com água isenta de oxigénio e carbonatada (Brányik *et al.*, 2012).

De forma a evitar as alterações provocadas pelos métodos térmicos, podem ser utilizadas membranas, como substituto destes, tendo a vantagem de apresentar um menor consumo de energia, sendo operadas a baixas temperaturas, e funcionando de forma automática e flexível. Este processo pode apresentar algumas limitações nomeadamente, a nível de custos e funcionamento, e na seletividade das membranas aos compostos aromáticos.

As principais técnicas de remoção do etanol da cerveja são a evaporação, a diálise, a osmose inversa e a destilação osmótica (Ambrosi, 2016; Catarino & Mendes, 2011; Brányik *et al.*, 2012).

Na **tabela seguinte, 2.1**, encontram-se os vários processos físicos e biológicos, bem como o seu objetivo e as suas desvantagens.

Tabela 2.1. Processos de produção de cervejas sem álcool

		Processo	Ação	Objetivo	Desvantagens
Processos Biológicos		Brassagem a temperaturas elevadas	Enzimática ( $\beta$ -amilases e $\alpha$ -amilases)	Inibe a atividade das $\beta$ -amilases em açúcares fermentescíveis e favorece as $\alpha$ -amilases, convertendo parte do amido em açúcares que serão menos fermentescíveis pelas leveduras	Pode apresentar instabilidade microbiológica e sensorial
		Leveduras especiais	Leveduras com capacidade de fermentação limitada, produzindo menor quantidade de álcool	- <i>Saccharomyces ludgwiggi</i> (não consegue assimilar a maltose, que é o principal açúcar fermentável do mosto cervejeiro) - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (modificada geneticamente, para não produzir uma elevada quantidade de etanol) - <i>Saccharomices rouxi</i> , (consome parte do etanol produzido na fase estacionária, quando se encontra em condições aeróbicas)	Apresentam um sabor adocicado e elevados níveis de acetaldeído, acetoina e a diacetil
		Fermentação limitada/controlada	Utilização de baixas temperaturas, para retardar o crescimento ou matar as leveduras	Conseguir uma baixa concentração de álcool na cerveja pela remoção da levedura do processo ou pela criação de condições que limitem o metabolismo da levedura	Presença de compostos carboxilo, conhecidos por contribuir com o sabor a mosto, reduzindo o nível de ésteres e apresentando uma doçura elevada
Processos Físicos	Térmicos	Evaporação	Temperaturas elevadas	Remoção do etanol através da sua evaporação. Realizada a uma temperatura pouco mais elevada que a temperatura de ebulição do etanol	Remoção de muitos dos compostos aromáticos
		Destilação a vácuo	Dispositivo de contracorrente de gás-liquido	O meio de extração (por exemplo vapor de água) extrai o etanol da bebida.	Remoção de compostos aromáticos voláteis
	Membranas	Díálise	Separação por membranas a baixas temperaturas. Fluxo seletivo de duas soluções com diferentes composições	Através do gradiente de concentração e separadas por uma membrana permeável a certas moléculas. Difusão do etanol da cerveja para o fluido dialisante, sendo o etanol continuamente removido do dialisante por destilação.	Passagem para o fluido dialisante, de álcoois superiores e ésteres, devido à baixa massa molar
		Osiose inversa	Separação por membranas a baixas temperaturas, utilizando um força-motriz (pressão hidráulica)	A pressão hidráulica é maior que a pressão osmótica da solução. As moléculas menores passam através da membrana, como a água e parte do etanol	O produto deve ser diluído no final do processo, para ajustar o teor de álcool e dos outros componentes

Tabela 2.1. Processos de produção de cervejas sem álcool (continuação)

Processo		Ação	Objetivo	Desvantagens	
Processos Físicos	Membranas	Pervaporação	Separação por membranas	Utiliza a diferença de pressão de vapor parcial dos componentes entre os dois lados da membrana, como força motriz do processo. Para a remoção do etanol da solução utiliza-se uma membrana hidrofóbica.	Devido a afinidade da membrana com outros componentes de aroma, ocorre a remoção quase completa destes juntamente com o etanol
	Membranas	Destilação osmótica	Separação por membranas	Separa os componentes com diferentes volatilidades. A diferença de pressão de vapor existente entre os componentes presentes na cerveja e os da solução extratora é responsável pela separação do etanol. Só os compostos que apresentam alta pressão de vapor passam através da membrana	Diminuição dos compostos aromáticos no produto final que aumenta com o tempo de contacto

**Adaptado de:** Ambrosi, 2016; Costa, 2016; Catarino & Mendes, 2011.

## 2.7. Características Organoléticas da cerveja sem álcool

A avaliação sensorial é definida pelo Institute of Food Technologists como uma disciplina científica utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais e como elas são percebidas pelos sentidos do olfato, paladar, tato, audição e visão (IFT, 1981).

A cerveja apresenta um moderado aroma e sabor, sendo o seu equilíbrio entre os compostos voláteis e não voláteis responsável pela aceitação da mesma perante os consumidores (Almenar *et al.*, 2010).

A sua composição em ésteres, aldeídos, dicetonas vicinais (VDK's), ácidos orgânicos, álcoois superiores, fenóis e iso- $\alpha$ -ácidos está diretamente relacionada com a suas características organoléticas. A presença de compostos indesejáveis que afetam as suas características é um sério problema para a indústria cervejeira, uma vez que leva à perda da sua qualidade, ou seja, das suas propriedades sensoriais, nutricionais, químicas e funcionais (Almenar *et al.*, 2010), o que vai afetar a decisão do consumidor (Araújo *et al.*, 2003).

A cerveja sem álcool foi desenvolvida principalmente para atrair os consumidores que apreciam a sua saúde e bem-estar, sendo estrategicamente posicionada entre a cerveja e os refrigerantes.

No entanto, esta não parece ser uma bebida atraente para os consumidores em comparação com o vinho e a cerveja com álcool, correspondendo atualmente a uma quota de mercado de 2% em Portugal (Silva, 2017).

Apesar do esforço tecnológico para o desenvolvimento de processos alternativos para a remoção de álcool, durante este processo existem substâncias que inevitavelmente serão removidas, causando impacto nas características organoléticas da cerveja (Silva, 2017; Brányik *et al.*, 2012). Enquanto os processos térmicos aumentam a cor da cerveja, os processos onde se utilizam membranas diminuem a cor, o corpo e apresentam um baixo perfil aromático. Já aquelas que são obtidas pela utilização de métodos biológicos têm frequentemente um sabor a mosto. O facto desta bebida apresentar níveis elevados de mono e dissacáridos, faz com que os *off-flavors* presentes na cerveja se intensifiquem (Brányik *et al.*, 2012).

Estas imperfeições a nível do sabor conduziram à necessidade de se ajustar o seu processo de produção ou de se utilizar aditivos no produto final, de forma a melhorar as suas características. A utilização dos processos térmicos e de membrana utilizam frequentemente diferentes técnicas de pós tratamento e mistura para melhorar a qualidade sensorial e estabilidade coloidal das cervejas sem álcool, tais como a adição de levedura fresca seguida da maturação da cerveja, ou por mistura desta com cerveja original (Brányik *et al.*, 2012). Como referido, outra alternativa para melhorar as características organoléticas são os aditivos, sendo os mais utilizados:

- **A sacarina:** edulcorante com sabor amargo ou metálico, para aumentar o corpo das cervejas sem álcool.
- **O ácido ascórbico:** antioxidante, aumento do sabor e da estabilidade coloidal
- **O ácido láctico:** conservante com efeitos antimicrobianos, também utilizado para melhorar o sabor da cerveja, através de uma maior acidez.

Para além destes aditivos que são frequentemente utilizados, é também possível a utilização de ácido cítrico (regulador de acidez), metabissulfito de potássio (antioxidante) e caramelo (coloração).

A adição de dextrinas em cervejas tem sido indicada para melhorar o perfil de sabor das cervejas sem álcool, através da ação na retenção e/ou percepção de compostos ativos de sabor (Brányik *et al.*, 2012).

No entanto o uso aditivos não é capaz de substituir o uso de matérias primas de alta qualidade e um processo de produção otimizado (Brányik *et al.*, 2012).

Se por um lado, a cerveja sem álcool tem a vantagem de ter menos calorias, associado ao facto de não ter álcool na sua composição, tem a desvantagem de ser menos satisfatória a nível organolético para alguns dos seus consumidores (Silva, 2017).

## 2.8. Cerveja e a saúde

Na cerveja podemos encontrar várias vitaminas e minerais, como potássio, magnésio, cálcio e sódio, essenciais ao organismo. De entre as vitaminas, destacam-se as do complexo B, nomeadamente o ácido fólico. Este de particular importância, não sendo encontrado em mais nenhuma bebida destilada ou fermentada (APCV, 2012a; Scheffer *et al.*, 2013).

Pode-se considerar a cerveja, a bebida alcoólica com uma menor concentração de calorias, em média cerca de seis vezes menos do que as bebidas destiladas, por cada 100 mL (APCV, 2012b).

Por sua vez a cerveja sem álcool é uma bebida relativamente nova no mercado e considerada uma bebida saudável em relação a refrigerantes e bebidas alcoólicas, pois para além de apresentar uma baixa composição calórica, por não apresentar teor alcoólico, como podemos ver na **tabela 2.2**, contem várias vitaminas do complexo B, aminoácidos, minerais e hidratos de carbono (Silva, 2017).

Tabela 2.2. Tabela nutricional Cerveja e Cerveja sem Álcool

Composição	Cerveja Branca (100 mL)	Cerveja sem álcool (100 mL)
Valor Energético	39 kcal	22 kcal
Lípidos	<0,10 g	<0,10 g
Dos quais saturados	<0,10 g	<0,10 g
Hidratos de Carbono	3,1 g	4,9 g
Dos quais açúcares	0,2 g	2,6 g
Proteína	0,2 g	0,3 g
Fibra Alimentar	<0,3 g	<0,3 g
Álcool	5,0%	0,3%
Sal	0,01 g	0,00g

Adaptado de: SCC, 2017d; SCC, 2017e

A cerveja, sendo considerada por muitos como um vício e não como um constituinte de uma alimentação e estilo de vida saudável, quando consumida em moderação, por pessoas que não têm

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

restrições quanto ao consumo de álcool, pode trazer benefícios e proteger contra algumas doenças (O'Sullivan, 2012). Embora o seu consumo excessivo possa trazer problemas a nível do sistema nervoso, digestivo, problemas cardíacos e cancro. O seu consumo moderado pode trazer benefícios para a saúde que incluem: os ossos mais fortes, protege contra as doenças cardíacas, incluindo pressão arterial e colesterol, diabetes, úlceras, diversos tipos de cancro, melhor função cognitiva na velhice e reduz a degeneração muscular induzida pela idade (O'Sullivan, 2012; Bamforth, 2002; Silva, 2017).

Devido às preocupações com álcool e condução, por preocupações com a saúde e por motivos religiosos, a cerveja sem álcool tornou-se mais presente no mercado (Silva, 2017).

## Capítulo 3:

# Enzimas



### 3. Enzimas

#### 3.1. Definição

As enzimas são proteínas especializadas, que apresentam propriedades catalíticas e em pequenas quantidades aceleram reações químicas. Estas são produzidas por organismos vivos de forma a potenciar um conjunto diverso de reações necessárias para a vida, ou seja, são catalisadores biológicos altamente específicos (Novozymes, 2017a; Novozymes, 2017b). As enzimas estão envolvidas em todos os processos essenciais para a vida, como a replicação e transcrição de ADN, síntese proteica, metabolismo, regulação celular e transdução de sinal muitas vezes através de quinases e fosfatases. Algumas enzimas consistem apenas em proteínas, mas a maioria delas contém componentes não proteicos adicionais, como metais, fosfatos, hidratos de carbono, lípidos ou outros componentes orgânicos (Chaudhary *et al.*, 2015; FIB, 2011).

#### 3.2. Mecanismo

Quimicamente as enzimas apresentam um centro ativo, parte proteica, designada por apoenzima, e, algumas vezes um grupo não proteico, cofatores, que catalisam a reação enzimática. A este conjunto dá-se o nome de haloenzima (FIB, 2011; Motta, 2007) e encontra-se representado na **figura 3.1**.

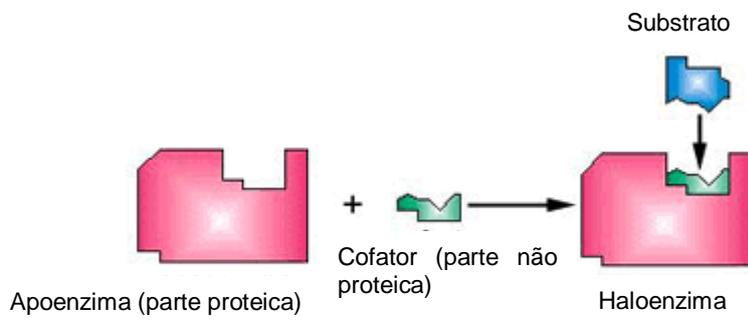


Figura 3.1. Descrição da enzima. Adaptado de: Sobiologia, 2017

Os cofatores podem ser classificados em dois grupos diferentes (FIB, 2011):

- Os específicos que são compostos orgânicos de baixo peso molecular e estrutura complexa e que participam na reação transportando determinados grupos químicos.
- E os ativadores que são iões inorgânicos que levam à formação do complexo ativo sem participarem na reação.

As haloenzimas apresentam a capacidade de reagir com determinados constituintes das células, substratos, formando complexos ou compostos com ligações covalentes.

Uma das características mais importantes das enzimas é a sua alta especificidade enzimática. Na enzima apenas uma fração da molécula é denominada como centro ativo, sendo responsável pela ligação da enzima ao substrato ou substratos. Essa especificidade está relacionada com o facto de tanto as enzimas como os substratos serem complementares geometricamente. De forma a explicar essa especificidade foram propostos dois modelos (FIB, 2011; Ferreira *et al.*, 2009; Motta, 2007)

O primeiro, proposto por Fisher em 1890, (Motta, 2007), e que pode ser comparado com um conjunto chave-fechadura, **figura 3.2**. A chave é representada pelo substrato, e, que se deve ajustar à fechadura, a enzima (FIB, 2011; Ferreira *et al.*, 2009). As substâncias que não encaixam no centro ativo para formar um complexo enzima-substrato, não reagem, mesmo que apresentem grupos funcionais idênticos ao do substrato verdadeiro (Motta, 2007).

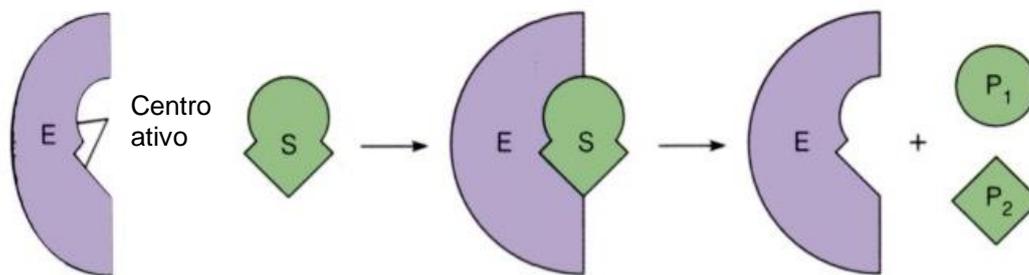


Figura 3.2. Modelo Chave-fechadura. Adaptado de: Gallo, 2017

O segundo modelo, Modelo do encaixe induzido, **figura 3.3**, foi proposto por Koshland em 1958, este apresenta-se como um modelo mais flexível de interação enzima-substrato. Neste caso, os centros ativos das enzimas não estão completamente pré-formados e a interação inicial do substrato com a enzima induz a uma alteração da conformação da enzima. Isto irá promover um novo posicionamento dos aminoácidos para que se forme um centro ativo e a estrutura correta para interagir com os grupos funcionais do substrato (Motta, 2007).

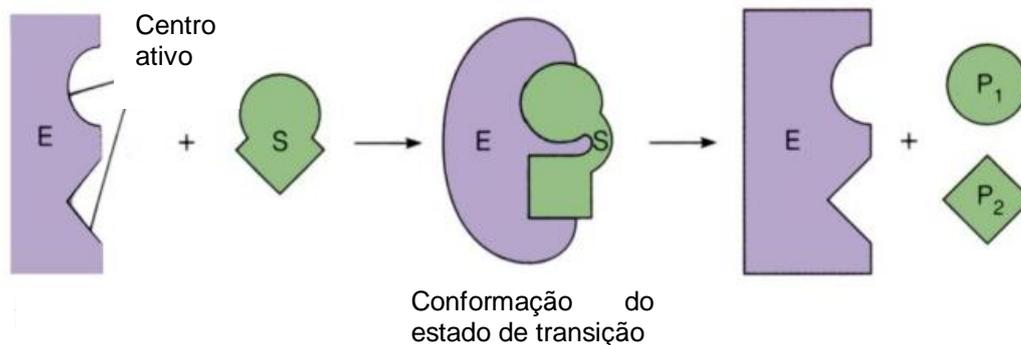


Figura 3.3. Modelo Encaixe Induzido. Adaptado de: Gallo, 2017

Por outro lado, existem alguns compostos denominados inibidores que têm a capacidade de se combinar com determinadas enzimas, levando à inibição da reação enzimática, sendo que esta

inibição pode ser reversível ou irreversível, o seu funcionamento encontra-se representado na **figura 3.4**.

- Reação reversível, quando entre a enzima e a substância inibidora existir um equilíbrio caracterizado por uma constante de equilíbrio que mede a afinidade da enzima com o inibidor.
- Reação irreversível é quando o inibidor e a enzima formam um composto estabilizado pela formação de ligações covalentes, sendo que neste caso a enzima não pode ser separada desta substância inibidora pelos métodos de separação, como diálise ou diluição (FIB, 2011; Ferreira *et al.*, 2009).

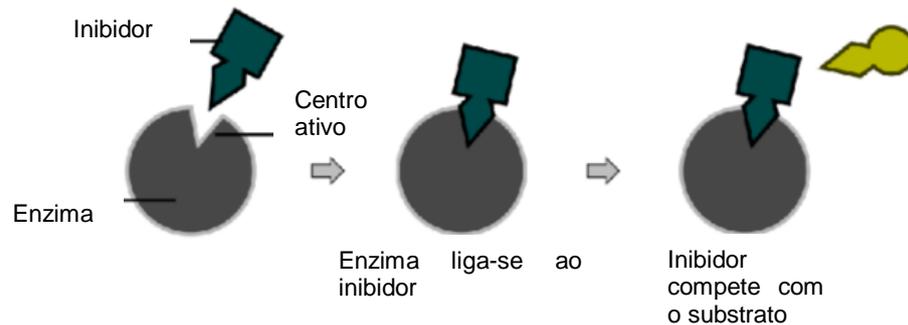


Figura 3.4. Inibidores enzimáticos. Adaptado de: Novozymes, 2017b

A desnaturação das enzimas pode ocorrer por diferentes formas, como a mudança do pH ou por calor, perdendo desta forma a sua atividade. Grande parte das enzimas são destruídas por aquecimento entre 70 °C a 80 °C, durante um determinado intervalo de tempo (FIB, 2011).

### 3.3. Fatores que influenciam a atividade enzimática

São vários os fatores que podem influenciar a velocidade das reações enzimáticas, como a temperatura, o pH, a atividade da água e a pressão, para além da concentração do substrato e de enzima (Novozyms, 2017a; FIB, 2011; Motta, 2007).

#### 3.3.1. Concentração de enzima e substrato

Se por um lado a velocidade máxima da reação ocorre em função da quantidade de enzima que se encontra disponível, aumentado proporcionalmente com a adição de mais enzima. Por outro, o consumo do substrato pela enzima leva a que a velocidade da reação seja diretamente proporcional à sua concentração. Quando a velocidade da reação se torna constante, significa que a adição de mais substrato não aumenta a velocidade, passando esta a depender de outros fatores. Se a quantidade de substrato for suficientemente grande para saturar todas as zonas catalíticas da enzima, o substrato passa a existir apenas na forma enzima-substrato (Motta, 2007).

### 3.3.2. Temperatura

A velocidade da reação é diretamente proporcional ao aumento da temperatura, ou seja, inicialmente com o aumento da temperatura, a atividade molecular aumenta, até atingir uma temperatura ótima e aumentando a formação do complexo enzimático. No entanto, com o aumento contínuo da temperatura, irá levar a uma inativação da enzima, causada pela desnaturação da proteína pelo calor (FIB, 2011; Motta, 2007).

### 3.3.3. pH

O valor de pH no qual a atividade da enzima é máxima é designado por pH ótimo, variando de enzima para enzima, a sua mudança drástica pode levar à desnaturação de muitas enzimas.

A influencia do pH na catálise enzimática está relacionada com o estado de ionização de aminoácidos no centro ativo da enzima e que são essenciais a essa catálise. A atividade enzimática pode ser reduzida pela perda de um próton, se o meio for suficientemente alcalino, para além disto, os substratos podem também ser afetados. Se um substrato apresentar um grupo ionizável, as alterações no pH vão afetar as ligações do substrato ao centro ativo da enzima. As alterações nos grupos ionizáveis podem modificar a estrutura terciária das enzimas (Motta, 2007).

### 3.3.4. Atividade da água

A atividade da água é outro fator que vai influenciar a velocidade das reações enzimáticas, pois na ausência de água, as enzimas tornam-se mais estáveis ao calor e mais sensíveis à medida que o teor de humidade aumenta (FIB, 2011).

### 3.3.5. Pressão

A pressão também pode influenciar a velocidade das reações enzimáticas, no entanto, é pouco utilizada para controlar essas reações. A pressão é capaz de desnaturar ou modificar proteínas, ativar ou não enzimas e alterar as interações substrato-enzima, pequenas alterações no centro ativo podem levar à perda de atividade de algumas enzimas. Como a desnaturação proteica está relacionada com mudanças na sua conformação, a pressão pode afetar a funcionalidade bioquímica da enzima, por exemplo através do aumento ou perda da atividade biológica e das mudanças específicas do substrato (FIB, 2011; Menezes *et al.*, 2008).

## 3.4. Tipos de enzimas

Em 1956 a Comissão Internacional de Enzimas estabeleceu critérios para a sua nomenclatura e classificação, de forma a evitar que a mesma enzima estudada por investigadores diferentes, tivesse uma nomenclatura aleatória (Ferreira *et al.*, 2009).

Desta forma as enzimas foram divididas em seis classes e agrupadas de acordo com o tipo de reações que catalisam, como: as oxidoredutases, as transferases, as hidrólases, as isomerases e as ligases (Ferreira *et al.*, 2009; FIB, 2011). Esses grupos e as suas funções encontram-se descritas na **tabela 3.1**.

Tabela 3.1. Tipos de enzimas e as suas funções

Enzimas	Função
<b>Oxidorrredutases</b>	Catalisam reações de oxido-redução.
<b>Transferases</b>	Catalisam a transferência de grupos funcionais, como os grupos amina, carboxilo, fosfato, de um composto para outro.
<b>Hidrólases</b>	Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente
<b>Liases</b>	Catalisam a adição de grupos para formar duplas ligações ou a remoção de grupos deixando a dupla ligação
<b>Isomerases</b>	Catalisam a transferência de grupos de uma posição para outra, na mesma molécula.
<b>Ligases</b>	Enzimas que causam a degradação da molécula de ATP, usando a energia libertada nesta reação para a síntese de novos compostos, unindo duas moléculas.

Adaptado de: FIB, 2011; Ferreira *et al.*, 2009; Novozymes, 2017a.

### 3.5. Enzimas na indústria alimentar

O Regulamento (CE) 1332/2008 define enzimas alimentares como um produto obtido de vegetais, animais, microrganismos ou respetivos produtos, incluindo produtos obtidos por um processo de fermentação que utiliza microrganismos, que contenha uma ou várias enzimas capazes de catalisar uma reação bioquímica específica e que seja adicionada a um género alimentício com o intuito de desempenhar uma função tecnológica em qualquer fase do fabrico, transformação, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenamento de géneros alimentícios (Regulamento 1332/2008).

As primeiras aplicações enzimáticas remontam a 6.000 aC, com a produção de cerveja, panificação e fabricação de queijo e vinho (Chaudhary *et al.*, 2015). No entanto apenas no século XIX, as várias conversões biológicas foram atribuídas à ação enzimática (Vicente, 2016).

A principal fonte de enzimas comerciais, atualmente, são os microrganismos. Embora estes não apresentem as mesmas enzimas que as plantas ou os animais, consegue-se encontrar microrganismos capazes de produzir uma enzima semelhante, que irá catalisar a reação desejada. Os fabricantes de enzimas têm melhorado os microrganismos, quer por seleção natural quer por técnicas de reprodução clássicas, de forma a catalisar as reações desejadas, quer por modificação genética (Chaudhary *et al.*, 2015).

A capacidade que as enzimas apresentam de realizar transformações químicas muito específicas, atuando como catalisadores e transformando matérias primas em produtos alimentares melhorados, faz com que estas sejam muito úteis em processos industriais, nomeadamente alimentares (Chaudhary *et al.*, 2015; FIB, 2011).

As enzimas ajudam a melhorar a qualidade do produto, o tempo de prateleira, a frescura, a aparência, funcionalidade, o valor nutricional e o aroma de muitos produtos alimentares (Ermis, 2017). Podendo ainda ser utilizadas na cozedura, na produção de bebidas alcoólicas, vinicultura, sumos de

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

fruta, laticínios e derivados, panificação, gorduras e óleos e na produção de cerveja (Chaudhary *et al.*, 2015; FIB, 2011).

A utilização de enzimas na fabricação de cerveja, teve início no século XX, quando em 1911, Leo Wallerstein, patenteou a utilização da papaína, uma protease ácida, encontrada nas papaias e, que quebra as proteínas da cerveja, conseguindo desta forma melhorar a estabilidade coloidal, sendo atualmente utilizada (Vicente, 2016.).

São várias as enzimas que atuam durante o processo de produção de cerveja, tais como (Vicente, 2016):

- As  $\alpha$ -amílases e as  $\beta$ -amílases que catalisam a reação de hidrólise do amido em dextrinas e açúcares fermentescíveis.
- As  $\beta$ -glucanases e Xilanases, catalisam a hidrólise de polissacarídeos presentes na parede celular em oligossacarídeos, degradando a parede celular do malte.
- As enzimas proteolíticas, como as endopeptídases, papaína, *proline specific endoprotease* (PSEP); transglutaminase, hidrolisam ligações peptídicas entre aminoácidos, tendo como objetivo assegurar a fermentação. A degradação proteolítica durante a maltagem e a trituração, permite não só a libertação dos aminoácidos e dos di-peptídios, como nutrientes para as leveduras, como também permite o acesso ao amido.
- A acetolactato descarboxilase, é utilizada como uma enzima de maturação, esta enzima catalisa a descarboxilação do  $\alpha$ -acetolactato a acetoina, reduzindo assim a formação de diacetilo no final da fermentação.

Atualmente a utilização de enzimas é um procedimento habitual em muitas cervejeiras, isto porque, promove: uma maior extração de matérias primas; processos mais rápidos e simples; maior flexibilidade na escolha de matérias primas; maior flexibilidade na escolha de processos; melhor qualidade do produto final e mais oportunidades para criar novos produtos (Novozymes, 2017a).

### 3.6. Glucose oxidase

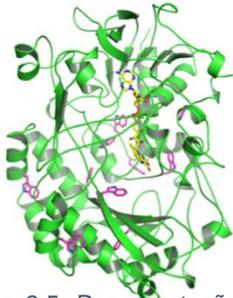


Figura 3.5. Representação da glucose oxidase. Adaptado de: Tribst *et al.*, 2014

Glucose oxidase, **figura 3.5**, é uma enzima pertencente ao grupo das oxidorreduções e que oxidam a glucose (Chaudhary *et al.*, 2015; FIB, 2011).

É uma enzima de origem fúngica, utilizada em aplicações industriais desde o início dos anos 50, nomeadamente do género *Aspergillus* e *Penicillium*. O *Aspergillus niger* é a mais utilizada na produção de glucose oxidase, no entanto é o *Penicillium amagasakiens* que apresenta uma cinética mais vantajosa na oxidação da glucose em relação ao *Aspergillus niger*.

A glucose oxidase é uma glicoproteína que catalisa a oxidação da glucose ( $\beta$ -D-glucose) em ácido glucónico, utilizando oxigénio molecular e com simultânea produção de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Bankar *et al.*, 2009; Schmidtke *et al.*, 2011; Sisak *et al.*, 2006).

Esta reação é composta por duas reações simultâneas, uma de redução e outra de oxidação, e, que se encontram representadas na **figura 3.6**. No passo da redução, a glucose oxidase catalisa a oxidação da  $\beta$ -D-glucose em D-glucono- $\delta$ -lactona. Posteriormente o anel dinucleótido de flavina adenina (FAD), cofator da glucose oxidase é reduzido a  $FADH_2$ . Na reação de oxidação, a glucose oxidase é reduzida e reoxidada pelo oxigénio molecular para produzir peróxido de hidrogénio, deste, e pela ação da catalase, produz-se água e oxigénio (Bankar *et al.*, 2009; Schmidtke *et al.*, 2011; Sisak *et al.*, 2006).

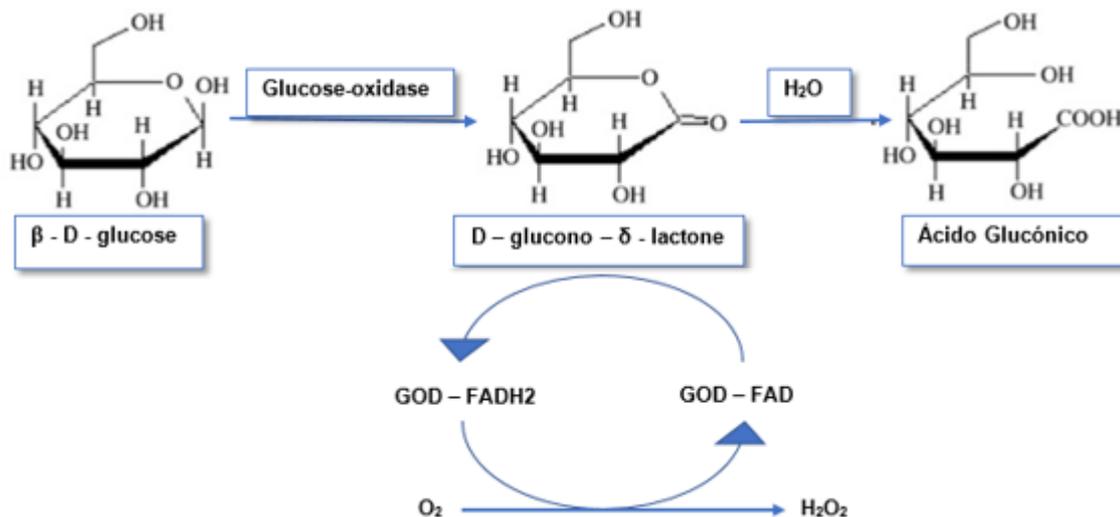


Figura 3.6. Reação da Glucose oxidase. Adaptado de: Bankar *et al.*, 2009

Vários são os parâmetros que podem afetar a produção da enzima pelo microrganismo, tais como a fonte de carbono e nitrogénio, a utilização de carbonato de cálcio como um indutor, o efeito do arejamento, do pH e da temperatura do meio (Bankar *et al.*, 2009).

Por sua vez, a reação de oxidação da glucose a ácido glucónico, depende da concentração da enzima, do pH, da concentração de oxigénio dissolvido, bem como da temperatura do processo (Schmidtke *et al.*, 2011).

### **3.6.1. Oxigénio molecular**

O oxigénio molecular é um requisito essencial para a atividade da glucose oxidase, devendo ser aplicado no mosto durante o tratamento enzimático. A agitação ajudará a que haja dispersão das bolhas de oxigénio, o que aumentará a atividade da glucose oxidase (Schmidtke *et al.*, 2011).

### **3.6.2. Temperatura**

Em relação à temperatura ótima, (Schmidtke *et al.*, 2011) verificaram que a oxidação da glucose ocorre mais rapidamente a uma temperatura de 20 °C do que a 30 °C. Outros estudos como (Tribst & Cristianini, 2012) referem que a atividade ótima da glucose oxidase ocorre a 50 °C.

A utilização de temperaturas mais baixas, tem vantagens a nível de processamento, uma vez que, se consegue níveis mais elevados de oxigénio dissolvido no mosto e um menor crescimento de microrganismos (Schmidtke *et al.*, 2011).

### **3.6.3. pH**

O intervalo de pH mais eficiente para oxidar a glucose a ácido glucónico, segundo Schmidtke *et al.*, 2011, encontra-se entre 5.5- 6.0 e valores de pH inferiores reduzem esta conversão em 75%, devido à inibição da atividade enzimática pelo meio ácido. O estudo de Tribst & Cristianini, publicado em 2012, mostrou que a glucose oxidase era estável a um pH entre 3,5 -7,0. Para Bankar *et al.*, (2009) o pH ótimo da enzima proveniente de *A.niger* encontrava-se entre 3,5 e 6,5, já a proveniente de *P. amagasakiense*, apresentava um pH ótimo entre 4,0 e 5,5.

Segundo Schmidtke *et al.*, 2011, a glucose oxidase é uma enzima bastante instável sendo desnaturada a temperaturas superiores a 60 °C ou em soluções com um pH inferior a 4,0.

### **3.6.4. Glucose oxidase na indústria alimentar**

Atualmente a glucose oxidase tem inúmeras aplicações na indústria alimentar, (Bankar *et al.*, 2009), a sua grande utilidade em diversas áreas desencadeou várias pesquisas para procurar novas fontes de glucose oxidase por outras espécies de fungos e insetos, de forma a satisfazer a procura por propriedades melhoradas, como uma maior atividade catalítica (Wong *et al.*, 2008).

A glucose oxidase utilizada na indústria alimentar, normalmente, apresenta também na sua mistura catalase, uma vez que as duas enzimas são encontradas juntas na parede celular do micélio. A sua separação é dispendiosa e não é essencial para ser utilizada em géneros alimentícios, para além de que ajuda na degradação do peróxido de hidrogénio, produzido pela glucose oxidase (Wong *et al.*, 2008).

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Sendo considerado como segura (GRAS), segundo a classificação da FDA (FDA, 2015) é frequentemente utilizada em diversas indústrias alimentares e classificada como tendo propriedades antioxidantes, conservantes e estabilizadoras. Para além disto o ácido glucónico, produzido pela oxidação da glucose, é seguro para consumo humano, não tendo sido especificado nenhum limite de ingestão diária aceitável pela OMS (Wong *et al.*, 2008).

Na panificação a glucose oxidase é um oxidante eficaz para a produção de pão com uma textura melhorada e maior volume. Na produção de ovo liofilizado, a glucose oxidase é utilizada na remoção da glucose do ovo, antes da secagem, evitando desta forma reações de Maillard, como resultado das reações entre os aminoácidos e os açúcares redutores, o que irá provocar formação de compostos com sabor indesejável. Para além disto, a remoção da glucose permite aumentar a tolerância microbiana e a vida útil do alimento. Já no caso da maionese por ser um alimento rico em gordura, a presença de oxigénio leva a uma oxidação lipídica, causando deterioração e sabor a ranço. Em alimentos enlatados, embalados ou engarrafados, o oxigénio promove o crescimento bacteriano, sendo por isso importante removê-lo. O facto de a glucose oxidase consumir o oxigénio para poder produzir o ácido glucónico, torna-a um antioxidante e conservante utilizado em muitas aplicações alimentares (Bankar *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2008).

A glucose oxidase, é apontada como tendo um efeito oposto contra certos patogénicos que podem ser transmitidos pelos alimentos, como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogens*, apresentando por isso um efeito de conservante (Bankar *et al.*, 2009).

Na produção de vinho, a glucose presente no mosto é importante para a produção de álcool pelas leveduras, durante a fermentação. A adição desta enzima no mosto antes da fermentação, faz com que a quantidade de glucose seja reduzida, pela conversão em ácido glucónico, o que resulta num menor teor alcoólico. Para além disto, o peróxido de hidrogénio produzido vai atuar como bactericida, tendo um efeito conservante no vinho (Wong *et al.*, 2008).



## **Capítulo 4:**

# **Metodologia**

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

## 4. Metodologia

### 4.1. Objetivos

Como foi referido anteriormente a remoção do álcool da cerveja tem impacto nas suas características organoléticas, pela remoção de compostos aromáticos juntamente com álcool, promovendo a doçura e o sabor a mosto. Isto leva a que muitas indústrias cervejeiras recorram à adição de ácidos ou aromatizantes para melhorar as características das suas cervejas sem álcool. No entanto, o uso aditivos não é totalmente eficaz, pois não é capaz de substituir a utilização de matérias primas de alta qualidade e um processo de produção otimizado.

De forma a Sociedade Central de Cervejas e Bebidas melhorar as características da sua cerveja sem álcool, estudou-se a utilização de uma enzima na sua produção. Essa enzima, glucose oxidase, é atualmente utilizada em diversas áreas da indústria alimentar, nomeadamente na produção de vinhos sem álcool.

A oxidação da glucose a ácido glucónico, pela adição da enzima, promove a:

- Redução do teor alcoólico: uma vez que as leveduras que mais tarde terão contacto com a cerveja, vão ter uma menor quantidade de açúcar para fermentar;
- Melhoria das características organoléticas: esta conversão leva a uma diminuição da doçura e do sabor a mosto, característico destas cervejas, aumentando por sua vez a acidez sem necessidade de recorrer à adição de ácidos.

### 4.2. Monitorização da reação enzimática

A adição desta enzima no mosto da cerveja, promove a redução da glucose a ácido glucónico, pela reação representada na **figura 4.1**.

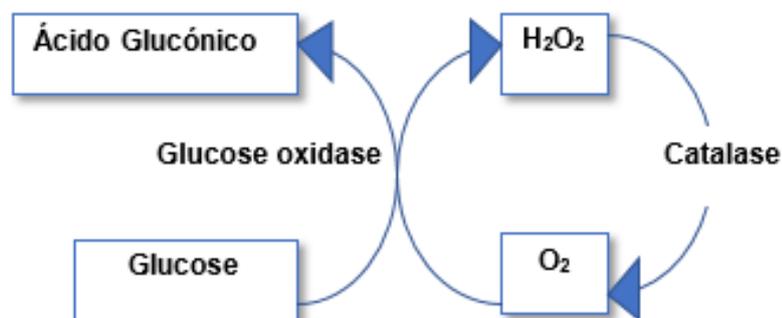


Figura 4.1. Oxidação da glucose pela glucose oxidase. **Adaptado de: Vicente, 2016**

De forma a que seja possível verificar a ação da enzima no mosto, e, a eficaz conversão da glucose a ácido glucónico ao longo do tempo de ensaio, foi necessário:

- Monitorizar o pH: uma vez que a formação de ácido glucónico leva a uma diminuição do pH;

- Monitorizar o oxigénio dissolvido no mosto: uma vez que a enzima necessita de oxigénio para oxidar a glucose, deve-se verificar uma diminuição dos níveis de oxigénio no mosto no decorrer do ensaio.

### 4.3. Metodologia geral dos ensaios

Inicialmente foi feito um esquema geral dos ensaios, como podemos ver pela **figura 4.2**, sendo mais tarde este esquema adaptado especificamente a cada ensaio.

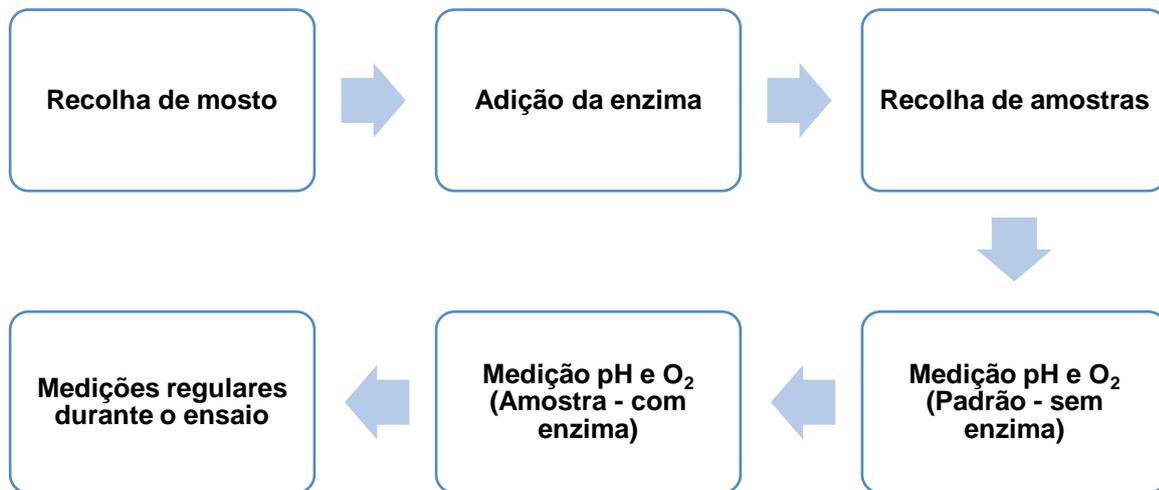


Figura 4.2. Esquematização geral dos ensaios

O mosto foi recolhido em zonas de produção e transferido para o laboratório. Já em condições laboratoriais o mosto foi transferido para recipientes apropriados consoante o ensaio a realizar (os mesmos encontram-se descritos no capítulo seguinte). Foram recolhidas amostras regulares ( $\approx 10$  mL) ao longo do tempo de ensaio, para medição do pH e do oxigénio do mosto. Todos os ensaios foram realizados em duplicado e comparados com uma amostra padrão.

### 4.4. Metodologia dos equipamentos utilizados em laboratório

Para a realização dos vários ensaios, para além do material corrente de laboratório, foram utilizados vários equipamentos de forma a garantir que algumas das condições utilizadas em produção fossem conseguidas à escala laboratorial.

#### Potenciômetro (Crizon OLPZ1 – pH meter)

Utilizado para monitorizar o pH do mosto e representado na **figura 4.3**. Dependendo do ensaio realizado, recolheu-se  $\approx 10$  mL de mosto para um copo de precipitação e colocou-se o sensor, ou colocou-se a extremidade do sensor dentro da amostra.



Figura 4.3. Potenciômetro de pH

#### Medidor de Oxigénio (Orbisphere 6101 TPO Analyzer)

Utilizado para a medição do oxigénio dissolvido no mosto e do headspace (espaço vazio) na garrafa, **figura 4.4**.



Figura 4.4. Orbisphere 6101 TPO Analyzer

#### Medidor de Oxigénio (Mettler Toledo)

Utilizou-se um medidor de oxigénio, de forma a medir o oxigénio dissolvido no mosto, representado na **figura 4.5**. Dependendo do ensaio realizado, recolheu-se  $\approx 10$  mL de mosto para um copo de precipitação e colocou-se o sensor, ou colocou-se a extremidade do sensor dentro da amostra.



Figura 4.5. Medidor de oxigénio

#### Banho-Maria (Lauda RE120)

O banho-maria, **figura 4.6**, foi utilizado em alguns ensaios para manter as amostras a uma temperatura constante durante o decorrer do ensaio.



Figura 4.6. Banho-Maria

#### **Banho Termostático (Mettler – WB14)**

O banho termostático, **figura 4.7**, foi utilizado para pasteurizar as amostras. As garrafas que continham as amostras foram colocadas num banho de água. A temperatura utilizada foi definida para cada ensaio.



Figura 4.7. Banho termostático

#### **Banho de óleo (Mettler – ONE14)**

Em alguns ensaios foi utilizado um banho de óleo a 90 °C e 95 °C, **figura 4.8**, dependendo do ensaio realizado. Os frascos Schott foram colocados no banho de óleo com o objetivo de pasteurizar as amostras a temperaturas mais elevadas.



Figura 4.8. Banho de óleo

#### **Brassin - Banho com Sistema de Agitação (Cannogate CT4)**

Utilizado para analisar a reação da enzima ao ser adicionado na etapa da brassagem. Pesou-se 50 g de malte em copos de inox. Colocou-se os copos neste banho, **figura 4.9**, e adicionou-se aproximadamente 100 mL de água. As amostras permaneceram aí 1 hora a 70 °C, sendo depois retiradas.



Figura 4.9. Banho com Sistema de Agitação

#### **Espectrofotómetro (Shimadzu – UV- 1603)**

Utilizou-se o espectrofotómetro, **figura 4.10**, para determinar a percentagem de redução da glucose no mosto por ação da glucose oxidase.



Figura 4.10. Espectrofotómetro

## Capítulo 5:

# Parte Experimental



## 5. Trabalho Experimental

Durante o período de estágio foram realizados ensaios em laboratório, de forma a avaliar a resposta da enzima às várias condições aplicadas e analisando a viabilidade da sua aplicação num posterior processo industrial. Os ensaios incluíram:

- A caracterização do mosto
- Ensaio com glucose oxidase. Onde se testou:
  - Condições ótimas da enzima
  - Temperatura utilizada em processo de produção, sem agitação, em tubos EBC.
  - Temperaturas, arejamento e quantidade de enzima, utilizando frascos Schott.
- Inativação da enzima, por:
  - Pasteurização
  - Adição da enzima numa fase em que simulou a brassagem com posterior fervura do mosto.
- Determinação da concentração da glucose no mosto com e sem adição da enzima
- Ensaio organolético

Os vários ensaios realizados bem como os seus resultados, encontram-se descritos seguidamente.

### 5.1. Caracterização do mosto

Antes de se proceder à realização do ensaio com adição de enzima, analisou-se o pH e o nível de oxigénio presentes no mosto.

#### 5.2.1. Metodologia

O mosto foi recolhido para tanquetas (idênticas às da **figura 5.1**) após a sua fervura, na brassagem. Em laboratório transferiu-se o mosto das tanquetas para copos de precipitação de 2 L. Com uma pipeta de 200 mL encheu-se 10 garrafas de 20 cL e transferiu-se ≈10 mL para copos de precipitação e mediu-se o pH. As 10 garrafas foram encapsuladas e mediu-se o oxigénio dissolvido no mosto e no *headspace* de duas garrafas no *Orbisphere 6101 TPO Analyzer*, ficando as restantes guardadas na câmara de refrigeração, de forma a conservar o mosto. No dia seguinte, as garrafas foram pasteurizadas, na linha de Pasteurização. Após 24 e 48 horas mediu-se novamente o pH, o oxigénio dissolvido no mosto e no *headspace*.

Na **figura 5.1** encontra-se representado o esquema deste ensaio.



Figura 5.1. Ensaio para caracterização do mosto

### 5.2.2. Resultados e discussão

Pela análise dos resultados apresentados na **tabela 5.1**, podemos ver que o valor de pH aumentou do dia 1 de ensaio para o dia 2, nas duas amostras analisadas.

Do dia 2 para o dia 3 de ensaio, verifica-se que os valores de pH das duas amostras analisadas se mantêm praticamente constantes. Comparando a amostra 1 analisada no dia 2 com a mesma amostra analisada no dia 3, verifica-se que existe uma variação de 0,03 e na amostra 2 não existiu qualquer variação no valor.

Em relação aos resultados obtidos na análise do oxigénio dissolvido no mosto, podemos verificar que nas duas amostras o valor diminuiu do dia 1 para o dia 2 de ensaio e aumentou na medição realizada após a pasteurização, o mesmo aconteceu com o oxigénio presente no *headspace* da garrafa.

Tabela 5.1. Caracterização do Mosto - Resultados pH e oxigénio do mosto

	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
			antes Pasteurização		24 horas após Pasteurização	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
<b>pH</b>	5,34	5,34	5,51	5,43	5,48	5,43
<b>Oxigénio dissolvido no mosto</b>	1,16	1,52	0,195	0,579	0,646	0,980
<b>Oxigénio headspace</b>	0,105	0,137	0,018	0,052	0,058	0,088

Pela análise da tabela acima, podemos perceber que o valor de pH se mantém praticamente estável em todas as medições, existindo apenas um ligeiro aumento do dia 1 para o dia 2, que pode estar relacionado com a temperatura em que ocorreu a medição, dia 1 a 20 °C e dia 2 a 10 °C. No dia 2 e no dia 3, as medições foram realizadas à mesma temperatura (10 °C), sendo os resultados constantes na amostra 2. Na amostra 1 a variação de 0,03 na medição encontra-se dentro do desvio associado ao potenciómetro de pH (0,04). Estes resultados encontram-se de acordo com Dotro *et al.* (1994) que diz que o pH varia conforme a temperatura.

São os resultados do oxigénio, tanto o dissolvido no mosto como o presente no *headspace*, que apresentam maiores variações. Esta variação pode ser explicada, pelo facto de a temperatura ser mais elevada no dia 1 (20 °C) e mais baixa no dia 2 (10 °C). Temperaturas mais elevadas levam a um

aumento da presença de oxigénio (Schmidtke *et al.*, 2011), o que se pode comprovar pelos resultados obtidos. Já do dia 2 para o dia 3 o aumento dos níveis de oxigénio, nas duas amostras, pode estar relacionado com o facto da amostra ter sido pasteurizada. Segundo García-Torres *et al.* (2009), o oxigénio presente nos alimentos leva a reações de oxidação, sendo agravadas pelo aumento da temperatura durante a pasteurização. Para Pickering *et al.* (1998) uma mudança de temperatura significa uma mudança na concentração de oxigénio, o que se consegue verificar nos resultados deste ensaio.

### 5.3. Ensaio com glucose oxidase

A realização dos ensaios utilizando glucose oxidase foi feita em laboratório, simulando a adição desta, na etapa de arrefecimento, como podemos ver pela **figura 5.2**.

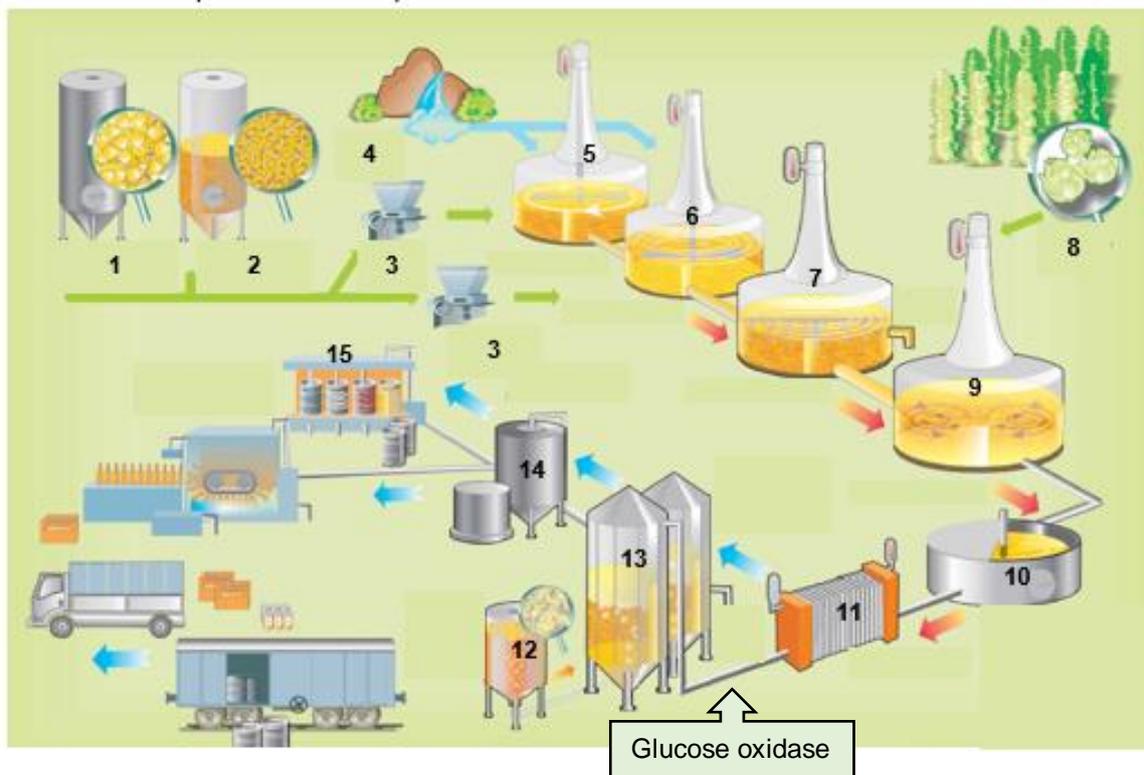


Figura 5.2. Adição da enzima no processo de produção. **Adaptado de: Novozymes, 2017c**

1- Silos adjuntos (cereais não maltados: cevada, milho, arroz, trigo); 2- Silo Malte; 3- Moinhos; 4- Água; 5- Caldeira caldas; 6- Caldeira empastagem; 7- Filtração mosto; 8- Lúpulo; 9- Caldeira ebulição; 10- whirlpool; 11- Arrefecedor de mosto; 12- Tanque de leveduras; 13- Fermentação e guarda; 14- Filtração da cerveja; 15- Enchimento e distribuição.

Nos vários ensaios realizados pretendeu-se testar as diversas condições utilizadas numa fase de produção, e que se encontram representadas na **figura 5.3**.

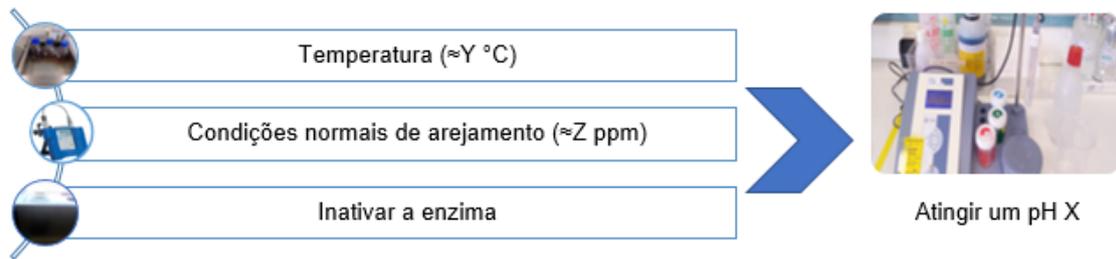


Figura 5.3. Condições finais pretendidas no ensaio com a glucose oxidase

Para além de se pretender melhorar as características organoléticas da cerveja sem álcool, com adição de glucose oxidase, é importante que as condições de produção da mesma sejam viáveis e semelhantes às utilizadas atualmente. Para isso, a temperatura do mosto deverá ser de aproximadamente Y °C, o arejamento deverá ser de aproximadamente Z ppm, a enzima deverá ser inativada por pasteurização, e, estabeleceu-se inicialmente, atingir um pH de X de forma a balancear o *ratio* acidez/doçura, e perceber se seria um pH aceitável para este tipo de cerveja.

### 5.3.1. Ensaio 1 - Condições ótimas da enzima

Como foi referido anteriormente, a oxidação da glucose a ácido glucónico depende da concentração de enzima utilizada, do pH do mosto, do arejamento e do tempo/temperatura do processo.

Com este ensaio pretendeu-se analisar o comportamento da enzima nas suas condições ótimas, avaliando:

- Se a quantidade de enzima prevista para este ensaio era suficiente para que houvesse reação;
- O efeito do arejamento e da temperatura na enzima;
- O efeito da redução do pH na reação enzimática;
- O tempo necessário para atingir o pH pretendido.

#### 5.3.1.1. Metodologia

Para a realização deste ensaio recolheu-se mosto da tanqueta (utilizada no ensaio de caracterização do mosto) para um copo de precipitação. Pesou-se a enzima e adicionou-se ao mosto. Colocou-se o copo com o mosto e a enzima numa placa de agitação e os sensores do potenciómetro de pH e do medidor de oxigénio dentro do copo de precipitação. O pH e o oxigénio dissolvido foram medidos de forma contínua. O ensaio encontra-se esquematizado na **figura 5.4**.

Ana Sofia Pontes Calado  
 AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL



Figura 5.4. Ensaio 1 - Condições ótimas da enzima

Na **tabela 5.2**, encontram-se descritos os vários parâmetros utilizados na realização deste ensaio.

Tabela 5.2. Condições do Ensaio 1 - Condições ótimas da enzima

Parâmetros – Ensaio 1	
Quantidade de enzima	$\Delta$ mL
Temperatura	20 °C
Arejamento	Sem arejamento forçado
Agitação	Constante
pH inicial	5,47
Tempo de ensaio	4 horas

#### 5.3.1.2. Resultados e discussão

Este ensaio decorreu durante 4 horas, sendo o pH e o oxigénio no mosto medidos de forma contínua. Na **tabela 5.3**, encontram-se a medição dos dois parâmetros com intervalos de meia hora.

Tabela 5.3. Ensaio 1 – Variação do pH e O<sub>2</sub> nas condições ótimas da enzima

Tempo decorrido (H)	pH	O <sub>2</sub> (ppm)
00:00:00	X+1,27	3,23
00:30:00	X+0,75	0,309
01:00:00	X+0,54	0,277
01:30:00	X+0,40	0,254
02:00:00	X+0,26	0,227
02:30:00	X+ 0,17	0,217
03:00:00	X+ 0,09	0,216
03:30:00	X+ 0,02	0,215
04:00:00	X – 0,03	0,221

Os resultados apresentados na tabela encontram-se representados no gráfico da **figura 5.5**. A linha verde representa o pH que se pretende atingir.

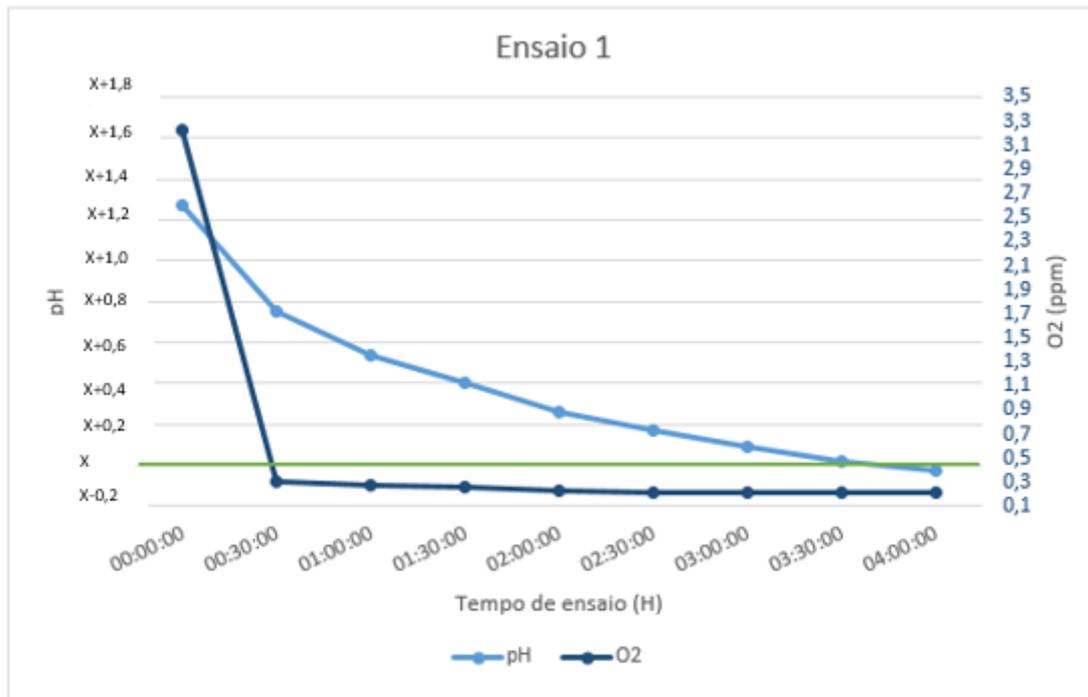


Figura 5.5. Ensaio 1 – Condições ótimas da enzima: variação do pH e oxigênio ao longo do tempo

Como se pode observar, existe um decréscimo no valor do pH e do oxigênio ao longo do tempo. A taxa de redução do pH é de 23,77% e a do oxigênio de 93,16%. A glucose oxidase demorou 4 horas até atingir o pH pretendido. O facto de a amostra estar em agitação contante permitiu a entrada de oxigênio no mosto durante o tempo de ensaio. A diminuição do consumo de oxigênio ao longo do tempo de ensaio, indica-nos que a glucose oxidase está constantemente a consumir o oxigênio que entra no sistema, para converter a glucose em ácido glucónico, sendo o mesmo praticamente nulo no fim da reação.

No ensaio 1, foi possível avaliar o comportamento enzimático, pela utilização das condições ótimas da enzima. A temperatura ambiente ( $\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), que segundo Schmidtke *et al.* (2011) permite uma oxidação mais rápida da glucose, e, o arejamento constante, que para os mesmos autores é um requisito essencial na oxidação da glucose, permitiu que fosse possível atingir o pH pretendido.

O facto de o pH do meio não se encontrar dentro da gama ótima definida por Schmidtke *et al.* (2011), que está entre 5,5 e 6,0, poderia reduzir para cerca de 75% a reação por inibição enzimática, segundo o mesmo autor. No entanto para Tribst & Cristianini (2012), a glucose oxidase é estável a um pH entre 3,5-7,0, o que se encontra dentro do pH inicial e pretendido para este ensaio.

### 5.3.2 Ensaio 2 - Tubos EBC

Com este ensaio pretendeu-se simular a adição de enzima em fermentadores e como isso iria influenciar a atividade enzimática. Neste ensaio são aplicadas algumas das condições utilizadas em produção, nomeadamente, a temperatura e sem recurso a agitação.

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Uma vez que a presença de oxigénio no mosto é condição obrigatória para a atividade da enzima e o mosto utilizado no ensaio 1, recolhido na brassagem, não é arejado, recolheu-se mosto nas Adegas, já arejado, de forma a que a enzima tenha oxigénio para a reação.

### 5.3.2.1. Metodologia

Para este ensaio recolheu-se nas Adegas cerca de 4 L de mosto para um balão volumétrico, e mediu-se os níveis de oxigénio, numa sonda. Já no laboratório transferiu-se o mosto para os três tubos EBC fechados, representados na figura seguinte (um utilizado como padrão e dois para a amostra com enzima). Estes encontravam-se ligados a um banho de água de forma a manter a temperatura constante. Adicionou-se com uma pipeta a enzima nos tubos. Recolheu-se 5 mL de amostras com uma pipeta, para copos de precipitação, de forma a medir o pH e o oxigénio no decorrer do ensaio. Seguidamente, **figura 5.6**, encontra-se esquematizado o ensaio.

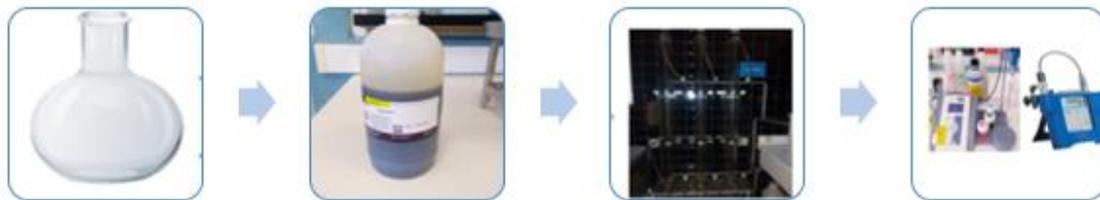


Figura 5.6. Ensaio 2 - Tubos EBC: efeito da quantidade de enzima e arejamento

Este ensaio foi realizado com duas condições diferentes (quantidade de enzima e arejamento) as mesmas encontram-se descritas na **tabela 5.4**:

Tabela 5.4 - Condições do ensaio 2 - Tubos EBC: efeito da quantidade de enzima e arejamento

Parâmetros	Condições	
	Ensaio 2.1	Ensaio 2.2
Quantidade de enzima	$\Delta$ mL	$\Delta + 3,6$ mL
Temperatura	Y °C	Y °C
Arejamento	Z – 3,7 ppm	Z+ 6,5 ppm
Agitação	Sem agitação	Sem agitação
pH inicial	5,52	5,50

### 5.3.2.2. Resultados e discussão

Os resultados obtidos neste ensaio encontram-se na **tabela 5.5**. O tempo de ensaio foi de 04:54H para o ensaio 2.1 e 02:29H para o ensaio 2.2. O tempo 00:00H corresponde à altura em que o mosto foi colocado nos tubos, ainda sem adição de enzima. O pH padrão é de 5,52 no ensaio 2.1 e 5,50 no ensaio 2.2. Na mesma altura mediu-se também o O<sub>2</sub> e podemos ver que nas duas situações o valor de oxigénio diminuiu em relação à altura em que o mosto foi recolhido nas Adegas.

Ana Sofia Pontes Calado  
 AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Tabela 5.5. Ensaio 2 - Tubos EBC: efeito da quantidade de enzima e arejamento

Tempo decorrido (H)	Ensaio 2.1		Ensaio 2.2	
	pH	O <sub>2</sub> (ppm)	pH	O <sub>2</sub> (ppm)
00:00:00	X+1,32	Z-8,90	X+1,30	Z-5,00
00:10:00	X+1,13		X+0,77	
00:30:00	X+1,06		X+0,82	
00:40:00	X+1,13			
00:49:00			X+0,93	
00:59:00	X+0,64			
01:24:00	X+0,90			
02:19:00	X+1,11		X+0,55	
02:29:00			X+0,80	
03:04:00	X+1,18			
04:19:00	X+1,07			
04:54:00	X+1,14			

Através da análise do gráfico da **figura 5.7**, podemos ver que durante as 04:54H em que decorreu o ensaio 1 e as 02:29H que decorreu o ensaio 2, o valor de pH não atingiu o valor pretendido, verificando-se ainda que este tende a aumentar ao longo do tempo. A taxa de redução foi de 3,26% para o pH no ensaio 2.1 e de 9,09% para o ensaio 2.2.

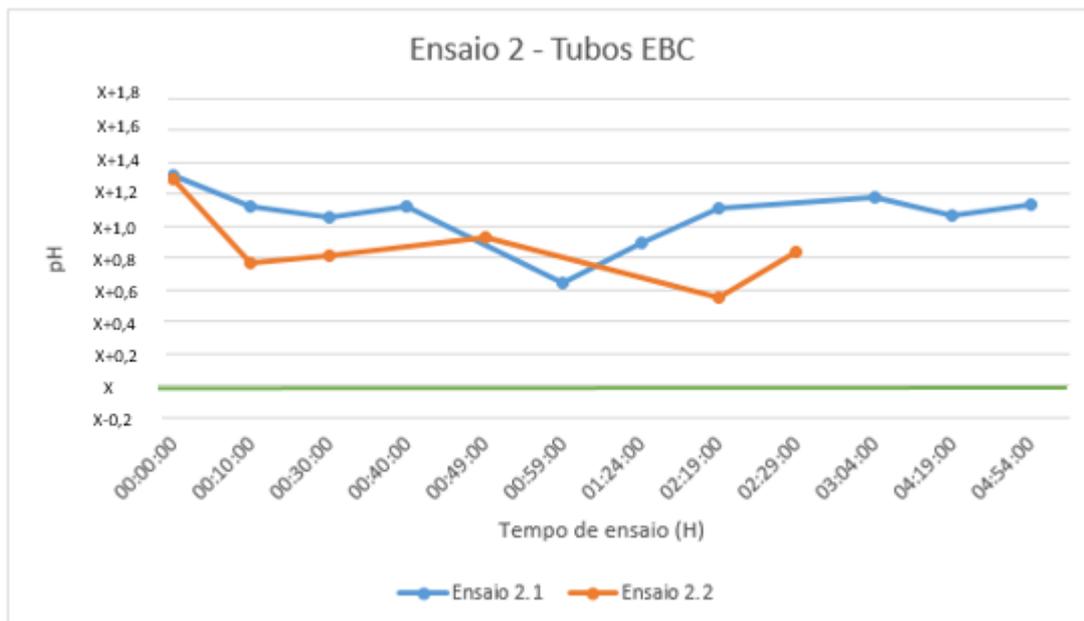


Figura 5.7. Ensaio 2 - Tubos EBC: efeito da quantidade de enzima e arejamento no pH do mosto

De forma a que fosse possível simular as condições de produção, foram utilizadas temperaturas mais baixas, encontrando-se fora do intervalo ótimo para os vários autores (Schmidtke *et al.*, 2011; Tribst & Cristianini, 2012; Pickering *et al.*, 1998). Para além da temperatura, não existiu agitação durante a realização deste ensaio, não permitindo a entrada de oxigénio. Sendo este um requisito importante (Schmidtke *et al.*, 2011) identificou-se como possível causa para que o pH pretendido não tivesse sido

atingido. O facto de o mosto ter sido arejado nas Adegas, de maneira a que fosse possível dissolver o oxigénio no mosto, também não foi suficiente para que ocorresse a reação quando se adicionava a enzima. Sendo o oxigénio perdido na transferência do mosto dos tanques para o balão de fundo plano, e posteriormente do balão para os Tubos EBC. De forma a testar o impacto que a utilização dos tubos EBC estariam a ter na perda de oxigénio do mosto, e de forma contornar esta perda, foi realizado um novo ensaio onde se utilizou frascos Schott fechados e tapados com parafilm. O mosto foi transferido para os frascos por uma mangueira e por uma pequena abertura feita no parafilm. De forma a minimizar as perdas de oxigénio que pudessem ocorrer, aumentou-se também o arejamento do mosto, encontrando-se este ensaio descrito seguidamente (ensaio 3 – frascos Schott).

### 5.3.3. Ensaio 3 - Frascos Schott

Devido aos resultados obtidos no ensaio anterior, fez-se um terceiro ensaio, onde o objetivo inicial era avaliar se a utilização de frascos fechados e tapados com parafilm, no momento da recolha do mosto nas Adegas, e se o aumento do arejamento do mosto era suficiente para que houvesse reação enzimática a uma temperatura de  $Y$  °C.

Posteriormente, foi avaliado o impacto que uma menor quantidade de oxigénio no mosto e uma menor quantidade de enzima utilizada teriam na reação, fora das suas condições ótimas.

#### 5.3.3.1. Metodologia

Para este ensaio recolheu-se o mosto nas adegas. Para os ensaios 3.1; 3.2; 3.3 recolheu-se o mosto para dois frascos Schott de 2 L (um padrão e outro onde se adicionou enzima) e no ensaio 3.4 para três frascos (um foi utilizado como padrão e dois para adição de enzima). Adicionou-se a enzima com uma pipeta e colocou-se os frascos fechados num banho. Durante o tempo de ensaio retiraram-se amostras de  $\approx 10$  mL com uma pipeta, colocou-se em copos de precipitação e mediu-se o pH e o oxigénio presente no mosto. Na **figura 5.8** encontra-se representado o ensaio realizado.



Figura 5.8. Ensaio 3 - Frascos Schott: efeito do arejamento e quantidade de enzima

Ana Sofia Pontes Calado  
 AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Cada ensaio foi realizado com condições iniciais diferentes, como podemos ver na **tabela 5.6**.

Tabela 5.6. Condições Ensaio 3 - Frascos Schott: efeito do arejamento e quantidade de enzima

Parâmetros	Condições					
	Ensaio 3.1	Ensaio 3.2	Ensaio 3.3	Ensaio 3.4	Ensaio 3.5	
					3.5.1	3.5.2
Quantidade de enzima	$\Delta + 2,6$ mL	$\Delta + 1,6$ mL	$\Delta$ mL			
Temperatura	Y °C					
Arejamento	Z+9,4 ppm	Z+7,0 ppm	Z+7,8 ppm	Z+1,4 ppm	Z+3,0 ppm	
Agitação	Sem agitação					
pH inicial	4,74	5,57	5,45	5,53	5,56	

### 5.3.3.2. Resultados e discussão

Na **tabela 5.7**, encontram-se os resultados do ensaio 3.1. Podemos ver que inicialmente o mosto tinha um pH de 4,74 e foi recolhido nas adegas com um arejamento de Z+9,4 ppm.

Tabela 5.7. Ensaio 3.1 - Frascos Schott: efeito do arejamento

Ensaio 3.1			
Tempo decorrido (H)	Padrão		Amostra
	pH	O <sub>2</sub> (ppm)	
0:00:00	X+0,54	Z+1,00	X+0,54
0:10:00			X+0,25
0:20:00		Z-4,00	X+0,78
0:30:00			X+0,68
0:40:00			X+0,81
0:50:00	X+0,97		X+0,93

No tempo 00:00H antes de se adicionar enzima, o arejamento era de Z+1,00 ppm, o que pode ser justificado com a perda de oxigénio na recolha do mosto. O ensaio terminou aos 00:50H pois, como se pode verificar, o pH da amostra encontrava-se a aumentar, ao contrário do pretendido, representando um aumento de 8,23%, em relação ao pH inicial.

A concentração de oxigénio tende a diminuir durante o ensaio, o que neste caso, pode estar relacionado com a abertura do frasco para recolha de amostras, uma vez que a reação enzimática não esta a decorrer como o esperado, pois existe um aumento do pH em vez da sua diminuição.

Na **figura 5.9**, encontra-se representado o gráfico com os resultados do ensaio 3.1, onde a linha verde corresponde ao valor de pH pretendido e a linha azul, ao pH da amostra padrão e ao pH da amostra com enzima.

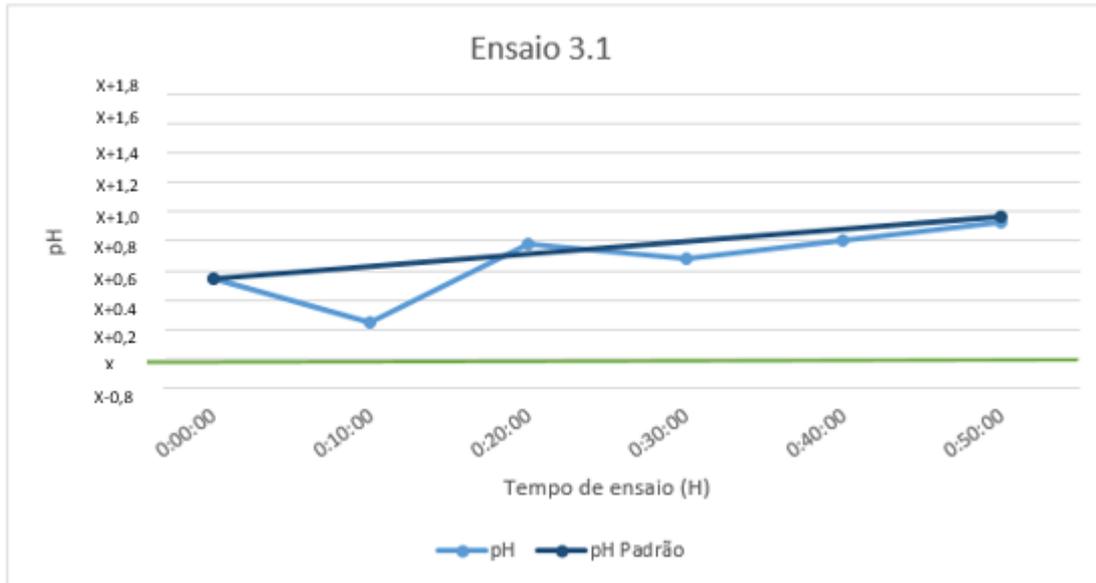


Figura 5.9. Análise de pHs no ensaio 3.1: efeito do arejamento

Uma vez que a enzima utilizada nos ensaios já tinha sido aberta há 6 meses, encomendou-se nova enzima de forma poder comparar os ensaios e verificar se seria a enzima que estava inviável ou se por outro lado poderiam ser as condições utilizadas que estavam a limitar a reação.

Para testar a nova enzima fez-se um novo ensaio com o arejamento de Z+7,00 ppm e utilizou-se  $\Delta$ +1,6 mL de enzima e uma temperatura de Y °C. O oxigénio dissolvido no mosto foi controlado no momento da recolha nas Adegas e 00:14H após o início do ensaio era Z-8,90 ppm. Os valores do pH e oxigénio encontram-se descritos na **tabela 5.8**.

Tabela 5.8. Ensaio 3.2 - Frascos Schott: efeito da nova enzima

Ensaio 3.2		
Tempo decorrido (H)	pH	O <sub>2</sub> (ppm)
0:00:00	X+1,37	
0:14:00	X+0,76	Z-8,90
1:08:00	X+0,50	
3:03:00	X+0,42	
3:33:00	X+0,34	
21:58:00	X+0,19	
22:18:00	X	
22:23:00	X+0,06	
23:43:00	X+0,03	
24:11:00	X-0,11	
27:23:00	X-0,25	
28:13:00	X-0,06	

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Como podemos ver pelo gráfico, **figura 5.10**, o valor de pH com a nova enzima, atingiu o valor pretendido às 22:18H de ensaio, o que representa uma taxa de redução de 25,67%. A diminuição de oxigénio indica-nos que a enzima está a consumir o oxigénio para a reação. A linha verde do gráfico representa o valor de pH pretendido.

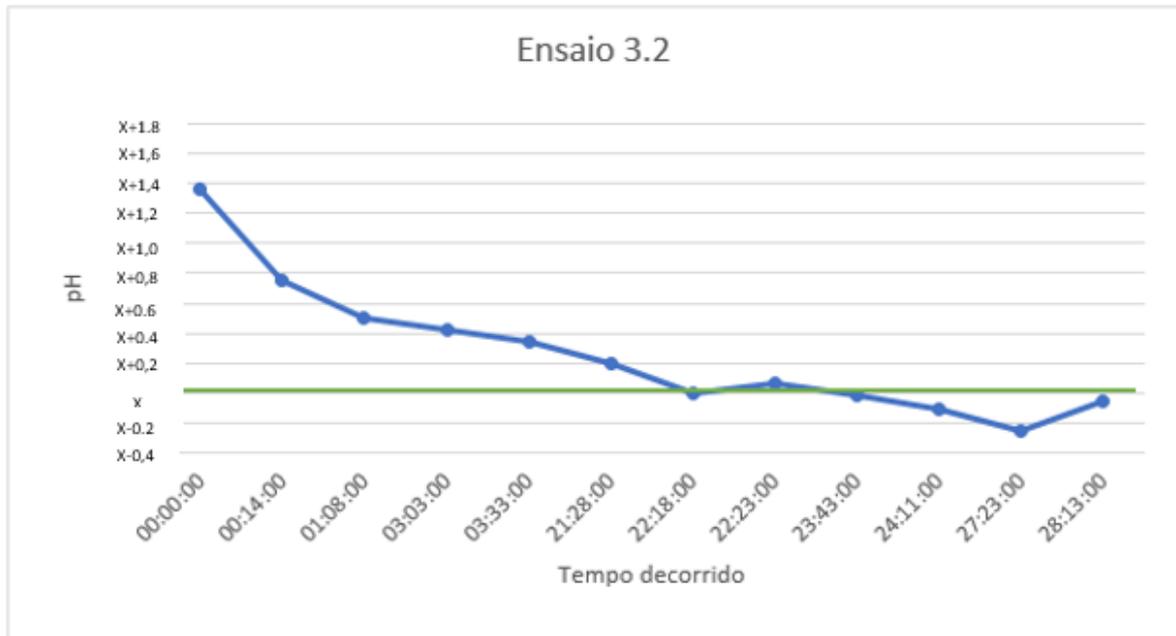


Figura 5.10. Análise de pH no ensaio 3.2: efeito da nova enzima

Segundo Tribst *et al.* (2014), a glucose oxidase é uma enzima bastante instável sendo facilmente desnaturada fora das suas condições ótimas, no entanto, com este ensaio verificou-se que a uma temperatura de Y °C é possível que ocorra a reação enzimática.

Com este ensaio conseguimos validar que mesmo utilizando uma temperatura fora dos limites ótimos, a enzima oxida a glucose a ácido glucónico. Este ensaio mostra que as condições de temperatura e arejamento aplicadas nos tubos EBC não foram a causa de não haver reação enzimática, mas sim a enzima.

Após a validação da temperatura, efetuaram-se dois ensaios (3.3 e 3.4), onde se comparou o impacto das diferentes concentrações de oxigénio dissolvido no mosto, para a mesma quantidade de enzima.

Ambos os ensaios decorreram em 173:20H e o pH inicial era de X+1,25 e o oxigénio Z+7,80 ppm no ensaio 3.3, e, X+1,33 e Z+1,40 ppm no ensaio 3.4. Neste último apenas se controlou o valor de arejamento no início do mesmo. Os resultados dos dois ensaios encontram-se na **tabela 5.9**.

Ana Sofia Pontes Calado  
 AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Tabela 5.9. Ensaio 3.3 e 3.4 - Frascos Schott: efeito de diferentes concentrações de oxigénio

Tempo decorrido (H)	Ensaio 3.3				Ensaio 3.4	
	Padrão		Amostra		Padrão	Amostra
	pH	O <sub>2</sub> (ppm)	pH	O <sub>2</sub> (ppm)	pH	pH
00:00:00	X+1,25		X+1,25		X+1,33	X+1,33
00:10:00			X+0,99			X+1,04
00:46:00						X+0,74
02:58:00						X+0,54
24:26:00						X+0,20
27:31:00						X+0,33
28:31:00						X+0,29
46:30:00		Z-4,00	X-0,27	Z-9,90		
70:15:00			X-0,42			
94:40:00	X+1,08		X-0,72			
117:46:00					X+1,28	X-0,35
143:56:00					X+1,25	X-0,48
165:26:00					X+1,03	X-0,52
173:20:00	X+0,48		X-0,82		X+0,94	X-0,57

Pela análise do gráfico, **figura 5.11**, o pH nas duas situações atingiu o valor pretendido (representado pela linha verde), no entanto o tempo de reação é diferente, sendo mais rápido naquele que tem maior oxigénio dissolvido, o que se traduz numa taxa de redução de 37,98% no ensaio 3.3 e de 34,36% para o ensaio 3.4. Como se pode ver no ensaio 3.3, que apresentava uma maior quantidade de arejamento atingiu o valor pretendido primeiro, aproximadamente às 28:31H, já o ensaio 3.4 atingiu esse pH aproximadamente às 70:15H.

Este ensaio encontra-se de acordo com Pickering *et al.* (1998), que indica que a reação da glucose oxidase depende da concentração de oxigénio presente no mosto.

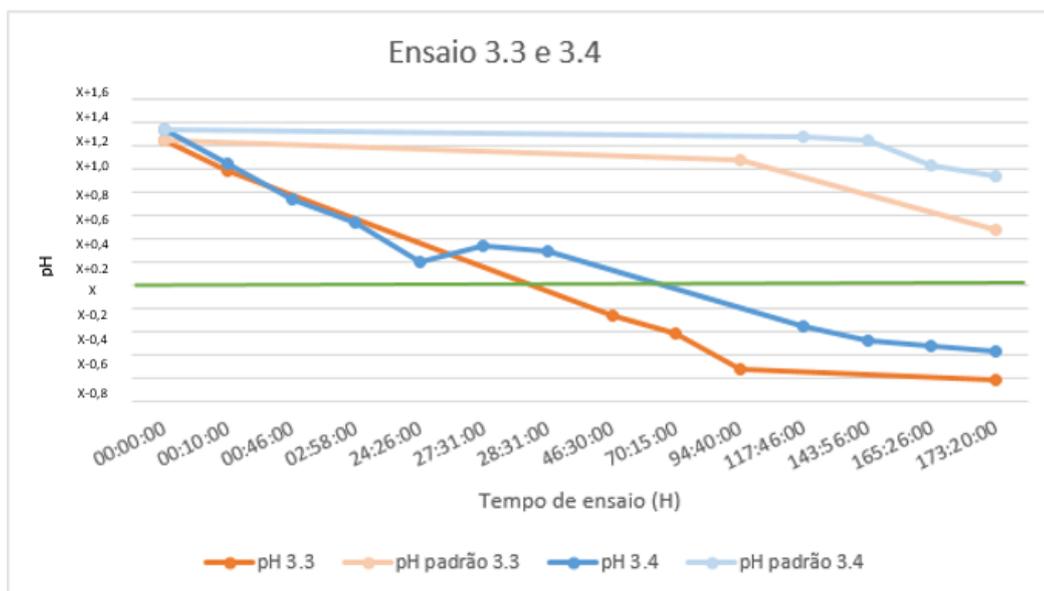


Figura 5.11. Análise dos pHs dos ensaios 3.3 e 3.4: efeito de diferentes concentrações de oxigénio dissolvido no mosto

Ana Sofia Pontes Calado  
**AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL**

Pela análise destes dois ensaios 3.3 e 3.4, conseguimos validar que mesmo em condições de arejamento mais baixas ocorre a reação enzimática, ainda que necessite de mais tempo para chegar ao valor de pH pretendido e que o valor de arejamento utilizado em produção é suficiente para oxidar a glucose.

Seguidamente, fez-se um ensaio 3.5, onde foram utilizados 3 frascos (um serviu de padrão e dois para testar diferentes quantidades de enzima), com um arejamento do mosto de Z ppm e a uma temperatura de Y °C. No ensaio 3.5.1 utilizou-se Δ+1,6 mL de enzima enquanto que no ensaio 3.5.2 utilizou-se Δ mL. Pelo facto de já termos validado o arejamento do mosto, o mesmo não foi analisado durante este ensaio. O ensaio decorreu em 76:55H e os resultados encontram-se representados na **tabela 5.10**.

Tabela 5.10. Ensaio 3.5 - Frascos Schott: efeito de diferentes quantidades de enzima

<b>Ensaio 3.5</b>			
<b>Tempo decorrido (H)</b>	<b>Padrão</b>	<b>Amostra</b>	
	<b>pH 3.5</b>	<b>pH 3.5.1</b>	<b>pH 3.5.2</b>
<b>00:00:00</b>	X+1,36	X+1,36	X+1,36
<b>00:10:00</b>		X+1,05	X+1,17
<b>22:25:00</b>	X+1,38	X+0,34	X+0,72
<b>23:25:00</b>			X+0,68
<b>24:10:00</b>		X+0,27	X+0,48
<b>24:55:00</b>		X+0,27	X+0,63
<b>28:10:00</b>	X+1,37		X+0,60
<b>46:55:00</b>		X-0,05	
<b>47:25:00</b>	X+1,34	X-0,08	X+0,28
<b>49:25:00</b>		X-0,11	X+0,14
<b>70:25:00</b>	X+1,39	X-0,34	X-0,18
<b>70:45:00</b>		X-0,47	X-0,14
<b>76:55:00</b>	X+1,37	X-0,45	X-0,33

Pela análise do gráfico, **figura 5.12**, podemos ver que nos dois ensaios se chegou ao pH pretendido, no entanto, no ensaio 3.5.1 demorou aproximadamente 34 horas enquanto que o 3.5.2 demorou aproximadamente 58 horas. A taxa de redução no ensaio 3.5.1 é de 32,55% e de 30,40% para o ensaio 3.5.2. Desta forma conseguimos comparar o impacto da quantidade de enzima utilizada com a velocidade da reação. Como seria de esperar a reação tende a ser mais rápida quanto maior a concentração de enzima adicionada ao mosto, tal como se pode verificar pelos resultados deste ensaio (Motta, 2007).

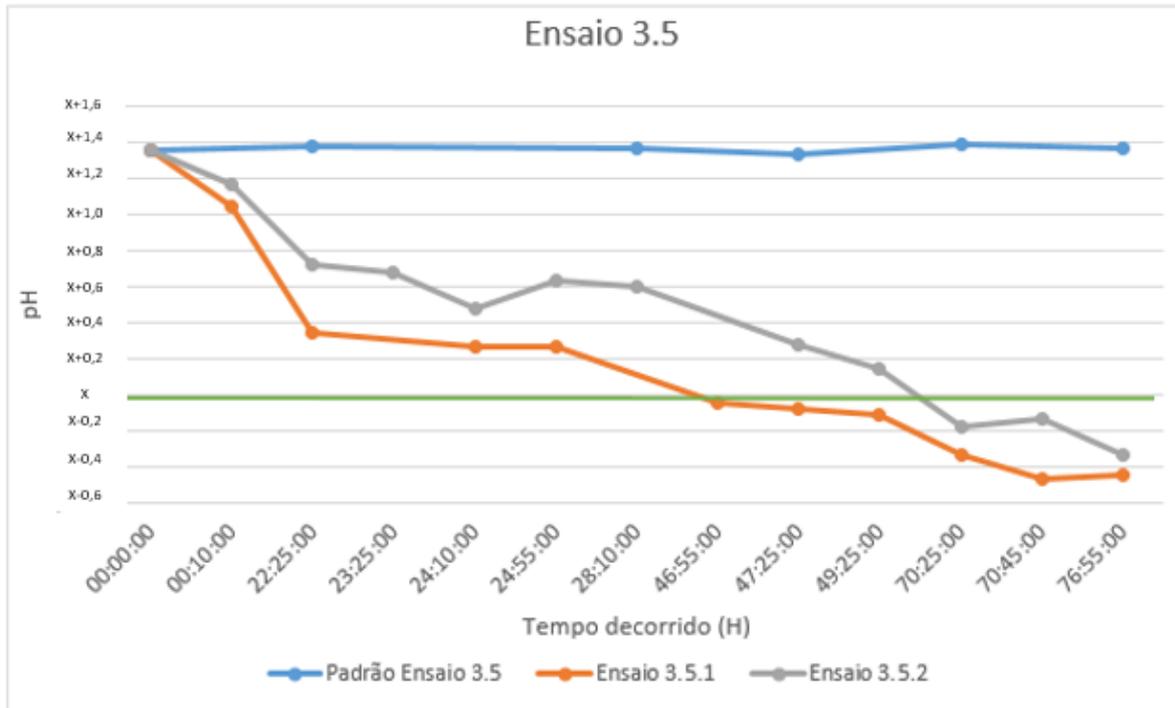


Figura 5.12. Análise de pHs no ensaio 3.5: efeito de diferentes quantidades de enzima

Com estes ensaios foi possível validar as várias condições propostas inicialmente, e, que se apresentam na **figura 5.13**.

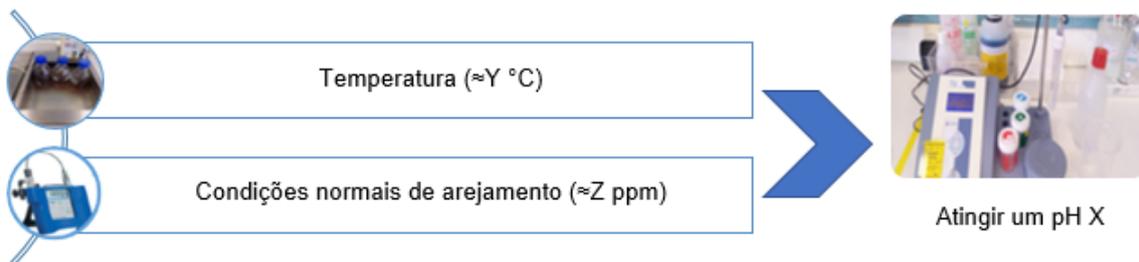


Figura 5.13. Condições validadas

Através destes ensaios foi possível validar que, apesar de a utilização de temperaturas, arejamento e pH não se encontrarem dentro dos limites ótimos definidos por alguns autores, nas condições aplicadas a enzima ainda se encontra estável sendo possível atingir o objetivo de pH pretendido.

De seguida procedeu-se à inativação da enzima, sendo os vários ensaios apresentados seguidamente.

## 5.4. Inativação da enzima

Como foi referido anteriormente estudos indicam que a glucose oxidase é uma enzima bastante instável, sendo facilmente desnaturada a temperaturas superiores a 60 °C (Tribst *et al.*, 2014). Desta forma, no ensaio seguinte (ensaio 4) testou-se o efeito da pasteurização, que seria utilizada numa etapa de produção para a desnaturação da enzima.

### 5.4.1. Ensaio 4 - Inativação da enzima por pasteurização

Com este ensaio pretendeu-se avaliar o efeito de várias condições de tempo/temperatura no efeito da enzima. Os ensaios foram realizados em banhos de água no laboratório. No ensaio 4.1 testou-se uma desnaturação pela temperatura de pasteurização utilizada em produção, uma vez que a mesma é superior aos 60 °C indicados por (Tribst *et al.*, 2014) e que seriam suficientes para inativar a enzima. Os ensaios foram feitos separadamente, mas utilizando o mesmo mosto recolhido.

#### 5.4.1.1 Metodologia

Para este ensaio repetiu-se o procedimento utilizado no ensaio 3.5. Recolheu-se o mosto nas Adeegas para três frascos Schott de 1 L (o frasco 1 para padrão e o 2 e 3 para adição de enzima). Adicionou-se com pipeta nos frascos a enzima, sendo os mesmos colocados num banho de água. Quando as amostras atingiram um pH igual ou inferior ao pretendido retirou-se as amostras do banho, fez-se uma diluição (1:4) de 100 mL de mosto e engarrafou-se. Encapsulou-se as garrafas e colocaram-se num banho de água à temperatura de pasteurização, descrita na **tabela 5.11**. O esquema do ensaio encontra-se na **figura 5.14**.



Figura 5.14. Ensaio 4 - Inativação da enzima por pasteurização

As condições de tempo/temperatura da pasteurização variaram consoante o ensaio realizado, encontrando-se as mesmas descritas na **tabela 5.11**.

Tabela 5.11. Condições de Ensaio 4 - Inativação da enzima por pasteurização

Parâmetros		Ensaio 4.1	Ensaio 4.2	Ensaio 4.3	Ensaio 4.4
Condições Iniciais	Quantidade de enzima	Δ+1,6 mL			
	Temperatura Banho	Y °C			
	Arejamento	Não avaliado			
	Agitação	Sem agitação			
	pH inicial	5,52			
Condições Pasteurização	Temperatura	Y+55 °C	Y+61 °C	Y+64 °C	Y+61 °C
	Tempo	15 minutos	30 minutos	1 minuto com agitação	30 minutos

Ana Sofia Pontes Calado  
**AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL**

No ensaio 4.1, as garrafas foram colocadas no banho de água com uma temperatura de Y+55 °C durante 15 minutos. No ensaio 4.2, as garrafas foram descapsuladas e colocadas no banho de água, a uma temperatura de Y+61 °C durante 30 minutos, com algodão a tapar a entrada da garrafa, durante este tempo mediu-se com uma sonda a temperatura no interior do mosto. Já no ensaio 4.3, as garrafas foram descapsuladas e colocadas no banho de água a uma temperatura de Y+64 °C, colocou-se algodão a tapar a entrada da garrafa e com uma sonda mediu-se a temperatura do mosto. Quando este atingiu a temperatura prevista agitou-se suavemente a garrafa, com movimentos circulares, ainda dentro do banho de água, de forma a obter a mesma temperatura no mosto. No ensaio 4.4, a garrafa foi descapsulada e colocou-se um *logger* (equipamento que mede a temperatura e as UP's) no ponto mais frio do interior da garrafa. Colocou-se depois num banho a Y+60 °C durante 30 minutos.

Em todos os ensaios depois de pasteurizadas as garrafas foram colocadas num banho de 30 °C durante 15 minutos, para diminuir o choque térmico, sendo depois colocadas num banho de água a temperaturas mais baixas e aí permanecendo durante o decorrer dos ensaios.

#### 5.4.1.2. Resultados e discussão

Visto os ensaios terem sido realizados em separado, o tempo decorrido foi diferente para cada um deles. O primeiro, 4.1, decorreu em 114:53H, o segundo e o quarto ensaios (4.2 e 4.4) em 22:45H e o terceiro (4.3) em 19:06H. O pH foi medido após as pasteurizações das amostras, tempo 00:00H. Os ensaios foram interrompidos quando se percebeu que o pH não permanecia constante, o que pode ser percebido pelo gráfico representado na **figura 5.15**, o que indica que a enzima não foi desnaturada. Os resultados dos vários ensaios encontram-se na **tabela 5.12**.

Tabela 5.12. Ensaio 4 - Inativação da enzima por pasteurização

Tempo decorrido (H)	Ensaio 4.1	Ensaio 4.2	Ensaio 4.3	Ensaio 4.4
00:00:00	X+0,14	X+0,22	X-0,23	X-0,54
00:48:00	X+0,36			
01:10:00				X-0,46
01:36:00			X-0,30	
01:55:00				X-0,47
02:28:00			X-0,31	
03:25:00		X+0,14		
04:25:00		X+0,11		
05:25:00		X+0,11		
06:25:00		X+0,02		
18:53:00	X-0,11			
19:01:00			X-0,50	
19:06:00			X-0,77	
20:08:00	X+0,02			
22:45:00		X-0,24		X-0,74
26:23:00	X-0,14			
114:53:00	X-0,59			

No ensaio 4.1 testou-se a temperatura de  $Y+55$  °C (temperatura registada no banho de água) durante 15 minutos. O tempo de ensaio foi calculado com base na temperatura e nas UP's que são aplicadas nas linhas de Pasteurização em produção, com base na fórmula:

$$UP's = t \times 1,393^{T-60}$$

Na fórmula o t corresponde ao tempo de pasteurização utilizado e o T à temperatura em °C.

Como podemos ver pelo gráfico no ensaio 4.1, o valor de pH diminuiu ao longo do tempo, iniciando nos  $X+0,14$  e terminando nos  $X-0,59$  ao fim das 114:53H de ensaio, o que representa uma taxa de redução de 16,82%.

Não sendo suficiente as condições aplicadas, testou-se no ensaio 4.2, um aumento da temperatura do banho de água ( $Y+61$  °C) e do tempo de ensaio (30 minutos), garantindo que a temperatura do mosto no interior da garrafa se encontrava à temperatura pretendida por uma sonda. No entanto pelo gráfico seguinte podemos ver que o pH não permaneceu constante, começando o ensaio com  $X+0,22$  e terminando em  $X-0,24$  ao fim das 22:45H, apresentado uma taxa de redução de 10,41%, o que nos indica que a enzima não foi inativada com estas condições.

No ensaio 4.3, colocou-se a garrafa no banho a  $Y+64$  °C e agitou-se com movimentos circulares durante um minuto. No entanto, percebemos pelo gráfico que o valor de pH diminuiu ao longo do tempo de ensaio, iniciando-se nos  $X-0,23$  e terminando nos  $X-0,77$  ao fim das 19:06H, representado uma taxa de redução neste caso de, 13,60%, o que demonstra que a enzima ainda não ficou inativada desta forma.

Já no ensaio seguinte, 4.4, com a utilização de um *logger* conseguimos garantir que a temperatura máxima que o mosto atingiu no interior da garrafa foi de  $Y+61$  °C e  $\delta$  UP's (anexo 1). No entanto pelo gráfico, podemos ver que estes valores não são suficientes para inativar a enzima, percebendo-se que o pH inicial de  $X-0,54$  ao fim das 22:45H encontrava-se a  $X-0,74$ , representado uma taxa de redução de 5,46%.

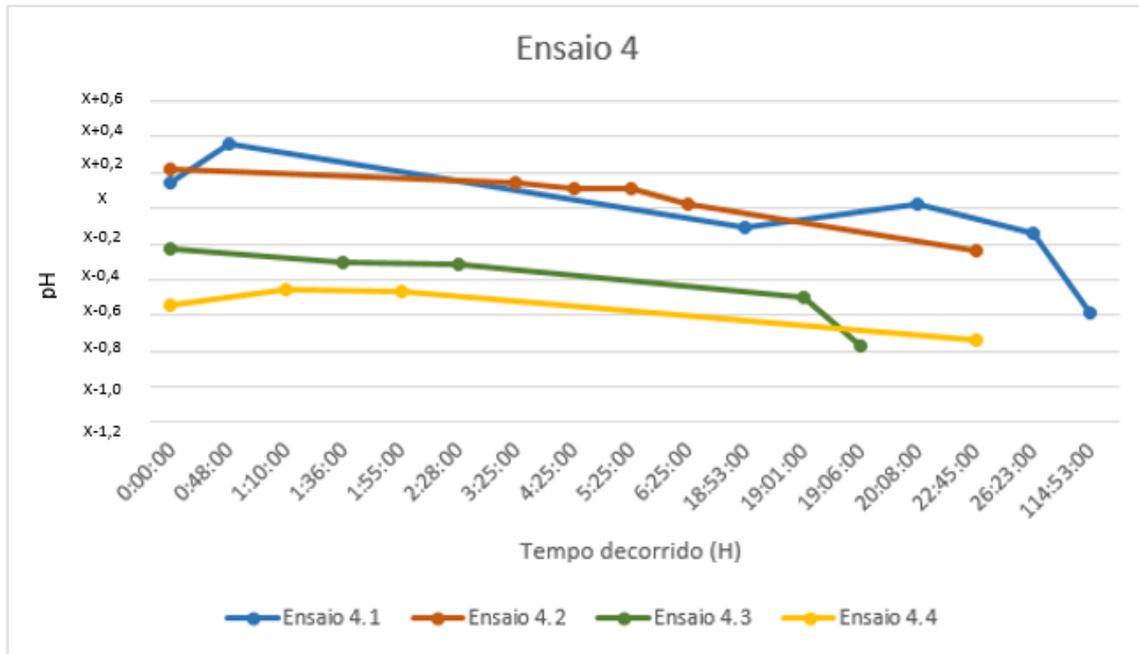


Figura 5.15. Análise de pHs do ensaio 4 - Inativação da enzima por pasteurização

Pelas taxas de redução deste ensaio, é possível perceber que a enzima diminuiu a sua atividade, no entanto continuou ativa.

Com o ensaio 4, verificou-se que as condições aplicadas em alguns estudos para inativar a enzima, parecem não ser suficientes para inativar a glucose oxidase utilizada nos nossos ensaios. O estudo de Tribst *et al.* (2014) indicou que era possível desnaturar a enzima a uma temperatura superior a 60 °C, no entanto em todos os ensaios essa condição foi aplicada e tal não se verificou, indicou também que era possível desnaturá-la em soluções com um pH inferior a 4,00, no entanto no ensaio 4.3 e 4.4, partimos de valor de pH inferior a 4,00 e a desnaturação também não se verificou.

De forma a inativar a enzima testou-se, no ensaio 5, o efeito da fervura na sua desnaturação, encontrando-se o ensaio descrito seguidamente.

#### 5.4.2. Ensaio 5 – Simulação da adição de enzima na etapa de brassagem e posterior inativação da enzima por fervura

Pelo ensaio 4, conseguimos perceber que as temperaturas/tempos aplicados na pasteurização, realizada em laboratório não foram suficientes para a desnaturação da enzima. Assim, foi realizado um ensaio no brassin, onde se pretendeu simular a adição da enzima na etapa da brassagem. Desta forma, testou-se o efeito que os vários tempos e temperaturas utilizado nesta etapa teriam na redução do pH, sendo posteriormente realizada uma fervura, tal como em produção, verificando-se o efeito desta na desnaturação da enzima.

A ação das temperaturas elevadas e da agitação permite que o malte seja decomposto e os açúcares complexos (amido) seja decomposto em açúcares simples (glucose), ficando a enzima com substrato disponível para a reação. A **figura 5.16** representa a adição da enzima numa fase de produção.

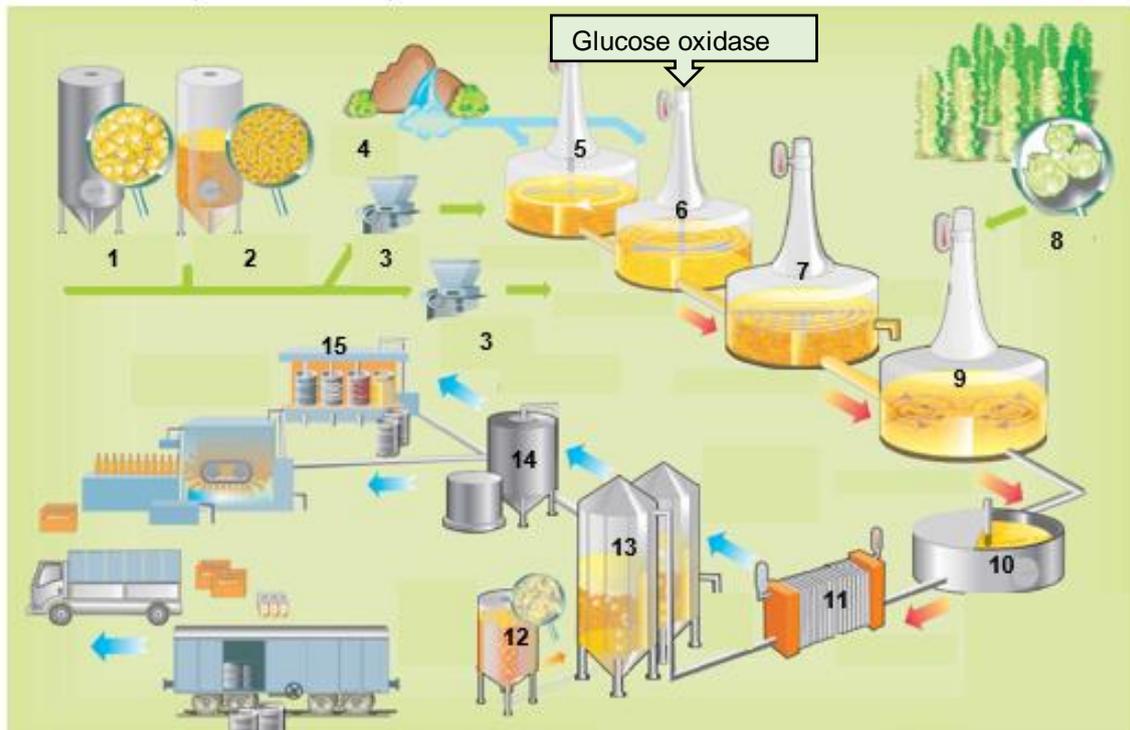


Figura 5.16. Representação da adição da enzima em produção. Adaptado de: Novozymes, 2017c

1 – Silos adjuntos (cereais não maltados: cevada, milho, arroz, trigo); 2- Silo Malte; 3- Moinhos; 4- Água; 5- Caldeira caldas; 6 – Caldeira empastagem; 7- Filtração mosto; 8- Lúpulo; 9- Caldeira ebulição; 10 – whirlpool; 11 – Arrefecedor de mosto; 12- Tanque de leveduras; 13 - Fermentação e guarda; 14 – Filtração da cerveja; 15 – Enchimento e distribuição.

#### 5.4.2.1. Metodologia

Para este ensaio colocou-se  $\approx 50$  g de malte, em seis copos de inox apropriados (o ensaio foi feito em duplicado, dois copos utilizados para o padrão, dois para a amostra 1 e dois para a amostra 2), colocou-se os copos no brassin e adicionou-se  $\approx 100$  mL de água. Após atingir a temperatura de  $45$  °C, retirou-se com um copo de precipitação  $\approx 10$  mL de amostra, e, colocou-se num banho de água a  $20$  °C, posteriormente mediu-se o pH da amostra padrão. Adicionou-se a enzima aos copos no brassin, e permaneceram 1 hora a  $Y+60$  °C. Após esta hora retirou-se os copos e colocou-se num banho de água a  $Y+60$  °C (o tempo utilizado para cada ensaio encontra-se indicado na **tabela 5.13**), com uma pipeta de 10 mL retirou-se uma amostra para um copo de precipitação contendo a amostra 1 e repetiu-se o procedimento para a amostra 2, colocou-se num banho de água a  $20$  °C, e, posteriormente mediu-se o pH.

Após o tempo definido para cada ensaio filtrou-se o mosto para um balão, de forma a que fossem separadas as cascas de malte presentes no mosto, e, transferiu-se o mosto já filtrado para copos de precipitação de 1 L, ferveu-se  $\approx Y+80$  °C durante uma hora. Após fervura mediu-se o pH, transferiu-se o mosto para garrafas, encapsulou-se e colocou-se estas num banho a  $Y$  °C. O ensaio encontra-se esquematizado na **figura 5.17**.



Figura 5.17. Ensaio 5 - Inativação da enzima por fervura

Como foi referido neste ensaio testaram-se diferentes condições de tempo à mesma temperatura (Y+60 °C). Todas as amostras foram fervidas a  $\approx Y+80$  °C durante 1 hora. As condições dos vários ensaios encontram-se descritas na **tabela 5.13**:

Tabela 5.13. Condições do Ensaio 5 - Inativação da enzima por fervura

Parâmetros		Ensaio 5.1	Ensaio 5.2	Ensaio 5.3
	Quantidade enzima	$\Delta+1,6$ mL		
Banho	Tempo	1 hora	4 horas	24 horas
	Temperatura	Y+60 °C	Y+60 °C	Y+60 °C
Fervura	Tempo	1 hora		
	Temperatura	$\approx Y+80$ °C		

#### 5.4.2.2. Resultados e discussão

No ensaio 5.1, as amostras permaneceram 1 hora a Y+60 °C no brassin. Após as amostras se encontrarem a uma temperatura de Y+10 °C mediu-se o pH da amostra padrão (5.1.0) no tempo 00:00 e no tempo 01:10H para as amostras 5.1.1 e 5.1.2, respetivamente. O ensaio decorreu durante 142:30H, os resultados obtidos neste ensaio encontram-se na **tabela 5.14**.

Tabela 5.14. Ensaio 5.1 - Inativação da enzima por fervura: 1 hora a Y+60 °C

Ensaio 5.1 (1 hora a Y+60 °C)			
Tempo decorrido (H)	Padrão	Amostra	
	pH 5.1.0	pH 5.1.1	pH 5.1.2
00:00:00	X+1,84		
01:10:00		X-0,03	X-0,01
06:00:00	X+1,74	X+0,73	X+0,60
22:30:00	X+1,79	X+0,70	X+0,57
46:44:00	X+1,70	X+0,66	X+0,52
70:30:00	X+1,81	X+0,66	X+0,48
142:30:00	X+1,68	X+0,58	X+0,39

O gráfico com os resultados do ensaio 5.1, encontra-se representado na **figura 5.18**. A linha amarela representa a altura em que ocorreu a fervura e a verde o pH pretendido. Como podemos ver pela sua análise, nas amostras 5.1.1 e 5.1.2 que apresentavam a amostra com enzima, o valor de pH

Ana Sofia Pontes Calado  
 AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

aumentou após a fervura, enquanto o valor de pH do padrão permaneceu praticamente constante ao longo do tempo.

Pela variação do valor de pH nas amostras 5.1.1 e 5.1.2, que após a fervura continua a baixar, iniciando-se nos X+0,73 e X+0,62 e terminando nos X+0,58 e X+0,39, respetivamente, indica-nos que a enzima não foi desnaturada.

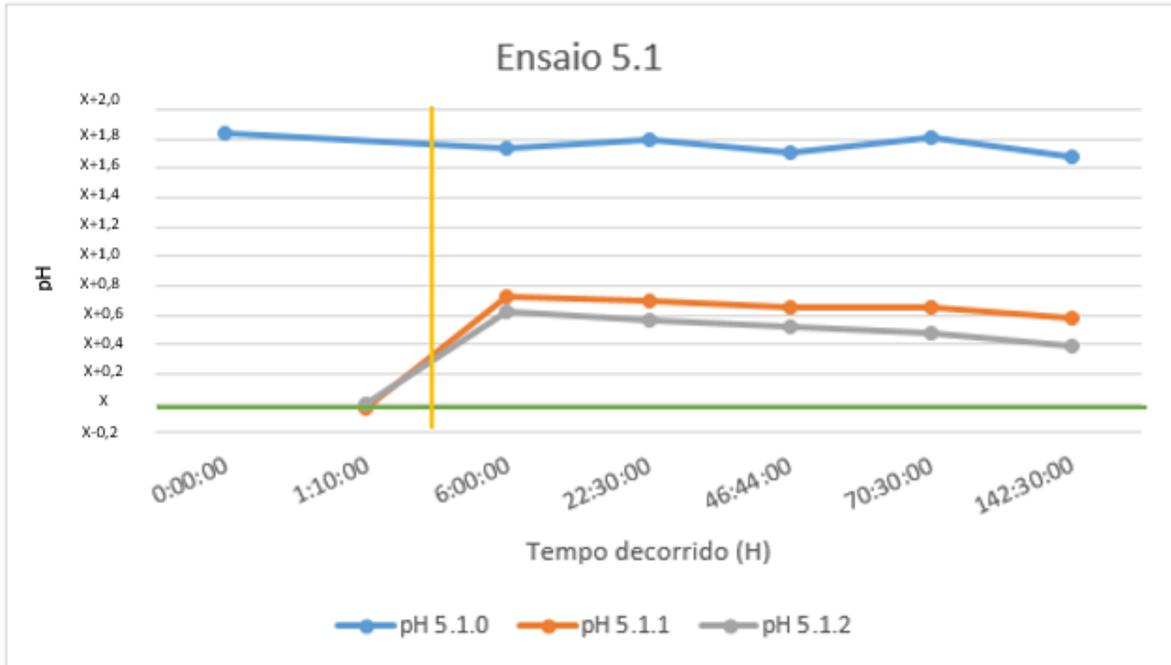


Figura 5.18. Ensaio 5.1 (1 hora a Y+60 °C)

No ensaio seguinte 5.2, testou-se o efeito de quatro horas a uma temperatura de Y+60 °C. Os resultados obtidos encontram-se na **tabela 5.15**.

Tabela 5.15. Ensaio 5.2 - Inativação da enzima por fervura: 4 horas a Y+60 °C

Ensaio 5.2 (4 horas a Y+60 °C)			
Tempo decorrido (H)	Padrão	Amostras	
	pH 5.2.0	pH 5.2.1	pH 5.2.2
00:00:00	X+1,79		
01:00:00		X+0,84	X+0,27
04:00:00	X+1,71	X+0,45	X+0,09
04:20:00	X+1,75	X+0,43	X+0,45
05:20:00	X+1,73	X+0,73	X+0,71
21:50:00	X+1,82	X+0,73	X+0,72
93:50:00	X+1,75	X+0,65	X+0,60
117:50:00	X+1,82	X+0,68	X+0,57

Ana Sofia Pontes Calado  
 AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Como podemos ver pelo gráfico da **figura 5.19**, após a fervura o valor de pH das amostras 5.2.1 e 5.2.2 aumentou, tal como aconteceu no ensaio 5.1. Isto não aconteceu na amostra 5.2.0 (padrão). Verifica-se ainda que após a fervura o pH era de X+0,73 e X+0,71 na amostra 5.2.1 e 5.2.2 respetivamente. No decorrer do ensaio houve uma variação no seu valor, terminando em X+0,68 e X+0,57, para a amostra 5.2.1 e 5.2.2. Pela variação dos valores percebemos que a enzima não foi desnaturada.

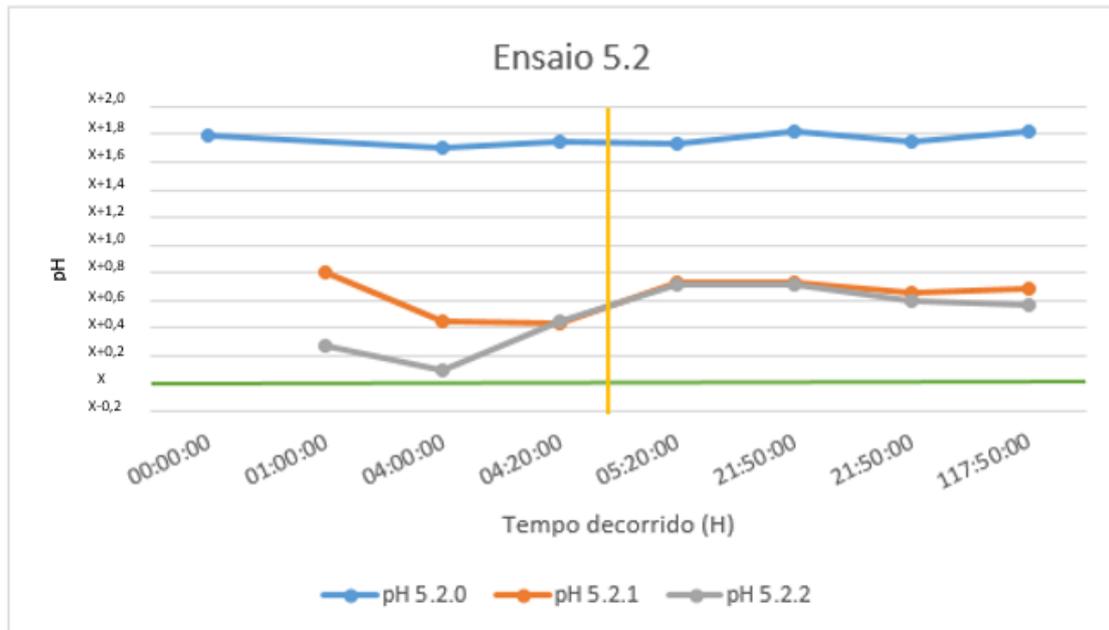


Figura 5.19. Ensaio 5.2 (4 horas a Y+60 °C)

Para o ensaio 5.3, as amostras permaneceram um dia num banho de água a Y+60 °C, de forma a que se pudesse verificar o efeito prolongado da temperatura no pH, e se nestas condições havia redução no seu valor. Antes de se adicionar enzima (tempo 00:00H), retirou-se uma amostra do padrão (5.3.0) e mediu-se o pH, o seu valor era de X+1,71. A fervura ocorreu as 21:30H. Os resultados deste ensaio encontram-se representados na **tabela 5.16**.

Tabela 5.16. Ensaio 5.3 - Inativação da enzima por fervura: 24 horas a Y+60 °C

Ensaio 5.3 (24 horas a Y+60 °C)			
Tempo decorrido (H)	Padrão	Amostra	
	pH 5.3.0	pH 5.3.1	pH 5.3.2
00:00:00	X+1,71		
00:45:00	X+1,75	X+0,25	
19:35:00	X+1,59	X-0,14	X-0,24
20:00:00	X+1,65	X-0,16	X-0,26
21:30:00	X+1,77	X+0,15	X+0,11
24:30:00	X+1,75	X+0,32	X+0,24
43:00:00	X+1,67	X+0,24	X+0,16
43:30:00	X+1,66	X+0,27	X+0,20

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Os resultados obtidos encontram-se representados no gráfico da **figura 5.20**. Pela sua análise podemos ver que neste ensaio, tal como nos anteriores, o pH da amostra aumentou após a fervura, à exceção da amostra padrão (5.3.0). Verificamos ainda que o pH da amostra 5.3.1 que era de X+0,15 antes da fervura aumentou para X+0,27 e o da amostra 5.3.2 que era de X+0,11 antes da fervura aumentou para X+0,20. O que nos indica que com este ensaio também não foi possível inativar a enzima.

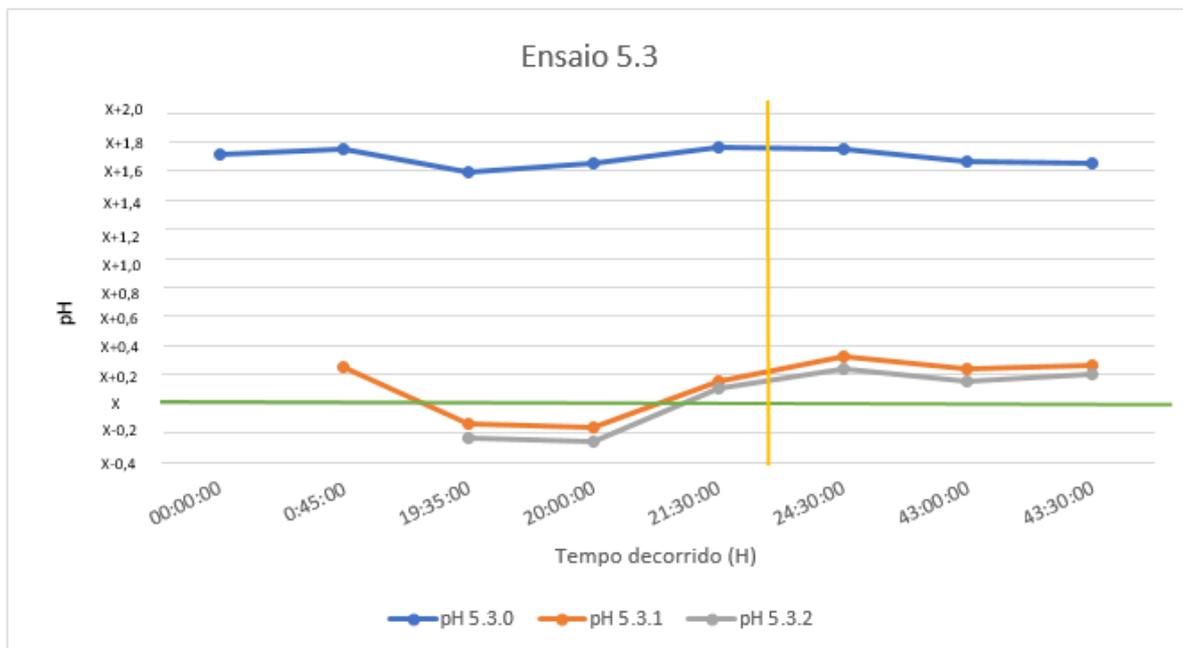


Figura 5.20. Ensaio 5.3 (24 horas a Y+60 °C)

Com os vários resultados obtidos no ensaio 5, podemos concluir que a adição da enzima na etapa da brassagem, para a posterior inativação por fervura, não é uma forma eficaz para desnaturar a enzima.

O aumento de pH que se verifica em todos os ensaios após a fervura, pode estar relacionado com o facto de a enzima não ter sido desnaturada, uma vez que a temperatura não permaneceu a cima dos Y+80 °C durante o decurso da etapa, pois foi necessário ir regulando a temperatura das mantas de aquecimento para que não houvesse uma grande perda de amostra por evaporação.

Apesar de ser possível atingir o pH pretendido com este ensaio, o mesmo não será eficaz a nível industrial, uma vez que após a fervura o pH aumenta. Assim, era necessário que a enzima tivesse mais tempo em contacto com o mosto, o que por sua vez implicaria que o mosto tivesse mais tempo a Y+60 °C, podendo levar a uma oxidação do mesmo e conseqüente perda das suas características organoléticas.

Desta forma no ensaio seguinte, pretendeu-se testar uma pasteurização a uma temperatura de Y+80 °C, realizada num banho de óleo e com frascos Schott. Uma vez que os frascos se encontram fechados é possível minimizar a perda de amostra, permitindo que o mosto permaneça a uma temperatura constante.

#### 5.4.3. Ensaio 6 - Inativação da enzima por pasteurização (Y+80 °C/Y+85 °C – 10 minutos)

Neste ensaio testou-se uma pasteurização a uma temperatura mais elevada que as testadas no ensaio 4, e, durante um menor tempo. Simulou-se a adição da enzima no mosto frio, sendo posteriormente pasteurizado. O mosto foi recolhido nas adegas e seguiu-se o procedimento utilizado no ensaio 4.

##### 5.4.3.1. Metodologia

Recolheu-se o mosto para três frascos Schott de 1 L, um utilizado como padrão e dois para a adição de enzima, o ensaio foi realizado em duplicado. Colocou-se os frascos com mosto num banho de água e retirou-se uma amostra, ≈10 mL, do frasco padrão 6.1.0 com uma pipeta para um copo de precipitação. Adicionou-se a enzima no frasco 6.1.1 e 6.1.2. Após as amostras atingirem o pH pretendido transferiu-se o mosto para frascos Schott de 250 mL e colocaram-se num banho de óleo, que já se encontrava à temperatura pretendida, sendo pasteurizadas a Y+80 °C durante 10 minutos (ensaio 6.1) e Y+85 °C durante 10 minutos (ensaio 6.2). Após a pasteurização coloram-se os frascos novamente num banho de água e retiraram-se várias amostras no decorrer do ensaio. O mesmo encontra-se representado na **figura 5.21**.



Figura 5.21. Ensaio 6 – Inativação por pasteurização (Y+80 °C/Y+85 °C – 10 minutos)

As várias condições utilizadas encontram-se descritas na **tabela 5.17**. O mosto utilizado nos dois ensaios foi o mesmo, variando apenas as condições de pasteurização.

Tabela 5.17. Condições Ensaio 6 – Inativação da enzima por pasteurização

Ensaio 6			
	Parâmetros	Ensaio 6.1	Ensaio 6.2
Condições Iniciais	Quantidade de enzima	Δ+1,6 mL	
	Temperatura Banho	Y °C	
	Arejamento	Não avaliada	
	Agitação	Sem agitação	
	pH inicial	5,47	
Condições Pasteurização	Temperatura	Y+80 °C	Y+85 °C
	Tempo	10 minutos	10 minutos

5.4.3.2. Resultados e discussão

Na **tabela 5.18** encontram-se os resultados obtidos pela adição da enzima no mosto. No tempo 00:00H mediu-se o pH do frasco com o mosto padrão (6.0.0) e ao fim de 02:15H mediu-se o pH dos frascos onde se tinha adicionado enzima. Na amostra 6.0.1 e 6.0.2, o pH era X+1,1 e X+0,86 respetivamente. O ensaio decorreu durante 189:00H, tendo a amostra 6.0.1 atingido um pH de X-0,26 e X-0,24 a amostra 6.0.2. No entanto o valor do pH padrão do mosto é muito inferior ao valor inicial o que nos pode indicar uma degradação do mesmo no fim do tempo de ensaio.

Tabela 5.18. Análise de pHs no ensaio 6

Ensaio 6			
Tempo decorrido (H)	Padrão	Amostra	
	pH 6.0.0	pH 6.0.1	pH 6.0.2
00:00:00	X+1,27		
02:15:00	X+1,35	X+1,10	X+0,86
21:15:00	X+1,34	X+0,96	X+0,88
45:15:00	X+1,27	X+0,57	X+0,51
50:45:00	X+1,30	X+0,34	X+0,28
72:00:00	X+1,36	X+0,35	X+0,33
93:15:00	X+1,31	X+0,24	X+0,20
99:45:00	X+1,30	X+0,16	X+0,14
165:15:00	X+1,23	X-0,04	X-0,01
189:00:00	X+1,07	X-0,26	X-0,24

Na **figura 5.22**, encontra-se o gráfico com os resultados do ensaio 6. A linha verde corresponde ao valor de pH pretendido. Com este ensaio verificou-se que às 165:15H o valor do pH estava próximo do valor pretendido. Tanto no ensaio 6.0.1 e 6.0.2 o pH final é idêntico, como seria de esperar, visto que as condições são as mesmas. Enquanto no ensaio 6.0.0 (padrão) a taxa de redução é de 3,66%, no ensaio 6.0.1 e 6.0.2, foi de 25,66% e de 21,74%, respetivamente.

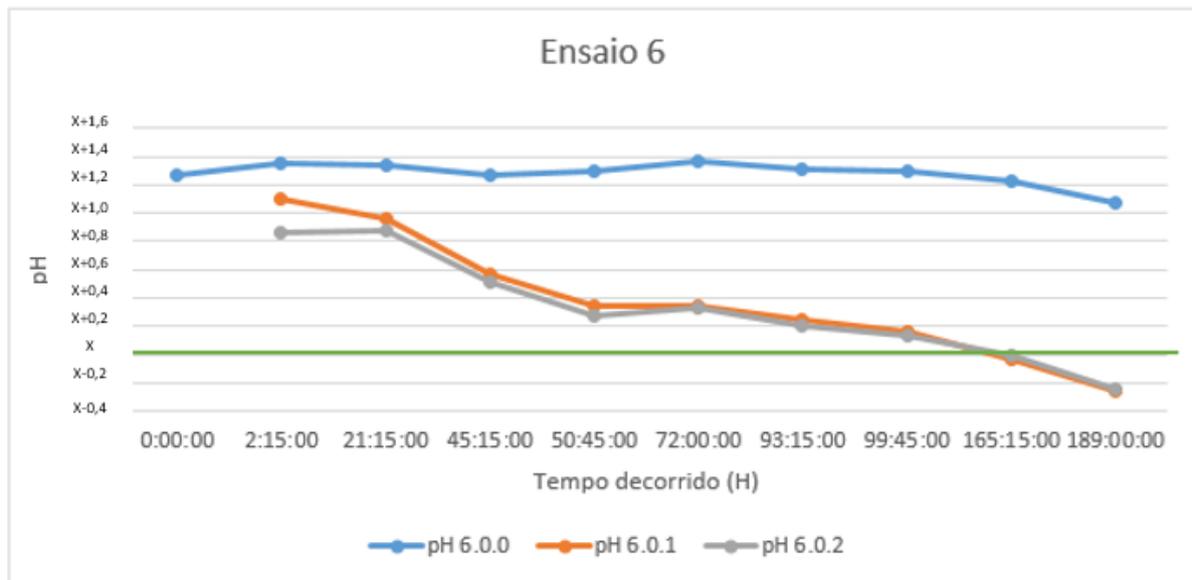


Figura 5.22. Análise de pHs no ensaio 6

Quando o pH atingiu o valor pretendido recolheu-se o mosto para três frascos Schott de 250 mL. A amostra 6.1.0 foi recolhida do padrão (6.0.0), a 6.1.1 foi recolhido da amostra 6.0.1 e a amostra 6.1.2 recolhida da 6.0.2, sendo posteriormente pasteurizadas a  $Y+80$  °C durante 10 minutos. Os resultados apresentados na **tabela 5.19** correspondem aos valores de pH após a pasteurização, sendo que o tempo 00:00H corresponde à medição realizada imediatamente a seguir ao tratamento térmico, as várias medições foram realizadas a uma temperatura de 10 °C.

Tabela 5.19. Ensaio 6.1 – Pasteurização  $Y+80$  °C (10 minutos)

Ensaio 6.1 – Pasteurização $Y+80$ °C (10 minutos)			
Tempo decorrido (H)	Padrão	Amostra	
	pH 6.1.0	pH 6.1.1	pH 6.1.2
0:00:00	X+1,28	X+0,06	X+0,05
18:00:00	X+1,17	X+0,03	X+0,04
24:00:00	X+1,26	X+0,01	X+0,01
42:00:00	X+1,19	X+0,03	X-0,01

Pela **figura 5.23**, conseguimos perceber que o pH se mantém constante durante o tempo em que decorreu o ensaio, nas duas amostras que foram pasteurizadas. O pH da amostras 6.1.1 passou de X+0,06 para X+0,03 e o da amostra 6.1.2 de X+0,05 para X-0,01, representando uma taxa de redução de 0,70% e de 1,41%, respetivamente. As variações do valor que se verificam nas duas amostras (6.1.1 e 6.1.2) encontram-se dentro do erro de leitura associado ao potenciómetro (0,04).

As variações de valor para a amostra padrão (6.1.0) podem se encontrar relacionadas com as variações de temperatura que possam ter ocorrido entre as medições, nomeadamente, o facto de a amostra se encontrar na bancada enquanto ocorriam outras leituras de pH.

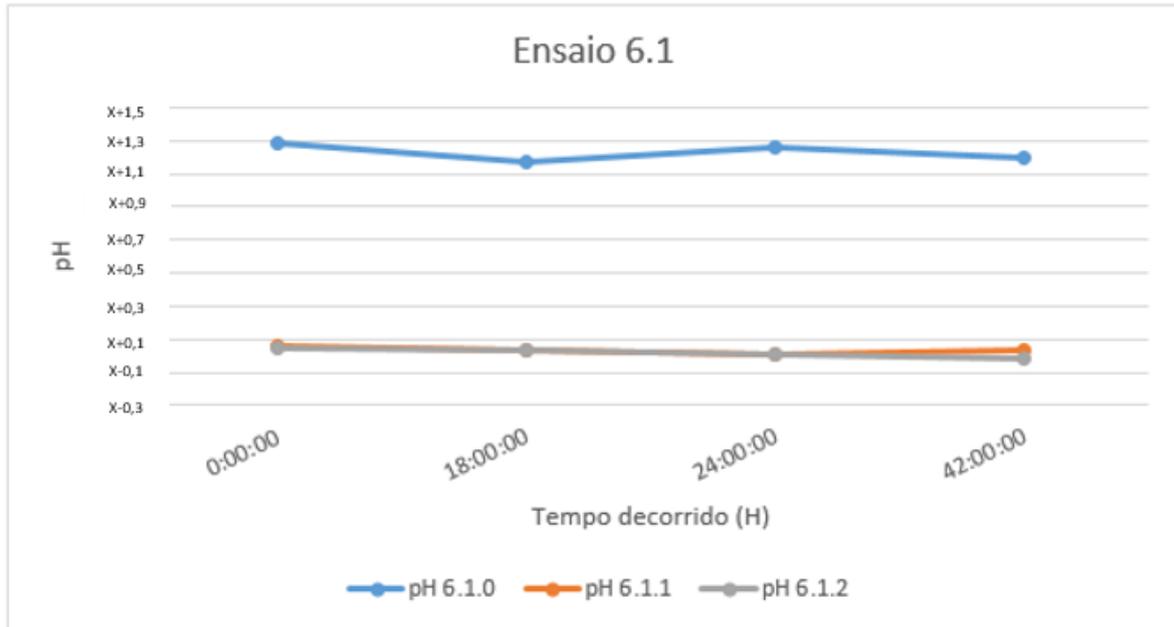


Figura 5.23. Análise de pHs no ensaio 6.1: efeito da pasteurização Y+80 °C (10 minutos)

No ensaio 6.2, realizou-se uma pasteurização num banho de óleo a Y+85 °C durante 10 minutos, a amostra para este ensaio foi recolhida da amostra inicial, para frascos Schott de 250 mL, quando esta atingiu um pH de X-0,13 (6.2.1) e X-0,10 (6.2.2). Os resultados correspondentes a este ensaio encontram-se na **tabela 5.20**.

Tabela 5.20. Ensaio 6.2 - Pasteurização Y+85 °C (10 minutos)

Ensaio 6.2 – Pasteurização Y+85 °C (10 minutos)			
Tempo decorrido (H)	Padrão	Amostra	
	pH 6.2.0	pH 6.2.1	pH 6.2.2
0:00:00	X+1,12	X-0,13	X-0,10
18:00:00	X+1,08	X-0,18	X-0,18
23:00:00	X+1,11	X-0,18	X-0,19
42:00:00	X+1,08	X-0,19	X-0,19

A **figura 5.24** representa o gráfico com os resultados do ensaio 6.2 onde se pode verificar que, tal como no ensaio anterior 6.1, o valor de pH nas amostras permaneceu praticamente constante durante o tempo de ensaio (42:00H). O que se traduz numa taxa de redução de 1,47% para a amostra 6.2.1 e 2,20% para a amostra 6.2.2. O valor 00:00H corresponde ao valor de pH imediatamente a seguir à pasteurização das amostras, apresentando estas uma temperatura de 26 °C, o que poderá explicar a diferença de valores da primeira para a segunda medição (18:00H), onde o pH das amostras foi medido a uma temperatura de Y °C. Nas restantes medições realizadas o pH das duas amostras permanece constante. Na **figura 5.24**, encontra-se representado o gráfico deste ensaio.

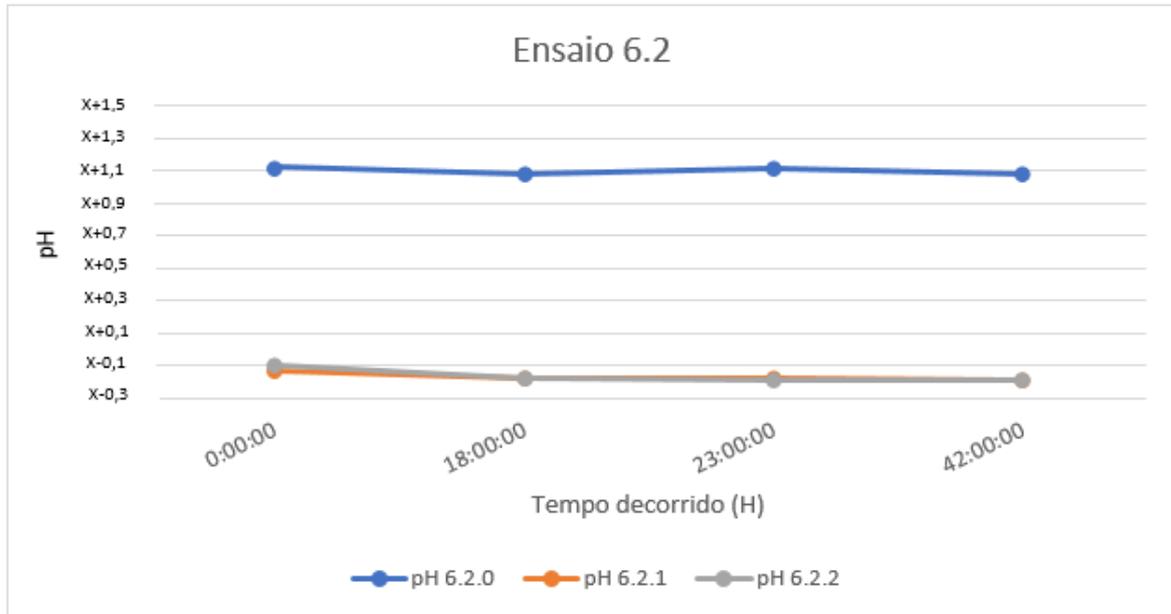


Figura 5.24. Análise de pHs no ensaio 6.2: Pasteurização Y+85 °C (10 minutos)

Através do ensaio 6, conclui-se que é possível a desnaturação da glucose oxidase por uma pasteurização a Y+80 °C durante 10 minutos. Pela realização deste ensaio e do ensaio 4, verificamos que a desnaturação da enzima não ocorre facilmente a uma temperatura superior a 60 °C, como descreveu Tribst *et al.* (2014).

Para Kretavičius *et al.* (2010) um tratamento térmico a 55 °C não afetou a atividade da glucose oxidase, enquanto que a 70 °C, o mesmo autor verificou uma redução de 10% na sua atividade. Já para Tribst & Cristianini (2012) a redução da atividade enzimática deu-se a uma temperatura de 75 °C.

Essa redução de atividade também é verificada nos ensaios iniciais efetuados por pasteurização e fervura (ensaio 4 e 5), no entanto o objetivo era uma inativação da enzima.

Uma redução de atividade sem a sua inativação, no nosso caso, iria permitir que o pH baixasse até que ocorresse uma desnaturação da enzima pelo meio se encontrar demasiado ácido. O que para além de provocar uma diminuição das características organoléticas, tornando a cerveja muito ácida, iria sair do limite mínimo legal de pH que se encontra estabelecido na legislação (3,5).

Os resultados obtidos neste ensaio em comparação com os resultados obtidos por alguns autores, podem estar relacionados com o facto de as enzimas utilizadas poderem vir de diferentes microrganismos, levando a que estas apresentem diferentes resistências térmicas, como resultado de diferentes sequências, estruturas, funções e propriedades, consoante a fonte de microrganismos de onde estas provêm (Tribst *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2007).

No entanto a utilização de temperaturas elevadas durante a pasteurização, neste caso os Y+80 °C, para uma inativação enzimática, pode provocar problemas de oxidação na cerveja (García-Torres *et al.*, 2009).

Ana Sofia Pontes Calado  
 AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Os resultados obtidos durante os vários ensaios realizados para a inativação da enzima, encontram-se de acordo com os resultados obtidos pelo laboratório fornecedor da enzima. Como se pode ver pela tabela seguinte 5.21 bem como pelo gráfico da figura apresentado, o valor de pH tende a baixar ao longo das 48 horas de ensaio.

Tabela 5.21. Resultados obtidos pelo laboratório que forneceu a enzima

Amostra	pH depois da pasteurização	pH após 24 horas	pH após 48 horas
Branco (100 °C)	4,97	5,07	4,97
Sem pasteurização	4,24	3,73	3,47
70 °C	4,04	3,64	3,47
75 °C	4,10	3,80	3,49
80 °C	4,16	3,59	3,47
85 °C	4,23	3,91	3,71
90 °C	4,23	4,23	4,21
95 °C	4,29	4,25	4,24
100 °C	4,34	4,32	4,32

Na figura seguinte 5.25 seguinte podemos verificar a variação do pH ao longo do tempo de ensaio.

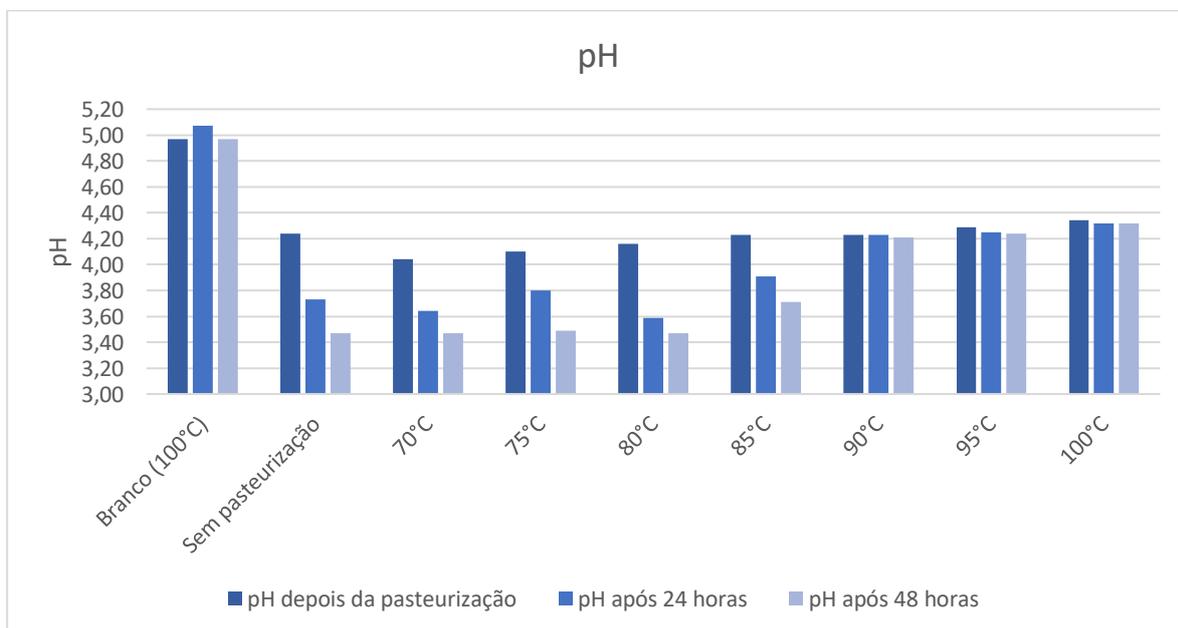


Figura 5.25. Variação do pH ao longo do tempo de ensaio realizado pelo laboratório que forneceu a enzima.

Seguidamente é apresentada uma tabela, 5.22, onde se apresentam descritos os vários ensaios realizados bem como os seus objetivos, quais os constrangimentos encontrados, e, as conclusões obtidas com cada um.

Ana Sofia Pontes Calado  
 AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Tabela 5.22. Resumo final dos vários ensaios realizados

Ensaio	Objetivo	Condições	Problemas	Conclusões	Soluções
<b>Condições ótimas da enzima</b>	1 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avaliar a quantidade de enzima para haver reação</li> <li>- Verificar a redução do pH após sairmos da gama ótima</li> <li>- O efeito do arejamento</li> <li>- O efeito da temperatura</li> <li>- E o tempo de atividade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Copos de precipitação</li> <li>- Quantidade de enzima recomendada</li> <li>- Agitação constante</li> <li>- Temperatura ambiente</li> </ul>		Com a quantidade recomendada atingiu-se o valor de pH pretendido em 4 horas, à temperatura ambiente e com agitação constante	
<b>Ensaio em Tubos EBC</b>	2 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ensaio realizado para simular a adição de enzima em fermentadores.</li> <li>- A amostra foi recolhida e arejada nas adegas e transferida para tubos EBC no laboratório</li> <li>- Os tubos encontram-se ligados a um banho para manter contante a temperatura do mosto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperatura Y °C</li> <li>- Amostras arejadas a Z ppm</li> <li>- Sem agitação</li> <li>- Tubos tapados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ao fim de 4 horas de ensaio o valor de pH não chega ao valor pretendido</li> <li>- Os níveis de oxigénio são muito baixos após a passagem do mosto para os tubos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O oxigénio é perdido na passagem do mosto do balão para os tubos.</li> <li>- Não havendo oxigénio suficiente para que a glucose seja convertida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Realizar ensaio em frascos Schott fechados</li> <li>- Recolher mosto com maior arejamento</li> </ul>
<b>Ensaio em frascos Schott</b>	3.1 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avaliar quantidades diferentes de enzima</li> <li>- Avaliar a ação da temperatura no processo</li> <li>- Avaliar as condições arejamento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frascos Schott</li> <li>- Quantidade de enzima: recomendada e em excesso</li> <li>- Níveis de oxigénio elevados</li> <li>- Temperatura Y °C</li> </ul>	- O pH aumentou com o tempo	- A enzima já não era viável	- Encomendou-se nova enzima
	3.2; 3.3; 3.4 e 3.5 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avaliar quantidades diferentes de enzima</li> <li>- Avaliar a ação da temperatura no processo</li> <li>- Avaliar as condições arejamento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frascos Schott</li> <li>- Quantidade de enzima: recomendada e em excesso</li> <li>- Níveis de oxigénio elevados</li> <li>- Temperatura Y °C</li> </ul>	- Ao fim das 4 horas o pH ainda não tinha atingido o valor pretendido	- As condições de arejamento e temperatura, estavam a afetar o processo	- Aumentar o tempo de ensaio, até se atingir o pH pretendido

Tabela 5.22. Resumo final dos vários ensaios realizados (continuação)

Ensaio	Objetivo	Condições	Problemas	Conclusões	Soluções	
Inativação da enzima	4	- Simular as condições de pasteurização, sendo utilizadas vários binómios Tempo/Temperatura	- Y+55 °C (15 minutos) - Y+61 °C (30 minutos) - Y+64 °C com agitação - Y+61 °C (30 minutos)	- Com as condições aplicadas não se conseguiu inativar a enzima. - O pH continuava a baixar ao longo do tempo	- As condições utilizadas não foram suficientes para conseguir inativar a enzima	- Tentou-se inativar a enzima por fervura
	5	- Simular a adição da enzima na etapa da brassagem com posterior inativação por fervura	- Y+60 °C durante 1 hora, 4 horas e 24 horas - Y+80 °C durante 1 hora	- Não foi possível atingir a temperatura de ebulição devido à perda de amostra.	- Estas condições não foram suficientes para inativar a enzima	- Aumentar a temperatura de pasteurização
	6	- Verificar se o efeito de uma pasteurização a uma temperatura mais elevada seria suficiente para inativar a enzima	- Y+80 °C durante 10 minutos - Y+85 °C durante 10 minutos	- As amostras demoram aproximadamente 1 hora até se atingir a temperatura pretendida	- Nestas condições foi possível inativar a enzima	

## 5.5. Determinação da concentração de glucose no mosto

Este ensaio teve por objetivo verificar qual a redução da concentração de glucose que se encontra presente no mosto, pela ação da enzima. O ensaio foi realizado por um método enzimático, que se encontra descrito seguidamente.

### 5.5.1. Metodologia

Inicialmente o excesso de CO<sub>2</sub> que possa estar presente na amostra é removido, para tal, colocou-se a amostra num erlenmeyer de 500 mL e agitou-se a amostra numa placa de agitação, durante 10 minutos. Seguidamente filtrou-se a amostra com papel de filtro para um segundo erlenmeyer de 500 mL e repetiu-se novamente este procedimento. Termoestabilizou-se as amostras num banho de água a 20-25 °C e fez-se uma diluição 1:10. Utilizou-se quatro tubos de ensaio, dois para o branco e dois para as amostras (uma amostra padrão, onde não se utilizou enzima, e outra com enzima). Nos tubos de ensaio em branco adicionou-se 1000 µL de solução de Adenosina Trifosfato (ATP) e Fosfato de Dinucleotideo de Adenina e Nicotinamida (NADP). No tubo de ensaio correspondente à amostra padrão, e no tubo de ensaio correspondente à amostra com enzima, adicionou-se 100 µL da respetiva amostra. Agitou-se os tubos e colocou-se num banho de água a 20 °C durante 20 minutos. De seguida, colocou-se 2000 µL de água destilada no tubo de ensaio que corresponde ao branco e 1900 µL de amostra padrão e de amostra com enzima nos tubos de ensaio correspondentes. Agitou-se os tubos e transferiu-se para as cuvetes. Após três minutos mediu-se a absorvância a 340 nm contra água destilada (absorvância 1). De seguida pipetou-se 20 µL da solução de hexocinase e glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-P) para as cuvetes, tapou-se com parafilm e agitou-se, após 15 minutos mediu-se a absorvância a 340 nm contra água destilada (absorvância 2).

### 5.5.2. Resultados e discussão

A variação da absorvância foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{amostra}} - (A_2 - A_1)_{\text{branco}}$$

onde A corresponde ao valor de absorvância.

A concentração de glucose foi calculada pela seguinte equação:

$$[\text{glucose}] = \frac{V \times M_w}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A = \frac{5.441}{\epsilon} \times \Delta A_{\text{glucose}}$$

onde V corresponde ao volume final; M<sub>w</sub> ao peso molecular da substância; v corresponde ao volume de amostra; d ao comprimento de onda e ε ao coeficiente de extinção NADPH, a 340 nm.

Na **tabela 5.23** encontram-se os resultados das leituras das absorvâncias de cada amostra.

Tabela 5.23. Valores de absorvância

		Absorvância 1	Absorvância 2
<b>Branco (sem mosto)</b>	Padrão	0,103	0,103
	Amostra	0,108	0,103
<b>Amostras (com mosto)</b>	Padrão (sem enzima)	0,115	3,612
	Amostra (com enzima)	0,121	2,571

De seguida pela fórmula da variação da absorvância, calculou-se o valor do padrão e da amostra. Sendo depois calculada a concentração de glucose inicial, presente no padrão e a concentração da glucose presente na amostra. Os resultados encontram-se na **tabela 5.24**.

Tabela 5.24. Resultados variação de absorvância e concentração de glucose

	Padrão	Amostra
$\Delta A$	3,497	2,455
[glucose] (g/L)	3,02	2,12

Multiplicando estes valores pelo fator de diluição, verificamos que no padrão existe 30,2 g/L de glucose e na amostra 21,2 g/L, o que indica, que a concentração de glucose reduziu cerca de 29,80% na amostra que contem a enzima em relação à amostra padrão sem enzima.

## 5.6. Ensaio organolético

Após a realização dos vários ensaios e após se ter atingido os objetivos inicialmente previstos, realizou-se uma prova de análise sensorial ao mosto com glucose oxidase. Nesta prova pretendeu-se avaliar a doçura e a acidez do mesmo, comparando-o com uma cerveja Sagres Branca com Álcool e uma cerveja Sagres sem Álcool e ainda com um mosto padrão (sem adição de enzima).

### 5.6.1. Metodologia

Para este ensaio, diluiu-se (1:4) de 100 mL do mosto padrão e 100 mL do mosto com enzima proveniente do ensaio 6 (após a sua pasteurizado a Y+80 °C durante 10 minutos) engarrafou-se e encapsulou-se. Sendo novamente pasteurizado num banho de água a Y+55 °C durante 15 minutos, de forma a garantir a sua estabilidade microbiológica.

### 5.6.2. Resultados e discussão

Na **figura 5.26** encontram-se representadas as amostras que foram utilizadas na prova. A amostra A corresponde a amostra de Sagres Branca com Álcool, a amostra B ao mosto padrão com um pH de X+1,39, a amostra C a uma cerveja Sagres sem Álcool, e a amostra D ao mosto com glucose oxidase com um pH de 4,18.

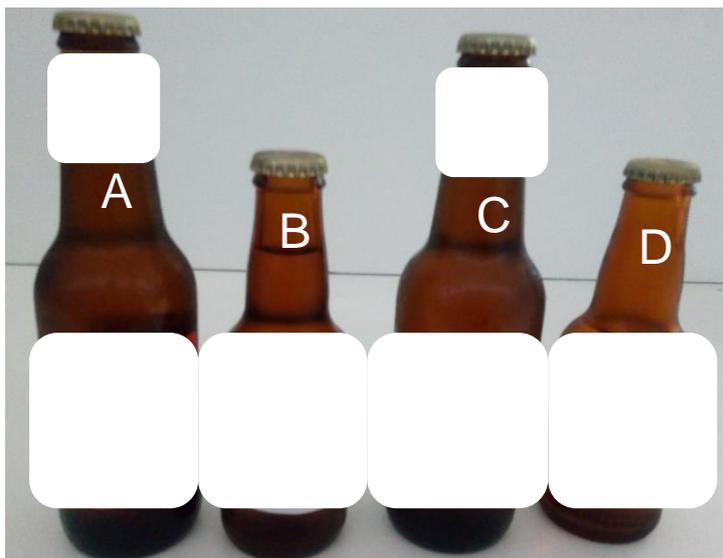


Figura 5.26. Amostras utilizadas no ensaio organolético

As amostras acima foram classificadas pelos provadores, como muito doce e muito ácida ou pouco doce e pouco ácida, por ordem crescente de doçura e acidez. Na **figura 5.27**, é apresentado o quadro com a sua avaliação.

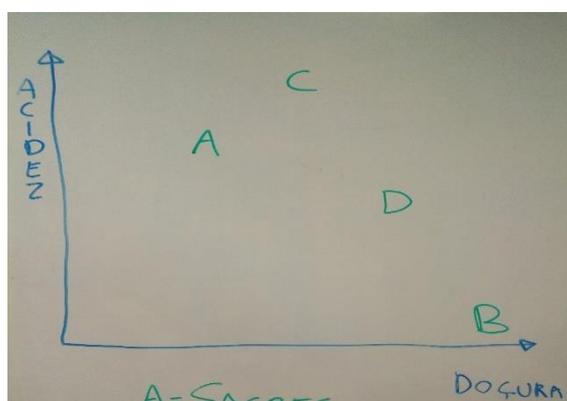


Figura 5.27. Avaliação organolética das amostras

Pela sua análise podemos ver que os provadores consideraram a amostra A (Sagres Branca com Álcool) com alguma doçura e acidez. A amostra C (Sagres sem Álcool) apresentou um sabor mais doce e mais ácido que a cerveja A. A amostra D (mosto com glucose oxidase), apresentou mais doçura que as amostras A e C. A amostra B (mosto sem glucose oxidase) apresentou um sabor muito doce e sem acidez.

Esta diferença de resultados a nível organolético era expectável, uma vez que se comparou cerveja (um produto final) que se encontra carbonatada e aromatizada, com um mosto que não estava carbonatado nem apresentava qualquer aditivo para além da glucose oxidase.



## **Capítulo 6:**

## **Conclusão**



## 6. Conclusão

A cerveja sem álcool é considerada um alimento saudável em relação a refrigerantes ou bebidas alcoólicas, por apresentar uma baixa composição calórica ao mesmo tempo que traz benefícios contra algumas doenças (O'Sullivan, 2012; Silva, 2017).

No entanto, a sua quota de mercado em Portugal é de apenas 2% em comparação com cervejas com álcool e vinho, estando o seu consumo dependente de vários fatores como a condução, o uso de medicamentos ou gravidez (Silva, 2017).

O sabor doce e a mosto característicos destas cervejas, não apreciado por muitos, é explicado pela remoção de alguns dos seus compostos aromáticos no momento da remoção do teor alcoólico da bebida (Ambrosi, 2016; Costa, 2016; Catarino & Mendes, 2011), sendo este facto considerado um motivo para o seu baixo consumo em comparação com outras bebidas (Silva, 2017).

Desta forma as indústrias cervejeiras sentem necessidade de inovar, de desenvolver novos produtos e processos, criando uma vantagem competitiva em relação à sua concorrência (Krücken-Pereira *et al.*, 2002).

Como tal, o presente trabalho pretendeu avaliar um novo processo de produção de cerveja sem álcool pela utilização da glucose oxidase. Esta enzima é já utilizada na indústria alimentar, nomeadamente na conservação dos alimentos e na redução do teor alcoólico no vinho (Bankar *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2008).

A utilização da glucose oxidase na produção de cervejas sem álcool permite, pela conversão da glucose (presente no mosto) a ácido glucónico, uma diminuição da doçura e um aumento da acidez, melhorando as características organoléticas destas cervejas. Para além disto, ao reduzir a concentração da glucose permite que as leveduras tenham menos açúcares para fermentar ao entrarem em contacto com o mosto, levando a uma diminuição do teor alcoólico (Wong *et al.*, 2008).

Atualmente a Sociedade Central de Cervejas e Bebidas utiliza um processo de fermentação limitada/controlada, ou seja, a cerveja entra em contacto com as leveduras, no entanto, a temperatura aplicada limita a sua ação, tornando-se mais difícil a fermentação dos açúcares e a produção de etanol. É na fase de fermentação que a levedura produz subprodutos, que vão contribuir para o sabor e aroma da bebida, ao interrompermos o processo leva a que as cervejas sem álcool apresentem um sabor doce e a mosto. De forma a melhorar estas características, é então adicionado ácido à cerveja (Ambrosi, 2016; Costa, 2016; Catarino & Mendes, 2011).

A utilização de glucose oxidase, para além de apresentar a vantagem de não ser preciso recorrer à adição de ácidos no seu processo, reduz a doçura do mosto.

De forma a avaliar o seu comportamento numa posterior fase industrial, foi necessário recorrer a diversos ensaios em laboratório para se analisar a reação da enzima a diversos fatores que são aplicados num processo de produção, nomeadamente temperatura, arejamento e pasteurização.

Após a realização dos vários ensaios e de ultrapassados todos os constrangimentos encontrados, foi possível atingir os objetivos inicialmente propostos. Verificou-se que a uma temperatura de Y °C, em condições de arejamento idênticas às utilizadas em produção conseguiu-se obter o pH inicialmente pretendido de X, idêntico ao da Sagres Branca com álcool.

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Na realização dos ensaios para a inativação da glucose oxidase foi possível verificar que existiu uma diminuição da atividade enzimática em todos os ensaios, no entanto, isso não foi suficiente para passar a um ensaio industrial. A inativação enzimática é um requisito fundamental, uma vez que a constante redução do pH durante o tempo de vida útil do produto, traria consequências não só a nível do sabor, tornando a cerveja muito ácida, como também poderia levar a uma diminuição do pH abaixo do seu limite mínimo legal de 3,5, segundo a Portaria nº 1/96.

A inativação da enzima só foi conseguida a uma temperatura de  $Y+80$  °C durante 10 minutos, por um processo de pasteurização. No entanto, pela prova de análise sensorial realizada, conclui-se que a temperatura elevada leva a uma deterioração das características organoléticas desta cerveja.

Visto que as condições atuais de pasteurização não são eficazes na inativação da enzima, chega-se à conclusão que a utilização de glucose oxidase, neste momento, não é eficaz na melhoria das características organoléticas. Pois, se por um lado se consegue diminuir o pH da cerveja, com consequente diminuição da sua doçura, por outro, as elevadas temperaturas necessárias para a sua inativação contribuem para a perda da sua qualidade, devido à oxidação da mesma.

# Bibliografia



## Bibliografia

Almenar, E.; Samsudin, H.; Auras, R. & Harte, J. (2010). Consumer acceptance of fresh blueberries in bio-based packages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 1121-1128.

Ambrosi, A. (2016). *Desalcoolização de cerveja - Avaliação da remoção de etanol de soluções aquosas por osmose directa*. Programa de pós-graduação em Engenharia Química. Escola de Engenharia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 228 pp.

APCV (2012a). *A cerveja como elemento de uma dieta saudável*. Associação Portuguesa dos Produtores de Cerveja. Acedido a 05 de Agosto de 2017 em, <http://www.apcv.pt/pdfs/bc2.pdf>.

APCV (2012b). *Nova tabela de composição dos alimentos revela vantagens das bebidas fermentadas sobre as destiladas - A cerveja é mais nutritiva*. Associação Portuguesa dos Produtores de Cerveja. Acedido a 05 de Agosto de 2017 em, <http://www.apcv.pt/pdfs/pubs/5.pdf>.

Araújo, F. B.; Silva, P. H. A. & Minim, V. P. R. (2003). Perfil Sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 23(2): 121-128.

Bamforth, C. (2002). Nutritional aspects of beer - a review. *Nutrition Research*, 22: 227-237.

Bankar, S. B.; Bule, M. V.; Singhal, R. S. & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*, 27: 489-501.

Brányik, T.; Silva, D. P.; Baszczyński, M; Almeida, J. B.; Almeida & Silva, J. B. (2012). A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. *Journal of Food Engineering*, 208(4): 93-506.

Catarino, M. & Mendes, A. (2011). Non-alcoholic beer - A new industrial process. *Separation and Purification Technology*. 79(3): 342-351.

Cervaléria (2017). Água a matéria prima da cerveja. Acedido a 06 de Agosto de 2017 em, <http://www.cervaleria.com/blog/2015/08/materia-prima-da-cerveja-parte-ii-a-agua-cervejeira/>.

Chaudhary, S.; Sagar, S.; Kumar, M.; Sengar, R. S. & Tomar, A. (2015). The Use of Enzymes in Food Processing: A Review. *South Asian Journal of Food Technology and Environment*. 1, 190-210.

Como fazer cerveja (2009). Matérias primas. Acedido a 18 de Setembro de 2017 em, [http://comofazercerveja.com.br/conteudo/view?ID\\_CONTEUDO=14](http://comofazercerveja.com.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=14).

Costa, R. (2016). *Produção de cerveja com baixo teor alcoólico*. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada. Escola de Engenharia de Lorena- Universidade de São Paulo. 84 pp.

Flores, D. (2015). DeborahCBFlores. Estrutura do grão. *Acedido a 06 de Agosto de 2017 em*, <https://deborahcbflores.wordpress.com>

Dotro, P.; Nardi, M.; Rodriguez, D. & Rodriguez, V. (1994). *Estudio de la Evolución del pH en Función de la Temperatura*. Club de Ciencias "Leonardo Da Vinci" - Departamento de Investigación y Desarrollo.

Ermis, E. (2017). Halal status of enzymes used in food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 64: 69-73.

FDA (2015). *Enzyme preparations used in food (partial list)*. Food and Drugs Administration. *Acedido a 05 de Agosto de 2017 em*, <https://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/gras/enzymepreparations/default.htm>.

Ferreira, P.; Vargas, P.; Costa, M. P.; Machado, Í. L.; Costa, F. C. & Borges, J. D.S. (2009). Processos Químicos. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange*, 3(5): 137.

FIB (2011). *As enzimas nos alimentos*. Food Ingredientes Brasil. *Acedido a 05 de Agosto de 2017 em*, <http://revista-fi.com.br/artigos/artigos-editoriais/enzimas-natureza-e-acao-nos-alimentos>.

Gallo, L. (2017). Enzimas. Bioquímicas Home Page. *Acedido a 06 de Agosto de 2017 em*, <http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/enzimas.html>.

García-Torres, R.; Ponagandla, N. R.; Rouseff, R. L.; Goodrich-Schneider, R. M. & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2009). Effects of Dissolved Oxygen in Fruit Juices and Methods of Removal. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8: 409-423.

Heineken (2014). *Basic Brewing Process*. The Heineken Brewing Academy, 39.

IFT (1981). Sensory Evaluation Guide for Testing Food and Beverage Products. Institute of Food Technology. *Food Technology*, 35: 50-59.

Inbarco (2016). Styrian Golding Celia. Inbarco Slovenia *Acedido a 06 de Agosto de 2017 em*, <http://inbarco.si>.

Kretavičius, J., Kurtinaitienė, B., Račys, J. & Čeksterytė, V. (2010). Inactivation of glucose oxidase during heat-treatment de-crystallization of honey. *Žemdirbystė=Agriculture*, 97(4): 115-122.

Krücken-Pereira, L., França de Abreu, A. & Boizan, A. (2002). A necessidade de inovar: um estudo na indústria de alimentos. *Revista de Ciências da Administração*, 4(6): 19-27.

Leite, P. B., Carvalho, G. B. M. d. & Druzian, J. I. (2013). Tendências tecnológicas para produção de bebidas alcoólicas com baixo teor alcoólico. *Revista GEINTEC*, 3(3): 213-220.

Menezes, M. S. E.; Rosenthal, A.; Sabaa-Srur, A.; Camargo, L.; Calado, V.; Santos, A. (2008). Efeito da alta pressão hidrostática na atividade de enzimas da polpa de açaí. *Ciências Tecnologia dos Alimentos*. 28: 14-19.

Motta, V. T. (2007). *Bioquímica Básica. Autolab Análises Clínicas. Capítulo 3 – Enzimas*. Acedido a 17 de Setembro de 2017 em, [www.ccta.ufcg.edu.br/admin.files.action.php?action=download&id=129](http://www.ccta.ufcg.edu.br/admin.files.action.php?action=download&id=129)

Novozymes (2017a). *Enzyme Use in Beverage Production*. Acedido a 05 de Agosto de 2017 em, [http://www.novozymes.com/en/-/media/Novozymes/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes\\_use\\_in\\_beverage\\_production.pdf?la=en](http://www.novozymes.com/en/-/media/Novozymes/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes_use_in_beverage_production.pdf?la=en)

Novozymes (2017b). *Enzymes and you*. Acedido a 05 de Agosto de 2017 em, [http://www.novozymes.com/en/-/media/Novozymes/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes\\_and\\_you.pdf?la=en](http://www.novozymes.com/en/-/media/Novozymes/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes_and_you.pdf?la=en)

Novozymes (2017c). *Novozymes - Enzymes at work*. Acedido a 05 de Agosto de 2017 em, [http://www.novozymes.com/en/-/media/Novozymes/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes\\_at\\_work.pdf?la=en](http://www.novozymes.com/en/-/media/Novozymes/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes_at_work.pdf?la=en)

O'Sullivan, K. (2012). *Beer and Calories Report*. Acedido a 05 de Agosto de 2017 em, [http://www.apcv.pt/pdfs/1379607337\\_Beer-and-Calories-Report.pdf](http://www.apcv.pt/pdfs/1379607337_Beer-and-Calories-Report.pdf)

Pickering, G. J.; Heatherbell, D. A. & Barnes, M. F. (1998). Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. *Food Research International*, 31(10): 685–692.

Portaria nº 1/96 de 3 de Janeiro. *Diário da República – I Série B*. Ministérios da Economia e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Regulamento (CE) N.º 1332/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008

SCC (2017a). Sobre nós. Sociedade Central de Cervejas e Bebidas. *Acedido a 05 de Agosto de 2017 em*, <http://www.centralcervejas.pt/pt/sobre-nos/soc-central-cervejas.aspx>

SCC (2017b). Marcas & Produtos. Sociedade Central de Cervejas e Bebidas. *Acedido a 05 de Agosto de 2017 em*, <http://www.centralcervejas.pt/pt/marcas-produtos.aspx>

SCC (2017c). Inovação. Sociedade Central de Cervejas e Bebidas. *Acedido a 05 de Agosto de 2017 em*, <http://www.centralcervejas.pt/pt/sobre-nos/inovacao.aspx>

SCC (2017d). Sociedade Central de Cervejas e Bebidas. Caracterização da cerveja.Sagres

SCC (2017e). Sociedade Central de Cervejas e Bebidas. Caracterização da cerveja Sagres sem álcool

Scheffer, R.; Dias, E.; Lemos, B. & Lemos, A. (2013). Processo produtivo da cerveja tipo Pilsen. *VII Encontro de Engenharia de Produção Agroindustrial*, 12.

Schmidtke, L. M.; Blackman, J. W. & Agboola, S. O. (2011). Production Technologies for Reduced Alcoholic Wines. *Journal of Food Science*, 71(1): 25-41.

Schuh, S. & Preci, D. (2014). *Matérias primas e etapas de processamento para elaboração de cerveja*. 1º Simpósio de Agronomia e Tecnologia em Alimentos.

Sidónio, L.; Capanema, L.; Carneiro, J. & Guimarães, D. (2013). Inovação na indústria de alimentos: importância e dinâmica no complexo agroindustrial brasileiro. *Agroindústria*. BNDES Sectorial 37, 333-370.

Silva, A. P. (2017). *A flavour of emotions. Sensory & emotional profiling of wine, beer and non-alcoholic beer*. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 182 pp.

Sisak, C., Csanádi, Z., Rónay, E. & Szajáni, B. (2006). Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 1002-1007.

Sobiologia (2017). Enzimas. Sobiologia. *Acedido em 06 de Agosto de 2017 em*, [http://www.sobiologia.com.br/conteudos/quimica\\_vida/quimica11.php](http://www.sobiologia.com.br/conteudos/quimica_vida/quimica11.php).

Ana Sofia Pontes Calado  
AVALIAÇÃO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA SEM ÁLCOOL

Teixeira, M. B. (2014). Melhoria do sistema de gestão da qualidade microbiológica da Filtração de cerveja. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. *Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa*. 143pp.

Tribst, A. A. L. & Cristianini, M. (2012). Changes in commercial glucose oxidase activity by high pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16: 355-360.

Tribst, A. A. L., Júnio, C., Murakami, M.T. & Cristianini, M. (2014). Effects of High Pressure Homogenization on the Activity, Stability, Kinetics and Three-Dimensional Conformation of a Glucose oxidase Produced by *Aspergillus niger*. *PLoS ONE*, 9(7): e103410.

Vicente, P. (2016). *Pros and cons of enzyme usage, Brewing guild. Heineken*.

Wong, C. M., Wong, K. H. & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78: 927-938.



# **Anexos**



### Anexo 1 – Diagrama das Unidades de Pasteurização

