



Francisco Mira Ferreira

Licenciado em Bioquímica

Fatores que afetam a formação e redução de diacetilo em fermentadores

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

Orientadora: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão
Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Coorientador: Engenheiro João Paulo de Sousa Reis Mendes,
Gestor da Malteria e Fabricação de Cerveja, SCC

Júri:

Presidente: Professora Doutora Maria Paula
Amaro de Castilho Duarte, FCT-NOVA

Arguente: Engenheira Sofia Tourais Ferreira,
SCC, S.A.

Vogal: Professora Doutora Ana Lúcia
Monteiro Durão Leitão, FCT-NOVA

Novembro, 2020



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Francisco Mira Ferreira

Fatores que afetam a formação e redução de diacetilo em fermentadores

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

Orientadora: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão
Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Coorientador: Engenheiro João Paulo de Sousa Reis Mendes,
Gestor da Malteria e Fabricação de Cerveja, SCC

Novembro, 2020

“Fatores que afetam a formação e redução de diacetilo em fermentadores”

Copyright © 2020 Francisco Mira Ferreira, FCT/UNL e UNL.

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.

Agradecimentos

Esta dissertação surge como o fruto da ajuda de muitas pessoas que me proporcionaram a informação, o ambiente, a motivação e a cooperação necessária para a realização deste projeto.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Ana Lúcia Leitão por me ter proporcionado os contactos necessários para a realização deste estágio. Quero agradecer também as inúmeras horas disponibilizadas a corrigir este documento, todas as orientações e dicas fornecidas, a sua celeridade de resposta e a sua boa vontade em me forçar a demonstrar o melhor das minhas capacidades e conhecimentos na redação desta dissertação.

Ao meu coorientador, o Eng. João Paulo Mendes, quero agradecer imenso por ter acreditado em mim e por me ter inserido neste projeto. Agradeço todo o seu tempo disponibilizado para sempre reunir comigo, para me guiar na realização do projeto, assim como às suas críticas construtivas e *guidelines*. Por último, um sincero obrigado por toda a sua preocupação com o meu estado de saúde e ajuda nos momentos mais complicados.

À Eng. Sofia Ferreira que, estando ela também em aprendizagem, foi incansável em reunir comigo, me tirar dúvidas a qualquer hora, fornecer todo o material e recursos necessários, sempre com a maior simpatia e profissionalismo.

Ao Eng. Miguel Cardoso, Dra. Dulce Silva, Dr. Manuel Galvão, Dra. Teresa Sampaio e Paula Florentino agradeço todo o material fornecido e a grande simpatia e preocupação com o meu bem-estar e sucesso.

Ao pessoal da Malteria, que me recebeu de braços abertos e me apresentou o seu “lar”.

Ao pessoal da Brassagem: Luís Gomes, José Sousa, Paulo Quintas, Marco Oliveira, Carlos Simões, Admilson Ribeiro, Valeri Mitov, e em especial ao meu caro Andriy Nikolin, que me mostraram os segredos da arte de “cozinhar” cerveja, sempre incansáveis e disponíveis para cooperar em qualquer ensaio ou em esclarecer qualquer dúvida minha.

Ao pessoal das Adegas: Pedro Pereira, Ricardo Freitas, Igor Kacharay, Lúcio Eduardo, Pedro Diogo, Henrique Silva, José Sobral, Fábio Santos, João Cesinando, Bruno Marques, André Semedo e, em especial ao Mestre José Caneira, que não só me deram a conhecer o seu trabalho e as instalações fabris com todo o prazer e simpatia, como foram incansáveis em satisfazer as minhas dúvidas, colher amostras e trocar ideias para eu poder obter o melhor trabalho possível.

Agradeço ao Dr. João Faustino e à Dra. Maria José Sousa por me terem aberto as portas do laboratório e colocado todo o material necessário ao meu estudo à disposição. Neste local pude conhecer pessoas incríveis a quem agradeço toda a ajuda fornecida, o tempo disponibilizado a ensinar-me, o material lavado e a boa disposição. A Elisete Cordeiro, Raquel Mendes, Jorge Castro, Sónia Mendes, Inês Goes, Ana Margarida Botas, Carla Ratinho, e em especial à Maria Tomás, Liliana Cardoso e Jaime Moreno por me terem feito sentir integrado, pela motivação dada, pela companhia às refeições e por tanto me fazerem evoluir profissionalmente.

E sobretudo, agradeço ao Grupo *Heineken*, em especial à Sociedade Central de Cervejas e ao seu *staff*, que me permitiu usufruir desta experiência, sempre com enorme profissionalismo e rigor, dando-me as melhores condições, desde as refeições à assistência médica, para que o meu trabalho decorresse de forma segura e confortável.

Aos meus amigos que tornaram isto possível, agradeço todas as dicas, material disponibilizado, auxílio em como redigir uma tese e ajuda nos momentos mais “panicados” e de menor motivação. Obrigado ao Rubén Torres e André Almeida por serem os melhores “Gnus” para todos os momentos. Um obrigado em especial às “Lindérrimas” Ana Sofia Marques, Beatriz Duarte e Bianca Gama por todo o companheirismo e por acreditarem sempre em mim e no meu potencial, pois sem elas ainda estaria na licenciatura.

Por último e acima de todos, um obrigado à minha família: tios, primos, cunhado, avós, que sempre me apoiaram no meu percurso académico e pessoal e me proporcionaram todas as condições e ambiente para eu poder evoluir como pessoa e como profissional. Obrigado em especial à Mana Mariana, à Mana Mimi, ao Pai Carlos e à minha Mãe Aida.

Resumo

O tempo de fermentação necessário à produção de uma cerveja depende bastante da concentração de um composto em específico, o diacetilo. O diacetilo é um composto que gera um *off-flavour* a manteiga, sendo um subproduto formado durante a fermentação pela levedura, mas que também é eliminado por esta. Como forma de reduzir os custos associados a um prolongamento no tempo de fermentação, num contexto industrial, procurou-se estudar os fatores que influenciam a formação e redução do diacetilo na cerveja.

Esta dissertação teve assim como objetivos os de realizar uma análise ao histórico da empresa, como forma de encontrar as causas que justificassem os altos teores de diacetilo que têm vindo a ser detetados. Com base nesta análise, pretendeu-se propor várias alterações ao fabrico da cerveja que se traduzissem em melhorias significativas no tempo de fermentação, assim como prever o tempo que um determinado mosto demorará até atingir as concentrações aceitáveis de diacetilo. Identificaram-se como potenciais problemas o pH de fabrico do mosto, assim como o teor de azoto aminado livre.

Foram depois realizados dois ensaios em que se reduziu a temperatura de fermentação e o pH do mosto, nos quais se estudou a evolução de vários parâmetros durante a fermentação e que permitiram obter, respetivamente, melhorias de 18,44 h e 51,92 h no tempo total de fermentação necessário. Foi possível compreender que as condições que aumentem a velocidade de fermentação permitem atingir um pico mais rápido da concentração de diacetilo, o que também se traduz numa redução mais rápida deste composto pela levedura, atingindo-se as concentrações pretendidas mais cedo.

Palavras-chave: diacetilo, fermentação, pH, temperatura, cerveja

Abstract

The fermentation time required to produce a beer depends on the concentration of a specific compound, the diacetyl. Diacetyl is a compound that is responsible for a buttery off-flavour and is a by-product of the yeast metabolism during fermentation, which can be also eliminated by the microorganism itself. As a way to reduce the costs associated with an extension of the fermentation time, in an industrial context, it was interesting to study the factors that influence the formation and reduction of diacetyl in beer.

The goal of this dissertation was to carry out an analysis of the company's history, in order to discover the causes that justify the high levels of diacetyl that have been reported. Based on this analysis, several changes were proposed in the beer production that would turn into improvements in the fermentation time, as well as predict the time that a certain wort will take to reach the acceptable diacetyl level. The pH of the wort, as well as the content of free amino nitrogen, were identified as potential problems.

Two trials were then carried out in which the temperature of fermentation and the pH of the wort were reduced, and the evolution of several parameters during the fermentation was monitored, and allowed improvements, respectively, of 18.44 h and 51.92 h in total fermentation time required. It was possible to understand that the conditions that increase the fermentation rate are beneficial, since they allowed to reach a faster peak on the diacetyl concentration, which also reflected in a faster reduction of this compound by the yeast, reaching the desired concentrations earlier.

Keywords: diacetyl, fermentation, pH, temperature, beer

Índice de Matérias

1	Enquadramento introdutório	1
2	Caraterização da empresa.....	3
2.1	Sociedade Central de Cervejas, S. A.....	3
2.1.1	Apresentação da empresa	3
2.1.2	Enquadramento histórico.....	3
2.1.3	Marcas e produtos	4
2.1.4	Instalações fabris	6
3	Revisão bibliográfica.....	7
3.1	Cerveja	7
3.1.1	Definição	7
3.1.2	Enquadramento histórico.....	7
3.1.3	Estilos de cerveja.....	9
3.1.3.1	Cervejas <i>Ale</i>	9
3.1.3.2	Cervejas <i>Lager</i>	10
3.1.3.3	Cervejas <i>Lambic</i>	11
3.1.4	Tipos de cerveja.....	11
3.1.5	Consumo de cerveja	12
3.1.6	Matérias primas	14
3.1.6.1	Água	14
3.1.6.2	Malte.....	15
3.1.6.3	Adjuntos	17
3.1.6.4	Lúpulo	18
3.1.6.5	Auxiliares tecnológicos	20
3.1.6.5.1	Auxiliares para controlo do pH e nutrição da levedura	21
3.1.6.5.2	Enzimas	21
3.1.6.5.3	Auxiliares de filtração	22
3.1.6.5.4	Outros auxiliares.....	23
3.1.6.6	Levedura.....	23

3.2	Processo de produção da cerveja.....	24
3.2.1	Maltagem.....	24
3.2.1.1	Receção e armazenamento	25
3.2.1.2	Demolha	25
3.2.1.3	Germinação	26
3.2.1.4	Secagem ou <i>Kilning</i>	27
3.2.1.5	Desradiculagem	27
3.2.2	Brassagem (Fabricação de Mosto)	28
3.2.2.1	Moagem.....	28
3.2.2.2	Mistura.....	28
3.2.2.3	Empastagem	29
3.2.2.4	Caldas	31
3.2.2.5	Filtração do mosto	32
3.2.2.6	Fervura.....	33
3.2.2.7	Clarificação do mosto.....	33
3.2.2.8	Arrefecimento.....	34
3.2.3	Fermentação	34
3.2.3.1	<i>Pitching</i> e Arejamento.....	35
3.2.3.2	Tipos de fermentadores	36
3.2.3.3	Fermentação primária.....	37
3.2.3.3.1	Consumo do oxigénio.....	38
3.2.3.3.2	Metabolização dos açúcares	39
3.2.3.3.3	Absorção dos compostos nitrogenados.....	41
3.2.3.4	Descanso do diacetilo	43
3.2.3.5	Centrifugação	44
3.2.4	Maturação.....	44
3.2.5	Filtração.....	44
3.2.6	Pasteurização e Enchimento	45
3.3	Formação de <i>flavours</i>	45

3.3.1	Álcoois superiores	46
3.3.2	Ésteres	46
3.3.3	Dióxido de enxofre.....	47
3.3.4	Diacetilo e 2,3-pentanodiona.....	47
3.3.4.1	Mecanismo de formação e degradação.....	48
3.3.4.2	Importância da concentração de FAN e da valina.....	50
3.3.4.3	Influência do pH.....	52
3.3.4.4	Influência da temperatura	52
3.3.4.5	Influência da levedura	53
3.3.4.6	Engenharia genética e adição de enzimas.....	55
3.3.5	<i>Off-flavours</i>	56
3.4	Enquadramento teórico dos métodos aplicados	56
3.4.1	Medição do extrato.....	57
3.4.1.1	Extrato primitivo, real e aparente	57
3.4.1.2	Medição do teor de álcool	57
3.4.2	pH.....	57
3.4.3	FAN.....	58
3.4.4	Contagem de células.....	58
3.4.5	Cromatografia gasosa de <i>headspace</i>	58
3.5	Objetivos	59
4	Metodologia	61
4.1	Identificação do problema.....	61
4.2	Análise do histórico de resultados.....	62
4.2.1	Matrizes - Cervejas Sagres	63
4.3	Amostragem	63
4.3.1	Amostra de mosto arrefecido.....	63
4.3.2	Amostra de mosto em fermentação	64
4.4	Análises laboratoriais	64
4.4.1	Contagem de células mortas em suspensão.....	65

4.4.2	Contagem total de células em suspensão.....	65
4.4.3	Viabilidade da levedura.....	66
4.4.4	pH, extrato primitivo, extrato aparente e teor alcoólico.....	66
4.4.5	Atenuação limite aparente.....	66
4.4.6	FAN.....	67
4.4.7	Determinação da concentração de dicetonas vicinais.....	68
4.4.7.1	Determinação da quantidade de diacetilo, 2,3-pentanodiona e seus precursores.....	68
4.4.7.2	Determinação da quantidade de diacetilo e 2,3-pentanodiona.....	69
4.5	Análise e comparação das curvas de fermentação.....	69
5	Abordagem experimental.....	71
5.1	Análise do histórico de resultados.....	71
5.1.1	Análise da concentração de diacetilo nas fermentações.....	71
5.1.2	Análise da concentração de diacetilo em guarda e no produto acabado.....	76
5.1.3	Relação entre o diacetilo e o tempo total de fermentação.....	79
5.1.4	Relação entre o diacetilo e o tempo até ao <i>Ruh</i>	82
5.1.5	Relação entre o diacetilo e o tempo de <i>Ruh</i>	83
5.1.6	Relação entre o diacetilo e o tempo de permanência da levedura.....	86
5.1.7	Relação entre o diacetilo e a taxa de arejamento do mosto.....	88
5.1.8	Relação entre o diacetilo e a taxa de multiplicação da levedura.....	89
5.1.9	Relação entre o diacetilo e a viabilidade da levedura.....	91
5.1.10	Relação entre o diacetilo e o fermentador.....	92
5.1.10.1	Diacetilo por fermentador.....	93
5.1.10.2	Taxa de multiplicação da levedura por fermentador.....	96
5.1.11	Relação entre o diacetilo e a geração da levedura.....	98
5.1.11.1	Diacetilo por geração.....	98
5.1.11.2	Viabilidade por geração.....	101
5.1.11.3	Tempo de fermentação por geração.....	103
5.1.11.4	Porcentagem de redução do diacetilo por geração.....	104

5.1.12	Estimativa das percentagens médias de redução do diacetilo	105
5.1.12.1	Previsão da curva de diacetilo	107
5.1.13	Análise dos parâmetros de fabrico do mosto.....	111
5.1.14	Relação entre o diacetilo e o pH em guarda e no produto final.....	115
5.2	Propostas para melhoria do problema	119
5.3	Análise dos ensaios realizados	123
5.3.1	Primeiro ensaio - Redução da temperatura de fermentação	125
5.3.1.1	Evolução do extrato aparente	125
5.3.1.2	Evolução da percentagem de álcool	127
5.3.1.3	Evolução do FAN.....	128
5.3.1.4	Evolução do pH.....	130
5.3.1.5	Evolução da população e viabilidade da levedura.....	131
5.3.1.6	Evolução do diacetilo e do α -acetolactato	137
5.3.1.7	Evolução da concentração de 2,3-pentanodiona.....	143
5.3.1.8	Evolução da razão diacetilo/2,3-pentanodiona.....	144
5.3.2	Segundo ensaio - Redução do pH do mosto	145
5.3.2.1	Evolução do extrato aparente	145
5.3.2.2	Evolução da percentagem de álcool	147
5.3.2.3	Evolução do FAN.....	148
5.3.2.4	Evolução do pH.....	149
5.3.2.5	Evolução da população e viabilidade da levedura.....	151
5.3.2.6	Evolução do diacetilo e do α -acetolactato	156
5.3.2.7	Evolução da concentração de 2,3-pentanodiona.....	161
5.3.2.8	Evolução da razão diacetilo/2,3-pentanodiona.....	162
5.3.3	Validação dos ensaios	163
5.3.3.1	Teste sensorial	163
5.3.3.2	Ensaio industriais	164
6	Conclusões	167
	Bibliografia	169

Anexo 177

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Logótipos das empresas: a) Sociedade Central de Cervejas, S.A.; b) <i>Heineken International</i> , S.A./N.V.....	3
Figura 2.2 – Marcas e tipos de cervejas e sidras produzidos e distribuídos pela SCC, da esquerda para a direita: Sagres Branca, Sagres Preta, Sagres 0.0, <i>Heineken</i> , <i>Heineken</i> 0.0; Bandida do Pomar, <i>Strongbow</i>	6
Figura 2.3 – Vista aérea das instalações fabris da fábrica da Vialonga. Legenda: 1 – Malteria; 2 – Brassagem; 3 – Adegas e Fermentadores; 4 – Filtração e Recuperação de CO ₂ ; 5.1 – Linhas de enchimento 1 a 6; 5.2 – Linha de enchimento R; 5.3 – Linha de enchimento de barris; 6 – Armazém de produto acabado; 7 – Estação de tratamento de efluentes; 8 – Edifício administrativo, balneários e cantina; 10 – Laboratórios. Adaptado de SCC (2020f).....	6
Figura 3.1 - Origem geográfica de cada uma das três categorias de cerveja, consoante o tipo de levedura utilizada.	9
Figura 3.2 - Estruturas químicas do α -ácido humulona (a) e do iso- α -ácido isohumulona (b) ...	19
Figura 3.3 - Tina de demolha da cevada	26
Figura 3.4 - Caixa de germinação do malte.....	26
Figura 3.5 – Caldeira de empastagem do mosto	30
Figura 3.6 – Filtro de placas para mosto	32
Figura 3.7 – Fermentadores cilíndricos	37
Figura 3.8 – Glicólise de acordo com a via Embden-Meyerhof-Parnas. Adaptado de Nelson & Cox (2017). Legenda de cores: vermelho – enzimas envolvidos na via; verde – substratos envolvidos na via; azul – cofatores envolvidos na via.	40
Figura 3.9 – Estrutura química do diacetilo (a) e da 2,3-pentanodiona (b).....	47
Figura 3.10 – Via metabólica da síntese da valina e da leucina, com formação e redução do diacetilo e da 2,3-pentanodiona na levedura <i>Saccharomyces</i> spp.. AHA – acetohidroxiácido; DHA – dihidroxiácido; BCAA – <i>branched chain aminoacid</i> (aminoácido de cadeia ramificada). Adaptado de Krogerus & Gibson (2013).	49
Figura 5.1 - Distribuição das concentrações de diacetilo (ppb) aos 7º e 8º dias nas fermentações realizadas em 2019 para Sagres Branca e Sagres Preta: a) Diacetilo ao 7º dia em Sagres Branca; b) Diacetilo ao 8º dia em Sagres Branca; c) Diacetilo ao 7º dia em Sagres Preta; d) Diacetilo ao 8º dia em Sagres Preta.	72
Figura 5.2 - Distribuição das concentrações de diacetilo (ppb) aos 7º (vermelho) e 8º (azul) dias nas fermentações realizadas em 2019 para: a) Sagres Branca; b) Sagres Preta	74
Figura 5.3 - Distribuição da concentração de diacetilo (ppb) das amostras analisadas, em 2019, no laboratório, de: a) guarda Sagres Branca; b) produto acabado Sagres Branca; c) produto acabado Sagres Preta.....	77

Figura 5.4 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e o tempo de fermentação necessário (h) das várias fermentações realizadas em 2019 em: a) Sagres Branca ao 7º dia; b) Sagres Branca ao 8º dia; c) Sagres Preta ao 7º dia; d) Sagres Preta ao 8º dia.....	80
Figura 5.5 – Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e o tempo até ao <i>Ruh</i> (h) para as várias fermentações realizadas em 2019 em: a) Sagres Branca ao 7º dia; b) Sagres Branca ao 8º dia; c) Sagres Preta ao 7º dia; d) Sagres Preta ao 8º dia.....	82
Figura 5.6 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e o tempo de <i>Ruh</i> necessário (h) para as várias fermentações realizadas em 2019 em: a) Sagres Branca ao 7º dia; b) Sagres Branca ao 8º dia; c) Sagres Preta ao 7º dia; d) Sagres Preta ao 8º dia.....	84
Figura 5.7 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e o tempo de permanência total da levedura (h) para as várias fermentações realizadas em 2019 em: a) Sagres Branca ao 7º dia; b) Sagres Preta ao 7º dia	86
Figura 5.8 - Relação entre a concentração de diacetilo ao 7º dia (ppb) e a taxa de oxigenação do mosto (ppm) para as fermentações realizadas entre 2 de setembro e 1 de dezembro de 2019 em Sagres Branca.....	88
Figura 5.9 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e a taxa de multiplicação da levedura para as várias fermentações realizadas em 2019 em: a) Sagres Branca ao 7º dia; b) Sagres Preta ao 7º dia.....	89
Figura 5.10 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e a viabilidade da levedura inoculada (%) para as várias fermentações realizadas em 2019 em: a) Sagres Branca ao 7º dia; b) Sagres Preta ao 7º dia.....	91
Figura 5.11 - Relação entre a concentração de diacetilo ao 7º dia (ppb) e o fermentador (CC1 a CC12) onde foi realizada a fermentação para as várias fermentações de Sagres Branca realizadas em 2019: a) Valores absolutos de diacetilo; b) Valores médios de diacetilo e respetivos desvios padrão.....	93
Figura 5.12 - Relação entre a concentração de diacetilo ao 7º dia (ppb) e o fermentador onde foi realizada a fermentação para as várias fermentações de Sagres Preta realizadas em 2019: a) Valores absolutos de diacetilo; b) Valores médios de diacetilo e respetivos desvios padrão	95
Figura 5.13 - Relação entre a taxa de multiplicação da levedura e o fermentador onde foi realizada a fermentação para as várias fermentações de Sagres Branca realizadas em 2019: a) Valores absolutos da taxa de multiplicação da levedura; b) Valores médios da taxa de multiplicação da levedura e respetivos desvios padrão	97
Figura 5.14 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e a geração da levedura inoculada para as várias fermentações de Sagres Branca realizadas em 2019: a) valores absolutos ao 7º dia; b) valores médios e respetivo desvio padrão ao 7º dia; c) valores absolutos ao 8º dia; d) valores médios e respetivo desvio padrão ao 8º dia.....	99

Figura 5.15 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e a geração da levedura inoculada para as várias fermentações de Sagres Preta realizadas em 2019: a) valores absolutos ao 7º dia; b) valores médios e respetivo desvio padrão ao 7º dia; c) valores absolutos ao 8º dia; d) valores médios e respetivo desvio padrão ao 8º dia.....	101
Figura 5.16 - Relação entre a viabilidade média (e desvios padrão) da levedura inoculada (%) e a geração da levedura inoculada para as várias fermentações realizadas em 2019 em: a) Sagres Branca; b) Sagres Preta	102
Figura 5.17 - Relação entre o tempo de fermentação médio (e desvios padrão) total (h) e a geração da levedura inoculada para as várias fermentações realizadas em 2019 em: a) Sagres Branca; b) Sagres Preta.....	103
Figura 5.18 - Relação entre a percentagem média (e desvios padrão) de redução do diacetilo entre o 7º e 8º dias (%) e a geração da levedura inoculada para as várias fermentações realizadas em 2019 em: a) Sagres Branca; b) Sagres Preta.....	104
Figura 5.19 – Relação entre a percentagem média (e desvio padrão) de redução do diacetilo (%) em cada dia para as várias fermentações realizadas em 2019 de: a) Sagres “Branca; b) Sagres Preta.....	106
Figura 5.20 – Curvas previstas de redução do diacetilo e respetivas curvas de regressão e coeficientes de determinação com base nos valores médios de diacetilo ao 7º dia das fermentações realizadas em 2019 de: a) Sagres Branca; b) Sagres Preta.....	108
Figura 5.21 - Previsão da curva de diacetilo e dos valores de diacetilo (ppb) esperados entre os 8º e 12º dias, em Sagres Branca, com base na concentração de diacetilo ao 7º dia; exemplo para concentração de 900 ppb ao 7º dia	110
Figura 5.22 - Previsão da curva de diacetilo e dos valores de diacetilo (ppb) esperados entre os 8º e 12º dias, em Sagres Preta, com base na concentração de diacetilo ao 7º dia; exemplo para concentração de 400 ppb ao 7º dia	111
Figura 5.23 - Distribuição do pH das amostras analisadas no laboratório em 2019 de: a) guarda Sagres Branca; b) produto acabado Sagres Branca; c) produto acabado Sagres Preta.....	116
Figura 5.24 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e o pH das amostras analisadas em 2019 em: a) guarda de Sagres Branca; b) produto acabado de Sagres Branca; c) produto acabado de Sagres Preta	118
Figura 5.25 – Evolução do comportamento do extrato aparente (°P) ao longo do tempo nas fermentações dos: a) controlos; b) ensaios.....	125
Figura 5.26 – Evolução do comportamento da percentagem de álcool (% v/v) ao longo do tempo nas fermentações dos: a) controlos; b) ensaios	127
Figura 5.27 – Evolução do comportamento do teor de FAN (mg/L) ao longo do tempo nas fermentações dos: a) controlos; b) ensaios.....	129

Figura 5.28 – Evolução do comportamento do pH ao longo do tempo nas fermentações dos: a) controles; b) ensaios.....	130
Figura 5.29 - Evolução ao longo da fermentação da população em suspensão de células (células/mL): a) totais nos controles; b) totais nos ensaios; c) viáveis nos controles; d) viáveis nos ensaios; e) não viáveis nos controles; f) não viáveis nos ensaios	132
Figura 5.30 – Evolução do comportamento da viabilidade (%) ao longo do tempo nas fermentações dos: a) controles; b) ensaios.....	135
Figura 5.31 – Evolução da concentração (ppb) de diacetil total (diacetil + α -acetolactato), diacetil livre e α -acetolactato ao longo das fermentações do: a) controlo 1; b) ensaio 1; c) controlo 2; d) ensaio 2; e) controlo 3; f) ensaio 3	138
Figura 5.32 – Comparação entre as curvas de diacetil e o momento em que atingem o limite máximo de 120 ppb de diacetil entre: a) controlo 1 e ensaio 1; b) controlo 2 e ensaio 2; c) controlo 3 e ensaio 3.....	141
Figura 5.33 - Comparação entre as curvas de 2,3-pentanodiona do: a) controlo 1 e ensaio 1; b) controlo 2 e ensaio 2; c) controlo 3 e ensaio 3	143
Figura 5.34 - Evolução das médias das razões diacetil/2,3-pentanodiona ao longo do tempo de fermentação nos: a) controles; b) ensaios	144
Figura 5.35 - Evolução do comportamento do extrato aparente (°P) e da temperatura (°C) ao longo das fermentações dos: a) controlo 1 e ensaio 1; b) controlo 2 e ensaio 2.....	146
Figura 5.36 – Evolução da percentagem de álcool (%v/v) e da temperatura (°C) ao longo das fermentações dos: a) controlo 1 e ensaio 1; b) controlo 2 e ensaio 2.....	147
Figura 5.37 – Evolução do teor de FAN (mg/L) e da temperatura (°C) ao longo das fermentações dos: a) controlo 1 e ensaio 1; b) controlo 2 e ensaio 2	148
Figura 5.38 – Evolução do pH e da temperatura (°C) ao longo das fermentações dos: a) controlo 1 e ensaio 1; b) controlo 2 e ensaio 2	150
Figura 5.39 – Evolução ao longo da fermentação da temperatura (°C) e da população em suspensão de células (células/mL): a) totais no controlo 1 e ensaio 1; b) totais no controlo 2 e ensaio 2; c) viáveis no controlo 1 e ensaio 1; d) viáveis no controlo 2 e ensaio 2; e) não viáveis no controlo 1 e ensaio 1; f) não viáveis no controlo 2 e ensaio 2.....	152
Figura 5.40 - Evolução da percentagem de viabilidade (%) e da temperatura (°C) ao longo das fermentações dos: a) controlo 1 e ensaio 1; b) controlo 2 e ensaio 2.....	154
Figura 5.41 - Evolução da temperatura (°C) e da concentração (ppb) de diacetil total (diacetil + α -acetolactato), diacetil livre e α -acetolactato ao longo das fermentações do: a) controlo 1; b) ensaio 1; c) controlo 2; d) ensaio 2	156
Figura 5.42 – Comparação entre as curvas de diacetil total (ppb) e o momento em que atinge o limite máximo de 120 ppb de diacetil, assim como a evolução da temperatura (°C), nas fermentações dos: a) controlo 1 e ensaio 1; b) controlo 2 e ensaio 2.....	159

Figura 5.43 - Comparação entre as curvas de 2,3-pentanodiona total (ppb) e o momento em que se atinge o limite máximo de 1000 ppb de 2,3-pentanodiona, assim como a evolução da temperatura (°C), nas fermentações dos: a) controlo 1 e ensaio 1; b) controlo 2 e ensaio 2..... 162

Figura 5.44 - Evolução das médias das razões diacetilo/2,3-pentanodiona ao longo do tempo de fermentação nos controlos e ensaios 163

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Iões presentes na água utilizada para o fabrico da cerveja e respetivos efeitos no flavour da cerveja e no metabolismo da levedura.	16
Tabela 3.2 – Divisão dos aminoácidos (e amónia) do mosto por grupos de acordo com a velocidade de absorção da levedura, tal como proposto por Jones & Pierce (1964).	42
Tabela 3.3 - Divisão dos aminoácidos do mosto por classes de acordo com a importância para o metabolismo da levedura, tal como proposto por Pierce (1987).	43
Tabela 4.1 - Parâmetros e respetivos valores definidos para a corrida das amostras em cromatografia gasosa.	69
Tabela 5.1 - Valores médios de concentração do diacetilo (ppb) em guarda e no produto final para as cervejas Sagres Branca e Sagres Preta, com respetivos desvios padrão, número de amostras analisadas, intervalo de datas da colheita das amostras, limites e desvios ao limite. A sombreado vermelho encontram-se as médias com valores superiores aos dos limites máximos (em produto final) ou aos do limite controlo (guarda).....	76
Tabela 5.2– Valores médios de diacetilo ao 7º dia para as fermentações de Sagres Branca realizadas em cada um dos fermentadores (cónicas) e respetivos desvios padrão, desvio em percentagem e número de fermentações (n) realizadas.....	94
Tabela 5.3 - Valores médios de diacetilo ao 7º dia para as fermentações de Sagres Preta realizadas em cada um dos fermentadores e respetivos desvios padrão, desvio em percentagem e número de fermentações (n) realizadas.....	96
Tabela 5.4 - Valores médios da taxa de multiplicação da levedura para as fermentações de Sagres Branca realizadas em cada um dos fermentadores e respetivos desvios padrão, desvio em percentagem e número de fermentações (n) realizadas.....	97
Tabela 5.5 - Valores médios da concentração de diacetilo (ppb), ao 7º e 8º dias, para cada geração de levedura utilizada e respetivos desvios padrão, desvio em percentagem e número de fermentações (n) realizadas de Sagres Branca.....	99
Tabela 5.6 – Percentagens médias, desvios padrão e desvios em percentagem de redução do diacetilo entre cada dia para as cervejas Sagres Branca e Sagres Preta.....	105
Tabela 5.7 – Valores médios de diacetilo previstos (ppb) em cada dia para Sagres Branca e Sagres Preta.....	108
Tabela 5.8 – Previsão dos valores de diacetilo (ppb) esperados entre os 8º e 12º dias, para Sagres Branca, com base na concentração de diacetilo ao 7º dia, assim como o dia previsto em que se atinge o limite máximo de diacetilo admitido; exemplo para concentração de 900 ppb ao 7º dia; a amarelo encontra-se a caixa na qual deve ser inserida a concentração de diacetilo.....	109
Tabela 5.9 - Previsão dos valores de diacetilo (ppb) esperados entre os 8º e 12º dias, para Sagres Preta, com base na concentração de diacetilo ao 7º dia, assim como o dia previsto em que se atinge	

o limite máximo de diacetilo admitido; exemplo para concentração de 400 ppb ao 7º dia; a amarelo encontra-se a caixa na qual deve ser inserida a concentração de diacetilo.....	110
Tabela 5.10 – Valores médios de extrato (°P), pH, atenuação limite aparente (%) e FAN (mg/L) e respectivos limites inferior e superior, desvios padrão, número de fabricos analisados e data de colheita de várias amostras de mosto de Sagres Branca e Sagres Preta. A sombreado vermelho encontram-se as médias com valores superiores ou muito próximos dos limites definidos.	112
Tabela 5.11 – Viabilidades da levedura inoculada, viabilidades da levedura após fermentação, diferença entre as duas viabilidades e média da diferença para os vários controlos e ensaios analisados (Ensaio de redução da temperatura de fermentação).....	136
Tabela 5.12 – Tempo (h) ao qual as fermentações atingiram o limite máximo de 120 ppb de diacetilo, melhoria (h) observada entre os ensaios e os controlos, e melhoria média (h) que se obteve no tempo de fermentação entre os ensaios e os controlos.	142
Tabela 5.13 – Viabilidades da levedura inoculada, viabilidades da levedura após fermentação, diferença entre as duas viabilidades e média da diferença para os vários controlos e ensaios analisados (Ensaio de redução do pH)	155
Tabela 5.14 – Tempos de fermentação (h) ao qual as fermentações atingiram o limite máximo de 120 ppb de diacetilo, melhoria (h) observada entre os ensaios e os controlos, e melhoria média (h) que se obteve no tempo de fermentação entre os ensaios e os controlos.....	160
Tabela A.1 – Médias, desvios padrão absolutos e em percentagem, mediana e contagem, para Sagres Branca e Sagres Preta, dos parâmetros: tempo de enchimento do fermentador (h:min:s), tempo até início de <i>Ruh</i> (h:min:s), tempo de permanência da levedura em <i>Ruh</i> (h:min:s), permanência total da levedura (h:min:s), tempo de <i>Ruh</i> (h:min:s), tempo do golpe de frio (h:min:s), tempo total até ao golpe de frio (h:min:s), tempo total no fermentador (h:min:s), taxa de multiplicação da levedura, viabilidade da levedura e concentrações de diacetilo dos 7º ao 15º dias	177

Lista de Abreviaturas e Siglas

AHA – Acetohidroxiácido

ALA – Atenuação limite aparente

Am – Média dos triplicados das absorvências da amostra de mosto

ASBC – *American Society of Brewing Chemists*

At – Média dos triplicados das absorvências da testemunha

BCAA – Aminoácido de cadeia ramificada (*Branched Chain Aminoacid*)

CC – Cilindrocónica

CIP – *Clean-In-Place*

CO₂ – Dióxido de carbono

DHA – Dihidroxiácido

DMS – Dimetilsulfito

EAMAF – Extrato aparente do mosto após fermentação

EBC – *European Brewery Company*

EPM – Extrato primitivo do mosto

FAN – Azoto aminado livre (*Free Amino Nitrogen*)

IBD ou IoB - *Institute of Brewing and Distilling*

IKE – *Isomerized Kettle Extract*

IPA – *India Pale Ale*

MEBAK – *Methodensammlung der Mitteleuropaischen Brautechnischen Analysen Kommission*

NDMA – N-nitrosodimetilamina

OT – Fermentador *Asahi*

ppb – Partes por milhar de milhão

r² – Coeficiente de determinação

SCC – Sociedade Central de Cervejas, S.A.

SH – Solução *stock* de 2,3-hexanodiona

SO₂ – Dióxido de enxofre

TPHI – Solução de trabalho de padrão interno de 2,3-hexanodiona

VDK – Diketonas vicinais (*Vicinal Diketones*)

1 Enquadramento introdutório

O diacetilo é um composto que gera um *off-flavour* a manteiga, que não é pretendido na cerveja. A evolução da formação e degradação deste composto ao longo da fermentação é muito importante, uma vez que a concentração do diacetilo determina o momento em que se pode terminar a fermentação da cerveja. Vários estudos foram publicados acerca dos fatores que influenciam o diacetilo. No entanto, poucos estudos foram realizados num contexto industrial, onde é mais difícil controlar todas as condições da fermentação.

Uma vez que a empresa tem vindo a apresentar sucessivas dificuldades em reduzir os tempos de fermentação devido a este composto, surgiu como oportunidade de dissertação o de estudar os fatores que influenciam a formação e redução do diacetilo na fermentação, como forma de sugerir possíveis alterações na produção da cerveja, que melhorassem este indicador. A redução do tempo de fermentação permite, não só a redução dos custos associados ao processo, como também permite libertar o fermentador mais cedo, aumentando a capacidade de produção da empresa. Pretendeu-se também prever o comportamento do diacetilo ao longo do tempo e fazer uma estimativa do momento em que se pode interromper a fermentação.

Para tal, numa primeira fase, foi analisado o histórico de dados da empresa, de forma se identificarem correlações entre o diacetilo e certos parâmetros. Procurou-se também identificar potenciais desvios aos valores padronizados para o fabrico do mosto, com influência no diacetilo.

Numa segunda fase, pela análise do histórico, realizou-se uma curva de previsão da evolução do diacetilo ao longo do tempo, com base na concentração deste composto ao 7º dia de fermentação, prevendo-se a data de conclusão da fermentação.

Por último, foram realizados dois ensaios que permitiram estudar a influência da redução da temperatura de fermentação e da redução do pH, não só no diacetilo, como noutros parâmetros, obtendo-se melhorias consideráveis no tempo total de fermentação.

2 Caraterização da empresa

2.1 Sociedade Central de Cervejas, S. A.

2.1.1 Apresentação da empresa

A Sociedade Central de Cervejas, S. A. (SCC) (Figura 2.1-a)) é uma grande empresa portuguesa presente no mercado nacional desde 1934. Dedicar-se principalmente à produção e distribuição de cerveja, sidra, águas e refrigerantes, ao nível nacional. Desde 2008, a empresa é detida pelo Grupo Internacional *Heineken* (Figura 2.1-b)) (SCC, 2020a).

Na sua sede, a fábrica de cerveja da Vialonga, situada no concelho de Vila Franca de Xira, não só é produzido e comercializado malte, como se produzem e engarrafam marcas de cerveja como Sagres e *Heineken*, e as suas variantes, e também outras bebidas como as sidras Bandida do Pomar e *Strongbow*. Já na sua unidade industrial da Vacariça, no concelho da Mealhada, são captadas e engarrafadas águas de nascente e minerais como as Luso e Cruzeiro. A empresa detém ainda a NOVADIS, uma empresa de distribuição de bebidas, a *Hoppy House Brewing*, uma *start-up* focada na produção de cervejas artesanais, e, mais recentemente, a marca Água Castello (SCC, 2020b).

Presidida desde 2019 por Boris Miloushev, a SCC tem como visão a de, em equipa, produzir as marcas que as pessoas preferem e adoram beber. A SCC ambiciona ser uma empresa líder na satisfação dos clientes e consumidores, sempre tendo em conta a segurança dos seus produtos e dos seus colaboradores, a economia, uma gestão eficiente de recursos e a sustentabilidade da sua produção (SCC, 2020a).

a)



b)



Figura 2.1 – Logótipos das empresas: **a)** Sociedade Central de Cervejas, S.A.; **b)** *Heineken International*, S.A./N.V.

2.1.2 Enquadramento histórico

Em 1934 surge a SCC, criada pela associação de quatro antigas cervejeiras: a Companhia Produtora de Malte e Cerveja Portugália, a Companhia de Cervejas Estrela, a Companhia de Cervejas Coimbra e a Companhia da Fábrica de Cerveja *Jansen*. Em 1935, funde-se também a Fábrica de Cervejas Trindade e a sua cervejaria. Estavam então criadas as bases do que viria a ser a maior empresa a nível nacional de produção e comercialização de cerveja (SCC, 2020a; SCC, 2020c).

Em 1940, no contexto da realização da Exposição do Mundo Português, a SCC lança no mercado a cerveja Sagres, até hoje a mais popular deste grupo a nível nacional. Em 1941, surge

a cerveja Imperial que até hoje se introduziu no vocabulário português como sinónimo de cerveja de barril servida a copo (SCC, 2020c).

Em 1968, é inaugurada a Fábrica da Vialonga, a maior unidade fabril do país dedicada à produção de cerveja, com capacidade anual de produção, na altura, de 110 milhões de litros de cerveja, 21 milhões de litros de refrigerantes e 50 mil toneladas de malte. A fachada da fábrica foi assinada por Eduardo Nery, um conceituado artista plástico português (SCC, 2020c).

Em 1975, a empresa é nacionalizada. Já em 1977, a empresa é fundida com a Cergal, dando origem à Centralcer – Central de Cervejas. Após isto, segue-se uma grave crise financeira na empresa durante os anos 80, fomentada pela crise económica portuguesa. Em 1989, o governo anuncia a privatização a 100% da empresa, um ponto de viragem económica, disparando as vendas de Sagres. No ano seguinte, o Grupo Empresarial Bavaria adquire uma grande participação da empresa. Já em 1993, a SCC inicia o seu apoio à Seleção Nacional Portuguesa, que mantém até hoje (SCC, 2020c).

Em 1999, um novo ponto de viragem ocorre, pois a *Scottish & Newcastle*, um dos maiores grupos cervejeiros europeus, adquire 49% da Central de Cerveja. Em 2003, a mesma empresa adquire a totalidade da empresa. Entretanto, em 2001, após uma reestruturação, a empresa assume o atual nome de Sociedade Central de Cervejas, S. A., assumindo nos anos seguintes uma série de inovações e investimentos para a modernização das suas instalações (SCC, 2020c).

Em 2007, um consórcio entre a *Carlsberg* e a *Heineken* leva à aquisição da *Scottish & Newcastle*. Já em 2008, a *Heineken*, uma das maiores empresas cervejeiras internacionais, adquire o controlo total da SCC. Nos anos seguintes, e até à atualidade, a SCC distinguiu-se pelos seus prémios de qualidade e pela constante inovação, com lançamentos de novos produtos todos os anos e afirmando a sua posição de relevo no mercado. A empresa focou-se também na promoção de altos padrões de segurança e qualidade, associando-se a várias causas humanitárias e promovendo um desenvolvimento sustentável a nível ambiental (SCC, 2020c).

Em 2019, ano de início deste estágio, a empresa focou-se sobretudo na expansão dos seus produtos sem álcool, a *Heineken 0.0*, *Sagres 0.0* e *Sagres Radler 0.0*, mercado este em crescimento há vários anos. A *Heineken* manteve a sua liderança no segmento *premium* em Portugal, o segmento das águas engarrafadas continuou em crescimento e as sidras *Strongbow* e *Bandida* do Pomar obtiveram um crescimento de 22% em volume, o que confirmou a qualidade e importância desta empresa no setor nacional (SCC, 2020d).

2.1.3 Marcas e produtos

A SCC é uma empresa líder no mercado português, focada na inovação constante dos seus produtos. Esta empresa não só é responsável pela produção e distribuição de marcas nacionais, como também de marcas internacionais de grande renome (Figura 2.2) (SCC, 2020e):

- **Cervejas Sagres** – surgindo no contexto da Exposição do Mundo Português, a marca Sagres engloba um variado portefólio de cervejas (SCC, 2020e):
 - **Sagres Branca** – criada em 1940, é uma cerveja do estilo *Pilsner*, 100% natural e produzida a partir de água, malte de cevada, cereais não maltados e lúpulo; tem um carácter seco, amargor agradável, é medianamente encorpada e apresenta cor dourada; tem um teor de 5,0% vol. de álcool (SCC, 2020e);
 - **Sagres Preta** – criada em 1940, é uma cerveja do estilo *Munich*, produzida com água, malte de cevada, milho não maltado e extrato de lúpulo; medianamente encorpada e com *flavour* a caramelo, esta cerveja tem uma cor escura e intensa; apresenta um teor alcoólico de 4,1% vol. (SCC, 2020e);
 - **Sagres Radler** – criada em 2013 e baseada numa receita tradicional bávara, a *Radler* surge pela combinação da cerveja Sagres com sumo de limão natural; apresenta um teor alcoólico de 2,0% vol. e um carácter refrescante; mais tarde, o sabor a frutos vermelhos e as versões sem álcool – 0.0 – também foram lançadas (SCC, 2020e);
 - **Sagres 0.0** – criada em 2019, esta cerveja apresenta um teor de álcool de 0,0% vol.; de sabor frutado, com notas de banana e cereais, é produzida com 100% malte, combinando maltes de cevada e de trigo (SCC, 2020e).
- **Cervejas Heineken** – surgindo no século XIX em Amsterdão, a cerveja *Heineken* é das cervejas mais antigas ainda produzidas e também a mais internacional, presente em 170 países (SCC, 2020e):
 - **Heineken** – uma cerveja do estilo *Pilsner*, é produzida a partir de água, malte de cevada e lúpulo; tem um aroma balanceado, com notas frutadas, amargor equilibrado e sabor refrescante; tem um teor de 5,0% vol. de álcool (SCC, 2020e);
 - **Heineken 0.0** – uma cerveja aromática de corpo suave, notas frutadas e com um sabor a malte, esta bebida apresenta um teor alcoólico de 0,0% vol. (SCC, 2020e).
- **Sidras** – a SCC é produtora e distribuidora de duas marcas de sidra no mercado nacional:
 - **Strongbow** – lançada em 1960 na Inglaterra, é fabricada a partir de pequenas maçãs ácidas; tem um teor alcoólico de 4,5% vol. e um sabor doce e refrescante; também se encontra disponível a versão com frutos vermelhos (SCC, 2020e);
 - **Bandida do Pomar** – lançada em 2016 pela SCC, possui um paladar frutado, leve e refrescante, com intenso sabor a maçã e um teor de álcool de 4,5% vol.; é produzida com maçãs ácidas e é destinada a um público jovem (SCC, 2020e).
- **Águas** – a SCC destaca-se também no setor das águas com a Água Mineral Natural Luso, comercializada desde 1894 e rica em sílica, e a Água de Nascente Cruzeiro (SCC, 2020e);
- **Refrigerantes** - em 2001 foram lançados os refrigerantes Luso Frutas, que aliam a qualidade da água Luso com variados sumos de fruta (SCC, 2020e).

- **Cervejas internacionais** – a SCC é ainda a distribuidora a nível nacional de cervejas como a *Desperados*, *Affligem* e a *Guinness* (SCC, 2020e).



Figura 2.2 – Marcas e tipos de cervejas e sidras produzidos e distribuídos pela SCC, da esquerda para a direita: Sagres Branca, Sagres Preta, Sagres 0.0, *Heineken*, *Heineken* 0.0; Bandida do Pomar, *Strongbow*

2.1.4 Instalações fabris

A Fábrica da Vialonga situa-se na Estrada da Alfarrobeira, na antiga freguesia de Vialonga, no concelho de Vila Franca de Xira – Área Metropolitana de Lisboa. O complexo fabril encontra-se dividido por várias áreas, tal como apresentado na Figura 2.2:

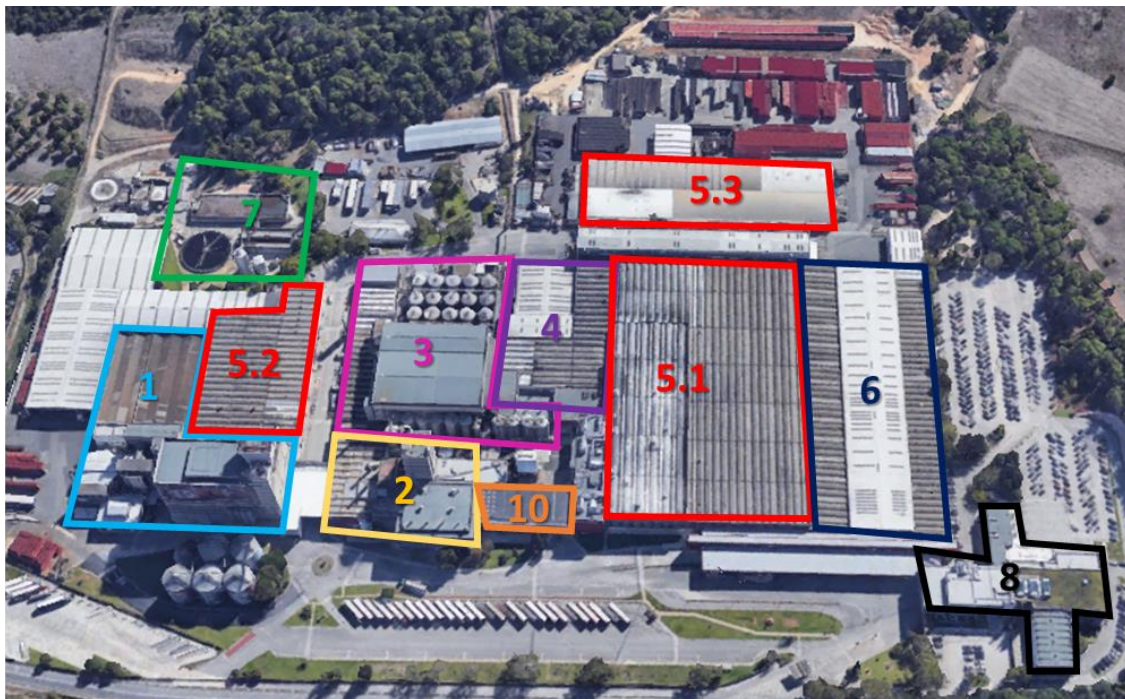


Figura 2.3 – Vista aérea das instalações fabris da fábrica da Vialonga. **Legenda:** 1 – Malteria; 2 – Brassagem; 3 – Adegas e Fermentadores; 4 – Filtração e Recuperação de CO₂; 5.1 – Linhas de enchimento 1 a 6; 5.2 – Linha de enchimento R; 5.3 – Linha de enchimento de barris; 6 – Armazém de produto acabado; 7 – Estação de tratamento de efluentes; 8 – Edifício administrativo, balneários e cantina; 10 – Laboratórios. Adaptado de SCC (2020f).

3 Revisão bibliográfica

3.1 Cerveja

3.1.1 Definição

Segundo a legislação portuguesa, representada pela Portaria 1/96 de 3 de janeiro, e retificada pela Portaria 180/96 de 29 de maio, a cerveja entende-se como “a bebida obtida por fermentação alcoólica, mediante 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 seus derivados e água potável”. De acordo com a mesma Portaria, o produto ao qual se chama de cerveja deve ainda apresentar cor, cheiro e sabor normais, ausência de depósito perceptível e persistente após 24 h em repouso a 20° C, teor de acidez total, após eliminação do dióxido de carbono, igual ou inferior a 3 g/L, expresso em ácido láctico, teor de acidez volátil, por destilação numa corrente de vapor, igual ou inferior a 36 mg por 100 mL de cerveja, expresso em ácido acético, pH no intervalo entre 3,5 e 5 e concentrações de contaminantes abaixo de 1 mg/L para o zinco, 0,3 mg/L para o ferro, 0,2 mg/L para o cobre e chumbo, 0,1 mg/L para o arsénio, e 0,05 mg/L para o cobalto. Podem ainda ser adicionados, a esta bebida, frutos, produtos hortícolas ou plantas aromáticas, ou respetivos sumos e concentrados, assim como os aditivos e auxiliares tecnológicos estabelecidos na lei para o produto, como clarificadores, estabilizadores coloidais e corretores do teor enzimático dos maltes.

3.1.2 Enquadramento histórico

Os primeiros achados arqueológicos que confirmam a utilização de misturas de cereais com frutas para produção alcoólica foram encontrados na China e estão datados de 7000 a.C.. No entanto, pensa-se que a produção de cerveja possa ser ainda mais antiga, coincidindo com a revolução Neolítica, há cerca de 10000 anos. Foi neste período que o ser humano se tornou sedentário e em que surgiu a necessidade de produzir e guardar cereais, sendo o produto da fermentação de grãos descoberto por acaso (Meusdoerffer, 2009; Pires & Brányik, 2015; Cabras & Higgins, 2016).

Os primeiros textos que referem a produção de cerveja surgem na Mesopotâmia, estando datados de cerca de 3000 a.C., e sugerem que a produção cervejeira já era realizada muito antes da invenção da escrita, sendo abundantes os textos que referem a cerveja. Daí, a produção de cerveja espalhou-se para o Egito, onde esta bebida era consumida por elementos de todos os estratos sociais (Meusdoerffer, 2009; Barth, 2013). Aqui, o salário era pago em cereais, que serviam para a produção das duas bases da dieta egípcia da época: o pão e a cerveja (Cabras & Higgins, 2016).

Com a conquista grega do Egito, o vinho, produto consumido pelas classes altas, foi introduzido nesta área, passando a cerveja a ser vista como a bebida dos povos bárbaros e não civilizados. A conquista romana propagou este conceito a todo o império, onde os povos

subjugados consumiam principalmente a cerveja. No entanto, as técnicas cervejeiras aprendidas com os egípcios permitiram aos romanos desenvolver a sua produção cervejeira e estabelecê-la em regiões onde não era possível o cultivo da vinha, nomeadamente em locais mais frios do Norte da Europa. Com a queda do Império Romano e as invasões dos povos germânicos, a cerveja voltou a tomar o papel de bebida principal na Europa (Meussdoerffer, 2009; Pires & Brányik, 2015; Cabras & Higgins, 2016).

As primeiras cervejarias surgem com os mosteiros nórdicos por volta do século IX. Estes mosteiros, situados em locais que não permitiam a produção vitivinícola, possuíam produção própria de cerveja para os seus monges, assim como para peregrinos, ou para venda nos *pubs* dos mosteiros (Pires & Brányik, 2015; Cabras & Higgins, 2016). Foi nesta altura que também surgiram os primeiros relatos de utilização do lúpulo em mosteiros em França e na Alemanha. O lúpulo não só foi utilizado como um conservante, evitando a degradação da cerveja, como também conferia sabor e amargor a esta bebida. Assim, este foi aplicado como alternativa ao *Gruit* – uma mistura de ervas utilizadas até então para conferir sabor e longevidade à cerveja, e que era um produto altamente taxado pela nobreza (Barth, 2013; Cabras & Higgins, 2016).

Com o crescimento e desenvolvimento da produção de cerveja, esta tornou-se um produto facilmente taxável, visto que a quantidade produzida por lote era sempre a mesma. A cerveja surgiu então como grande fonte de rendimento para os governos, que implementaram leis de pureza, que estabeleciam quais os ingredientes a utilizar, as tecnologias, os preços, autorizações para produzir, locais de produção, entre outros. Destas leis, a *Reinheitsgebot*, ou Lei da Pureza Bavariana de 1516, implementada por Guilherme IV da Baviera, foi a mais famosa. Esta lei estabeleceu que a cerveja só poderia ser produzida com três ingredientes: malte de cevada, lúpulo e água (sendo a levedura desconhecida na época) (Meussdoerffer, 2009; Barth, 2013).

Durante os séculos XVIII e XIX, a arte cervejeira conheceu um grande desenvolvimento. A aplicação dos novos conhecimentos científicos permitiu a implementação e desenvolvimento de novos equipamentos e tecnologias, como a refrigeração e pasteurização, assim como se pôde perceber a ciência por trás da fermentação. A descoberta da levedura por Pasteur e o controlo de condições como a temperatura, tipos de levedura e tipos de fermentação permitiram a estandardização do produto e a sua produção em massa, assim como a otimização dos rendimentos do mosto, da produção alcoólica e a eliminação de contaminações (Meussdoerffer, 2009; Cabras & Higgins, 2016).

Já nos séculos XX e XXI, a industrialização permitiu que a produção e consumo de cerveja se tornassem globais, deixando esta de estar dependente de condições climáticas favoráveis ou da disponibilidade do malte, mas sim dependente da demanda e do capital possuído. Surgiram também as grandes cervejeiras, responsáveis pela maior parte da quota do mercado (Meussdoerffer, 2009).

3.1.3 Estilos de cerveja

Atualmente, existem centenas de estilos de cerveja classificados, número este que continua a aumentar com a expansão do mercado da cerveja artesanal (Brewers Association, 2020). O facto de existirem estilos principais que são depois subdivididos em outras categorias contribui para a grande diversidade de cervejas que existem. Cada tipo de cerveja difere em certas características, tais como aroma, sabor, nível alcoólico, cor, entre outros. Para isto contribui o facto de se usarem diferentes tipos de lúpulo, cereais, leveduras e condições de fermentação (Gajanan, 2018; Alcohol.org, 2020)

A maior diferença entre os diversos estilos de cerveja tem que ver com o tipo de levedura utilizada. Desta forma podemos subdividir as cervejas em três grandes categorias, com diferentes origens geográficas, tal como representado na Figura 3.1 (Gajanan, 2018; Alcohol.org, 2020):

- *Ale*;
- *Lager*;
- *Lambic*.



Figura 3.1 - Origem geográfica de cada uma das três categorias de cerveja, consoante o tipo de levedura utilizada.

3.1.3.1 Cervejas *Ale*

As cervejas do tipo *Ale* são produzidas com a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e são caracterizadas pelo alto teor em ésteres, que lhes fornecem aromas frutados e adocicados. Esta é uma levedura de alta fermentação, em que as células têm tendência a se aglomerar no topo do fermentador, e em que a fermentação ocorre a temperaturas mais elevadas e mais rapidamente, tendo a levedura maior tolerância a maiores concentrações alcoólicas. Com forte tradição na Inglaterra, a maioria destas cervejas tem as suas raízes nesse local (SCC, 2017; Gujanan, 2018).

Entre as várias subcategorias de cervejas *Ale* (que por sua vez se desdobram noutras categorias), pode-se dar como exemplos as cervejas (SCC, 2019):

- **Porter** – originária da Inglaterra, esta cerveja é produzida com malte chocolate ou outros tipos de malte torrado e grande quantidade de lúpulo, o que lhe confere uma cor escura e um aroma torrado, a café, com amargor médio (Gujanan, 2018; TasteAtlas, 2019a);
- **Stout** – originária da Inglaterra, esta cerveja é produzida com malte e cevada torrados que lhe conferem um aroma a café e chocolate, com leve lupulagem, baixo amargor e sabor doce devido à presença de açúcares não fermentados (Gujanan, 2018; TasteAtlas, 2019b);
- **Pale Ale** – originária da Inglaterra, possui uma cor dourada a âmbar devido ao malte caramelo e malte cristal utilizados para a sua produção; possui um aroma lupulado e maltado e baixo teor alcoólico (Gujanan, 2018; TasteAtlas, 2019c; Alcohol.org, 2020);
- **India Pale Ale (IPA)** – este estilo bem conhecido surge pela necessidade de transportar a cerveja para colônias inglesas longínquas, como a Índia; possuem um alto teor alcoólico e alta lupulagem, o que lhes confere um alto amargor e fortes aromas herbais, cítricos ou frutados; com grande durabilidade (Gujanan, 2018; TasteAtlas, 2019d).

3.1.3.2 Cervejas Lager

As cerveja do tipo *Lager* são produzidas com a levedura da espécie *Saccharomyces pastorianus* e são caracterizadas pelo seu sabor mais límpido e maltado. Esta levedura é de baixa fermentação, ou seja, durante a fermentação e, principalmente, após, as células tendem a flocular e a sedimentar na base do fermentador. A fermentação também ocorre a temperaturas mais baixas, levando a menor formação de ésteres, é mais lenta e a levedura tem menor tolerância ao álcool. Com forte tradição na Alemanha, de onde originaram a maioria dos estilos Lager, este é o tipo de cerveja mais consumido a nível mundial, devido ao seu palato mais suave (SCC, 2017; Gujanan, 2018).

Das várias subcategorias de cervejas Lager, podem-se dar como exemplos as seguintes cervejas (SCC, 2019):

- **American Lager** – originária dos Estados Unidos e criada por imigrantes alemães, esta cerveja possui um sabor neutro, com aroma suave a malte e com baixo amargor e pouco sabor a lúpulo (TasteAtlas, 2020a);
- **European Pale Lager ou Pilsner** – seguindo o modo de produção da *Pale Ale*, surge na Alemanha a *Pale Lager* que será reformulada na República Checa, nascendo a *Pilsner*, o estilo de cerveja mais consumido em todo o mundo; é uma cerveja clara, suavemente maltada e com aroma a lúpulo, com amargor moderado (TasteAtlas, 2019e; Viking Malt, 2019);
- **Marzën** – originária da Alemanha, esta cerveja surge interligada com o *Oktoberfest*, sendo na altura fabricada em março, mantendo-se em caves nos Alpes até outubro; de cor âmbar, possui um sabor limpo a malte, tostado e a pão, com amargor moderado e notas de caramelo (SCC, 2019; Viking Malt, 2019; TasteAtlas, 2020b);

- **Bock** – originárias da Alemanha, as cervejas *Bock* englobam variações que podem ir do dourado a castanho escuro; são levemente lupuladas, com alto sabor a malte e caramelo, doces e de alto teor alcoólico (TasteAtlas, 2019f; Alcohol.org, 2020);
- **Münchner Dunkel** – originária da Alemanha, esta é uma cerveja de cor cobre a castanho escura, com alto aroma tostado a pão, a caramelo e chocolate, com lupulagem subtil (TasteAtlas, 2019g; Alcohol.org, 2020).

3.1.3.3 Cervejas *Lambic*

As cervejas do tipo *Lambic* são diferentes dos outros tipos, pois surgem da fermentação espontânea do mosto com leveduras selvagens que ocorrem naturalmente. Estas leveduras são geralmente do género *Brettanomyces* e surgem também associadas a várias bactérias. De entre as bactérias Gram-negativas temos a *Escherichia coli* e espécies dos géneros *Citrobacter* e *Enterobacter* (pouco tolerantes ao álcool). Quanto a bactérias Gram-positivas temos bactérias dos géneros *Pediococcus* e *Lactobacillus*. O facto destes microrganismos possuírem uma via de fermentação diferente da levedura *Saccharomyces* leva à esterificação dos álcoois a ácidos carboxílicos e gera acidez. De origem belga, estas cervejas possuem um sabor distinto conforme a origem de cada uma delas, devido aos diferentes microrganismos que ocorrem em cada região. No geral, estas cervejas possuem todas um carácter ácido, cor vermelha a arroxeadada, aromas frutados e baixo amargor do lúpulo, geralmente descarbonatadas (SCC, 2017; TasteAtlas, 2020c).

Das várias subcategorias de cervejas *Lambic*, podem-se dar como exemplos as seguintes cervejas (SCC, 2019):

- **Gueuze** – originária de Pajottenland e Bruxelas, na Bélgica, esta cerveja resulta da mistura de uma *Lambic* antiga com uma *Lambic* nova, que resulta numa fermentação secundária espontânea na garrafa; possui alto teor de ésteres, acidez e é totalmente atenuada, o que lhe remove qualquer doçura conferida pelo malte (TasteAtlas, 2015; Brewers Association, 2020)
- **Fruit *Lambic*** – também com origem belga, este estilo nasce pela adição de fruta a *Lambic* antigas, sendo a fruta macerada e depois filtrada; a versão mais popular é a *kriek* com sabor a cereja, existindo ainda com outros sabores como framboesa e groselha; têm carácter ácido e apresentam grande variação consoante os ingredientes utilizados (Brewers Association, 2020; TasteAtlas, 2020d).

3.1.4 Tipos de cerveja

De acordo com a legislação portuguesa, a cerveja pode ainda ser dividida em vários tipos, independentemente do estilo da cerveja, adquirindo a respetiva designação comercial. Assim, de acordo com a Portaria 1/96 de 3 de janeiro, é possível dividir a cerveja nos seguintes tipos:

- **Cerveja sem álcool** – quando possui um teor alcoólico igual ou inferior a 0,5% vol;

- **Cerveja com baixo teor alcoólico** – quando possui um teor alcoólico superior a 0,5% vol, mas inferior a 1,2% vol;
- **Cerveja ou cerveja corrente** – quando possui um teor alcoólico superior a 1,2% vol e um extrato primitivo não superior a 13° Plato
- **Cerveja especial** – quando possui um teor alcoólico superior a 1,2% vol e um extrato primitivo superior a 13° Plato e igual ou inferior a 15° Plato;
- **Cerveja extra** - quando possui um teor alcoólico superior a 1,2% vol e um extrato primitivo superior a 15° Plato;
- **Cerveja de fermentação láctica** – quando sofreu uma fermentação láctica no decorrer do seu processo de produção;
- **Cerveja refermentada em garrafa** – quando sofreu refermentação na garrafa por adição de levedura apropriada e acondicionamento adequado.

3.1.5 Consumo de cerveja

A cerveja é a terceira bebida mais popular do mundo a seguir à água e ao chá, o que faz de si a bebida alcoólica mais consumida globalmente. Em 2018, a produção mundial de cerveja atingiu os 1,94 mil milhões de hectolitros. Apesar do aumento populacional que tem ocorrido no mundo, a produção anual de cerveja atingiu o seu pico em 2013, com 1,97 mil milhões de hectolitros produzidos, mantendo-se ligeiramente abaixo deste valor desde então (Conway, 2019a).

A China é o país do mundo responsável pelo maior consumo de cerveja, sendo este de 20,9% do consumo total mundial desta bebida em 2018. O *top 5* dos maiores consumidores de cerveja, que engloba ainda os Estados Unidos (12,7%), Brasil (6,7%), México (4,8%) e Alemanha (4,4%), representou 49,5% do consumo mundial desta bebida em 2018. No entanto, quando analisado o consumo *per capita* de cerveja, a República Checa destaca-se dos demais, com um consumo de 191,8 L de cerveja por pessoa. A este país seguem-se a Áustria (107,6 L), Alemanha (101,1 L), Roménia (98,9 L) e Polónia (98,2 L) como os maiores consumidores de cerveja em relação ao tamanho da sua população (Kirin, 2019).

A maior parte da produção mundial de cerveja deve-se a grandes empresas cervejeiras que, nos últimos anos, se têm vindo a fundir e a criar grandes multinacionais. Em 2019, a *Anheuser-Busch InBev* surgiu como a empresa líder na venda de cerveja, atingindo os 54,6 mil milhões de dólares em vendas. Esta empresa é o resultado da fusão e compra da belga *Interbrew*, com a brasileira *AmBev*, a americana *Anheuser-Busch* e parte da britânica *SABMiller*. É detentora de marcas como a *Budweiser*, *Stella Artois* e a *Corona*. A *Heineken* surgiu em segundo lugar nas vendas de cerveja, atingindo em 2019 os 26,5 mil milhões de dólares em vendas (Conway, 2019b).

A nível da União Europeia, no ano de 2019 foram produzidos 34 mil milhões de litros de cerveja com álcool, o que representa uma produção *per capita* de 77 litros. A Alemanha

apresentou-se como a maior produtora desta bebida, representando 23% da produção europeia, seguida da Polónia (11%), da Espanha (11%), dos Países Baixos (7%), da Bélgica (7%) e da França (6%), que no total corresponderam a dois terços da produção dos 27 Estados Membros (Eurostat, 2020a).

Analisando o panorama nacional, a produção de cerveja com álcool em Portugal em 2019 foi de 738,9 milhões de litros, o que representou um aumento de 2% face à produção do ano de 2018 (723,8 milhões). No intervalo entre 2009 e 2019, o ano que apresentou maior produção foi o de 2012, totalizando 830,7 milhões de litros, sendo que o ano de 2015 foi o que apresentou a menor produção, de apenas 659,0 milhões de litros (Eurostat, 2020b)

O consumo *per capita* de cerveja em Portugal em 2018 foi de 51 L por pessoa, valor este inferior aos valores de 2008, em que o consumo per capita antegiu os 61 L de cerveja (Wunsch, 2020). Por outro lado, a cerveja surgiu em 2017 como a segunda bebida alcoólica de eleição dos portugueses, logo a seguir ao vinho, que representou um consumo per capita de 51,4 L. Em 2016, a produção de cerveja chegou mesmo a ser superior à do vinho (47 L de cerveja *versus* 46 L de vinho) (Felismino, 2018).

Entre julho de 2018 e junho de 2019 foram consumidos 473 milhões de litros de cerveja em Portugal, o que representa 1460 milhões de euros em vendas. Neste período, a cerveja voltou a marcar-se como o Bem de Grande Consumo de maior valor, sendo que no primeiro semestre de 2019, a categoria cresceu 19% em valor e 15% em volume. Em Portugal, 80% das vendas de cerveja em valor (que representam dois terços das vendas em volume) foram realizadas pelo canal Horeca (hotéis, restaurantes, cafés), sendo ainda de notar a grande sazonalidade desta indústria, visto que os meses de verão (junho a setembro) representam 42% do volume de vendas. Fatores como o clima favorável, turismo e eventos desportivos também têm grande influência no consumo. Estima-se que a cerveja chegue a 77% dos lares portugueses, que adquirem este produto em média 9,5 vezes por ano (Nielsen, 2019).

A pandemia do COVID-19 veio provocar um grande impacto na indústria cervejeira. Sendo os restaurantes, cafés, bares e eventos os maiores responsáveis pelo escoamento do produto, o fecho destes estabelecimentos e o cancelamento dos eventos por todo o mundo provocaram uma grande crise no setor. Milhões de barris de cerveja a atingir o prazo de validade tiveram de ser removidos ou destruídos, a redução da produção levou à escassez de CO₂ (dióxido de carbono) para carbonatação da cerveja e muitas pequenas cervejeiras tiveram de fechar portas. No entanto, as cervejeiras reinventaram-se, começando muitas a produzir álcool e produtos desinfetantes em colaboração com as autoridades de saúde, sendo de esperar a retoma da atividade normal com o sucessivo desconfinamento (Cruz, 2020; Furnari, 2020).

3.1.6 Matérias primas

Tendo em conta a definição de cerveja dada pela Portaria 1/96 de 3 de janeiro e a experiência industrial obtida em estágio, é possível identificar e dividir os ingredientes da cerveja como sendo: a água, o malte, os adjuntos, o lúpulo, os auxiliares tecnológicos e a levedura.

3.1.6.1 Água

A água é o principal ingrediente da cerveja, representando 90% do volume desta bebida (Barth, 2013). Para além da sua utilização como ingrediente na cerveja propriamente dita, esta é necessária em vários processos intermédios, na limpeza dos circuitos, nas transferências de energia, no armazenamento, lavagem de embalagens, estimando-se que para cada litro de cerveja vendida, se gastem em média 6 litros de água. Adicionalmente, o processo de maltagem utiliza 30 a 40 hL de água para cada tonelada de malte produzida (Taylor, 2018a).

O Decreto-Lei 306/2007 de 27 de agosto referente ao controlo da qualidade da água para consumo humano é aplicado não só à água destinada ao consumo humano e doméstico, como a toda a água utilizada na indústria alimentar para fabrico, transformação e conservação de produtos, assim como a utilizada na limpeza de superfícies, objetos e materiais que entrem em contacto com os alimentos. Desta forma, toda a água utilizada no fabrico da cerveja ou na limpeza de sistemas tem de apresentar qualidade igual ou superior à adequada ao consumo humano. Este Decreto-Lei estabelece ainda os parâmetros biológicos, físicos e químicos, assim como a frequência de amostragem e de fiscalização da água utilizada na indústria. A água utilizada na produção pode ainda ser proveniente da rede municipal ou de estações de captação próprias, desde que se apresentem dentro dos parâmetros legalmente impostos.

A água e a sua qualidade estão intimamente ligadas com a qualidade da cerveja em si. O conteúdo dos sólidos dissolvidos na água tem grande influência nas propriedades da cerveja, tais como o sabor (Taylor, 2018a). Consoante o destino final da água (para produção ou para limpeza – CIP ou *Clean-In-Place*), diferentes sais e compostos dissolvidos serão necessários na água, cabendo à estação de tratamento de águas a função de seleccionar os vários tipos de água e as suas finalidades (Eumann & Schaelberle, 2016). Cada tipo de cerveja produzida necessita também de diferentes composições da sua água, geralmente típicas do local de origem desse determinado estilo. Os iões presentes na água têm uma importância vital no produto final, pois influenciam a nutrição da levedura, as propriedades tecnológicas da levedura, o *flavour* e a aparência do mosto. A concentração de certos iões deve ser suficientemente alta para exercer efeitos positivos na cerveja, mas não demasiado alta para tirar a qualidade a esta bebida (Boulton & Quain, 2001).

Um dos principais fatores caracterizantes da água é a sua dureza. A dureza é determinada pelo conteúdo em sais de cálcio e magnésio e permite distinguir a água como “dura” ou “mole” consoante a concentração alta ou baixa, respetivamente, destes iões (Taylor, 2018a). A reputação

da qualidade da cerveja de cidades com Pilsen (água “mole”) ou Burton-upon-Trent (água “dura”) está relacionada com este fator (Boulton & Quain, 2001).

Outro parâmetro muito importante da água é o seu pH. Durante a produção de mosto é essencial a manutenção de um pH baixo para a ocorrência de uma eficiente quebra do amido e proteólise. Desta forma, diferentes iões devem ser controlados devido à sua influência no pH (Boulton & Quain, 2001). Um destes iões é o bicarbonato que reage com os iões hidrónio da água, aumentando bastante o pH da água; desta forma, é muito importante controlar este parâmetro. Por outro lado, o cálcio e magnésio podem reagir com os fosfatos provenientes dos grãos, criando precipitados e diminuindo o pH (Barth, 2013). O pH não deve nunca ser superior a 6,0, pois prejudica a ação enzimática, criando turbidez na cerveja e alterações no sabor (SCC, 2017)

Os efeitos dos iões dissolvidos na água utilizada no processo cervejeiro encontram-se apresentados na Tabela 3.1, baseando-se nas informações fornecidas por Boulton & Quain (2001) e Taylor (2018).

3.1.6.2 Malte

O malte é o produto da germinação de sementes de cereais, germinação esta que é depois interrompida pela ação do calor. O malte apresenta-se como uma fonte de amido, assim como de enzimas para a quebra deste mesmo amido em açúcares fermentiscíveis (Barth, 2013). Pode ser produzido a partir de cereais como o trigo, aveia, sorgo, arroz, entre outros, mas o malte de cevada apresenta-se como o principal tipo utilizado na indústria cervejeira, em geral (Palmer, 2018).

A cevada é um cereal originário do Crescente Fértil (Médio Oriente), que terá sido domesticado por volta de 7800 a.C. (Meussdoerffer & Zarnkow, 2009). A cevada utilizada para maltagem divide-se sobretudo em duas espécies: o *Hordeum vulgare*, de duas fileiras, e o *Hordeum distichon*, de seis fileiras. Apesar da cevada de seis fileiras produzir maior quantidade de grãos, a cevada de duas fileiras produz grãos de maior tamanho, mais adequados ao processo de maltagem. Ambas as espécies possuem ainda variedades de inverno e primavera, consoante a altura em que são semeadas. Tradicionalmente, as cevadas de inverno são consideradas de pior qualidade, apesar de atualmente algumas serem de qualidade melhor ou semelhante às cevadas de primavera (Palmer, 2018).

Tabela 3.1 - Iões presentes na água utilizada para o fabrico da cerveja e respetivos efeitos no *flavour* da cerveja e no metabolismo da levedura.

Ião	Efeito
Cálcio (Ca ²⁺)	Essencial para o controlo do pH por interagir com os fosfatos e as proteínas na empastagem. Aumenta o rendimento do mosto e os níveis de FAN (<i>Free Amino Nitrogen</i> - azoto aminado livre). Precipita o oxalato e clarifica o mosto. Ativa a α -amilase e as proteases do malte. Acentua a flocculação da levedura no fim da fermentação e estimula o crescimento da levedura. Confere sensação de adstringência.
Magnésio (Mg ²⁺)	Reduz o pH do mosto pela interação com os fosfatos (em menor escala que o cálcio). Tem um papel muito importante no crescimento e metabolismo da levedura, pois é cofator de muitos enzimas como o piruvato descarboxilase, incluindo os que envolvem o ATP. Confere sabor amargo à cerveja.
Sódio (Na ⁺)	Contribui para a doçura e sabor salgado da cerveja em conjunto com os cloretos. Não é utilizado pela levedura.
Potássio (K ⁺)	Provém principalmente do malte. Por transporte ativo, são importados para a célula da levedura para neutralizar as cargas das proteínas e ácidos nucleicos. Contribui para a osmorregulação. Confere sabor salgado.
Ferro (Fe ²⁺)	Tóxico para a levedura. Estabiliza a espuma, mas promove a oxidação, provoca turvação, sensação de adstringência e sabor metálico.
Zinco (Zn ²⁺)	A maioria das estirpes requer 0,1 a 0,2 mg/L de zinco para ocorrer uma eficiente fermentação. É essencial à estrutura e função de vários enzimas. Pode inibir o crescimento e fermentação a concentrações superiores a 0,6 mg/L.
Manganês (Mn ²⁺)	Em concentrações vestigiais, é cofator de enzimas do malte e auxilia o crescimento da levedura.
Cobre (Cu ²⁺)	Essencial em concentrações vestigiais. Tóxico em altas concentrações. Elimina o sulfureto de hidrogénio.
Carbonato (CO ₃ ²⁻)	Aumenta o pH e diminui a formação de extrato.
Fosfatos	Provenientes do malte, são essenciais ao metabolismo da levedura. Interagem com o cálcio e magnésio na diminuição do pH do mosto.
Sulfatos	Precusores de aminoácidos sulfurados da levedura em mostos com baixo FAN. Conferem sabor amargo e caráter seco.

Os grãos de cevada são constituídos pela casca, pericarpo, camada de aleurona, endosperma e o embrião. É no endosperma, que representa 77 a 82% do peso seco do grão, que se encontram os grânulos de amido (Barth, 2013; Palmer, 2018).

O processo de produção de malte envolve uma demolha, seguida de germinação e, por último, *kilning*, ou interrupção da germinação por ação de calor. A demolha faz aumentar a humidade do grão, que fica pronto a germinar. Na etapa de germinação, o embrião desenvolve-se e liberta hormonas que vão interagir com a camada de aleurona e produzir e ativar enzimas que destroem proteínas e o amido, de forma a serem utilizados pelo grão como fonte de energia. Antes que o desenvolvimento do grão seja demasiado extenso, as sementes são aquecidas, no chamado *kilning*, até temperaturas acima de 80° C, interrompendo a germinação, inibindo a atividade enzimática, perdendo humidade e formando cor e *flavours* (Barth, 2013; Palmer, 2018).

Para uma eficiente produção cervejeira, o malte deve ser uniforme e homogéneo, não apresentando diferenças significativas entre lotes utilizados. Desta forma, é importante estudar certos parâmetros, como a fiabilidade (facilidade de partir), homogeneidade (percentagem do peso das partículas não friáveis), azoto total (quantidade de proteínas e aminoácidos), azoto solúvel (eficiência da quebra das proteínas pelos enzimas do malte), FAN ou *Free Amino Nitrogen* (azoto aminado – sobretudo aminoácidos - disponível para ser usado pela levedura), poder diastásico (capacidade enzimática de degradação do amido pelo malte), precursores de DMS (dimetilsulfito – confere sabor), β -glucanos (dificuldades na filtração), humidade (susceptibilidade de desenvolver microrganismos), extrato (potencial do malte de fornecer açúcares fermentescíveis), pH (influência no pH da cerveja) e cor (Howe, 2020).

Consoante o tempo e condições de germinação e, sobretudo, o tempo e temperatura de *kilning* ou torrefação, dá-se origem a diferentes tipos de malte que apresentam, sobretudo, grandes variações na cor, poder diastásico, *flavour* e doçura. Entre vários tipos de malte temos os *Munich*, Viena, Caramelo, Cristal, *Pilsen*, *Carafa*, entre outros (Palmer, 2018; Howe, 2020). De forma geral, quanto mais escuro o malte, menor o pH, menor a atividade enzimática (por desnaturação enzimática no *kilning* e torrefação), menor o extrato, o nível de FAN diminui e mais escura a cerveja é (Viking Malt, 2019).

3.1.6.3 Adjuntos

Aos materiais que são utilizados no fabrico da cerveja, mas que não são essenciais na produção cervejeira, dá-se o nome de adjuntos. Usualmente, os adjuntos são cereais não maltados ou açúcares que são adicionados de forma a substituir em parte o malte de cevada. Devido ao menor preço dos adjuntos, esta adição é vista como uma técnica de redução dos custos, que seriam mais elevados ao utilizar apenas malte de cevada nas receitas de cerveja (Stewart, 2018a).

Apesar de não serem utilizados em alguns países devido à legislação em vigor (como a Lei da Pureza Alemã), os adjuntos são utilizados em quase todo o mundo como fontes de amido

e de extrato fermentável, não conferindo atividade enzimática, nem azoto solúvel. Como exemplos de adjuntos temos os cereais não maltados como cevada, milho, trigo, arroz, ou sorgo, açúcares, xaropes, ou ainda outros cereais maltados como o milho e trigo. Cada um destes adjuntos pode ainda contribuir para o *flavour* da cerveja em si (Stewart, 2018a).

Devido à ausência de enzimas, os adjuntos têm de ser processados separadamente. Para tal, é preciso fornecer enzimas exógenas, uma pequena quantidade de malte e ainda uma alta temperatura para que ocorra a gelatinização e hidrolização do amido, sendo depois a mistura adicionada à empastagem (Stewart, 2018a; Howe, 2020).

Os adjuntos utilizados mais regularmente são o milho e o arroz (Stewart, 2018a). Os adjuntos podem ser adicionados sobre várias formas, sendo a mais comum sobre a forma de *grits*. O *grits* é um subproduto do processamento de cereais e consiste em fragmentos do endosperma do grão (Boulton & Quain, 2001). No processamento do *grits* de milho, o mais utilizado, a casca, camadas exteriores do endosperma e o embrião (rico em lípidos) são removidos, sobrando apenas fragmentos do endosperma. Este é depois moído e atinge uma temperatura de gelatinização entre o 62° C e 74° C. Os fragmentos de arroz utilizados, o segundo adjunto mais comum, são um subproduto do descasque do arroz para alimentação. Também possuem baixo teor lipídico e atingem temperaturas de gelatinização entre os 64° C e 78° C. A cevada não maltada também é utilizada; é mais difícil de moer, mas possui menor temperatura de gelatinização (Stewart, 2018a).

3.1.6.4 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta trepadeira da família das *Cannabaceae* que é cultivada nas regiões temperadas, nomeadamente, entre os paralelos 30 e 50 de ambos os hemisférios do planeta (Boulton & Quain, 2001; Howe, 2020). As plantas do sexo feminino desta espécie, que é de crescimento rápido e pode atingir os 8 metros de altura, são de grande interesse para a indústria cervejeira. Estas desenvolvem cones, quando não fertilizadas, que são colhidos no final do verão (Krottenthaler, 2009). Dentro destes cones existem glândulas amarelas de lupulina, um pó que contém os compostos responsáveis por conferir qualidades como amargor, *flavours* e longevidade à cerveja (Barth, 2013).

Tal como referido anteriormente, o lúpulo surgiu na época medieval como substituto do *gruit*, de forma a conferir sabor e longevidade à cerveja, consequência do seu poder antibacteriano (Howe, 2020). O uso do lúpulo iniciou-se na Alemanha, espalhando-se depois à Inglaterra e ao resto da Europa, sendo um dos ingredientes fundamentais da cerveja de acordo com a Lei da Pureza Bavariana de 1516. Atualmente, os maiores produtores de lúpulo são a Alemanha e os Estados Unidos, que juntos representam mais de metade da produção mundial deste produto (Roberts & Falconer, 2018).

Consoante a variedade do lúpulo em questão, este possui diferentes concentrações de resinas amargas, óleos essenciais e polifenóis, que resultam em diferentes características sensoriais

e que darão vários perfis às cervejas ao qual são adicionados. No entanto, o cultivo e desenvolvimento de novas variedades tem-se focado sobretudo na produção de lúpulos com maior amargor (Krottenthaler, 2009).

Tal como referido, os compostos mais importantes no lúpulo pertencem a três categorias: as resinas, os óleos e os polifenóis. Dentro das resinas, as que mais contribuem para o sabor são as resinas macias, em particular os α -ácidos, que conferem um forte amargor. Existem três α -ácidos principais: a humulona, a cohumulona e a adhumulona. Estes compostos em si não são considerados amargos nem são solúveis; no entanto, aquando da fervura, ocorre uma reação de isomerização, formando-se iso- α -ácidos que são mais solúveis e de sabor amargo (Roberts, 2016). A escala de unidades de amargor (BU) pode assim ser utilizada para medir o amargor de uma cerveja, consoante o teor de iso- α -ácidos presente. É também importante referir que os iso- α -ácidos resultantes da fervura são sensíveis à luz, podendo criar o sabor *lightstuck*, devendo por isso a cerveja ser acondicionada em garrafas escuras (Barth, 2013). Os α -ácidos não isomerizados também são importantes, pois têm um alto poder antibacteriano, prolongando o tempo de vida útil da cerveja (Krottenthaler, 2009). Na Figura 3.2, podemos observar as estruturas químicas do α -ácido humulona (a) e do respetivo composto após isomerização, a isohumulona (b).

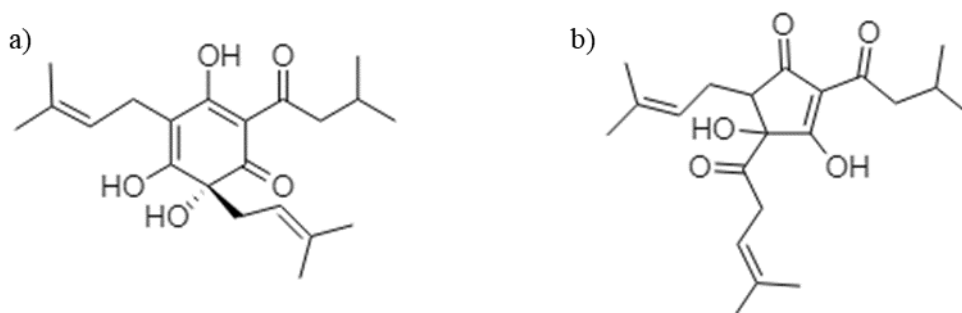


Figura 3.2 - Estruturas químicas do α -ácido humulona (a) e do iso- α -ácido isohumulona (b)

Os β -ácidos, presentes em menor concentração que os α -ácidos, também contribuem ligeiramente para o amargor. Consistem sobretudo na lupulona, colupulona e adlupulona, e são muito insolúveis e difíceis de isomerizar. No entanto, parte pode ser oxidada, conferindo amargor (Roberts, 2016).

Os óleos são os responsáveis pelo sabor e aroma da cerveja conferidos pelo lúpulo. Estes são o resultado de uma mistura de mais de 250 compostos que podem fornecer aromas florais, cítricos, picantes ou a pinheiro. No entanto, são muito voláteis, devendo ser apenas adicionados no fim da fervura ou após esta (Boulton & Quain, 2001). Os óleos são normalmente subdivididos em três categorias: os terpenos (altamente voláteis e os mais comuns), a fração oxigenada (confere sabor a lúpulo) e a fração sulfurada (com impacto negativo no *flavour*) (Roberts, 2016). Entre os compostos mais importantes temos o linalol, um álcool de terpeno com aroma floral e picante, que confere o característico aroma a lúpulo e diminui o limiar de deteção do diacetilo; o mirceno,

um hidrocarboneto que confere aroma a resina, cítrico e a pinheiro; o geraniol, um álcool que confere um aroma floral; e o farneseno, que confere um aroma herbal, floral e amadeirado (Howe, 2020).

Os polifenóis são outra classe de compostos muito importantes no lúpulo. Estes podem contribuir com *flavours* para a cerveja, estabilizar outros *flavours*, aumentar o amargor e o corpo da cerveja e possuem ainda propriedades antioxidantes. Por outro lado, podem provocar sensação adstringente, assim como criar turvação na cerveja por reações com proteínas, diminuindo a qualidade da bebida. No entanto, o lúpulo é apenas responsável por 20% dos polifenóis presentes na cerveja, sendo a maioria proveniente do malte (Roberts, 2016; Howe, 2020).

Tradicionalmente, após a colheita, os cones de lúpulo são secos até atingirem uma humidade de 10%, a temperaturas abaixo de 50° C. Estes cones eram depois adicionados na fervura. No entanto, devido à pequena durabilidade deste lúpulo, a abundância de corpos estranhos, dificuldades de filtração e grande absorção de mosto, surgiram outras opções viáveis para adição de lúpulo (Howe, 2020). De acordo com Barth (2013), o lúpulo pode ser adicionado sobre a forma de:

- **Pellets** - em que os cones são moídos e prensados;
- **Pellets isomerizados** - em que após adição de óxido de magnésio, os *pellets* são aquecidos em vácuo, levando à isomerização dos α -ácidos e reduzindo o tempo de fervura;
- **Extrato** – em que os compostos do lúpulo são extraídos com dióxido de carbono líquido, formando um óleo que pode ser adicionado ao mosto, evitando turvação;
- **Isomerized Kettle Extract (IKE)** – que consiste num extrato líquido de lúpulo em que os α -ácidos foram pré-isomerizados;
- **Extrato hidrogenado** – em que o extrato normal ou isomerizado é tratado para remover certas ligações duplas, evitando o aparecimento do sabor *lightstruck*.

3.1.6.5 Auxiliares tecnológicos

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro, um auxiliar tecnológico é “qualquer substância que: não seja consumida como género alimentício em si mesma; seja intencionalmente utilizada na transformação das matérias primas, dos géneros alimentícios ou dos seus ingredientes, para atingir determinado objectivo tecnológico durante o tratamento ou a transformação; e possa resultar na presença não intencional, mas tecnicamente inevitável de resíduos da substância ou dos seus derivados no produto final, desde que esses resíduos não apresentem qualquer risco sanitário nem produzam efeitos tecnológicos sobre o produto final”. Entre estes auxiliares tecnológicos encontramos os enzimas, auxiliares de filtração, agentes de acabamento e os sais (Bolton & Quain, 2001).

Para uma melhor compreensão dos auxiliares tecnológicos mais utilizados na indústria cervejeira, alguns destes serão abordados mais intensivamente.

3.1.6.5.1 Auxiliares para controlo do pH e nutrição da levedura

Tal como referido em 3.1.6.1, um dos principais ingredientes para a produção cervejeira é a água devido à sua composição iónica e ao seu pH, que influenciam diretamente o crescimento da levedura e de alguns *flavours* presentes na cerveja (Taylor, 2018a).

A adição de ácidos à água ou ao mosto permite contrabalancear a alcalinidade presente nesta, podendo baixar o pH a valores desejados. No entanto, o pH final vai depender sempre do tipo de grão utilizado. Um baixo pH permite uma melhor atividade enzimática, separação e clarificação mais eficientes do mosto, assim como um melhoramento nos *flavours* do lúpulo. Desta forma, o ácido láctico, ácido fosfórico e o ácido sulfúrico são os ácidos mais utilizados com esta finalidade (Ryder, 2018).

Por outro lado, certos sais também podem ser adicionados à água para controlo do pH. Como explicado anteriormente, o cálcio e o magnésio são essenciais para o controlo da alcalinidade da água. Desta forma, os iões cálcio podem ser adicionados sobre a forma de sulfato de cálcio (gesso), com forte agitação, ou sobre a forma de cloreto de cálcio (muito solúvel). Já os iões magnésio, apesar de terem um efeito menor no pH, possuem um papel importante como cofatores de enzimas e no crescimento da levedura, podendo ser adicionados sobre a forma de sulfato de magnésio. Tendo em conta que o pH necessário para a empastagem é mais elevado que na fervura, normalmente a adição destes sais é realizada em duas fases – antes da empastagem e antes da fervura (Ryder, 2018).

Para além deste sais, o cloreto de sódio pode ser adicionado, devido às suas propriedades como intensificador de sabor. A indisponibilidade de zinco no mosto é também muitas vezes reportada como tendo efeitos nefastos no crescimento da levedura e criando problemas na fermentação; desta forma, a adição de sais como sulfato de zinco vem resolver este problema (Ryder, 2018).

3.1.6.5.2 Enzimas

Os enzimas são catalizadores biológicos e de origem natural que permitem a ocorrência de reações químicas essenciais à vida. A maioria é de natureza proteica e destacam-se pela sua eficiência e alta especificidade, que aliadas à sua origem natural, permitem que sejam explorados pela indústria alimentar de forma segura para o consumidor e para inúmeros fins (Subin & Bhat, 2016).

Na indústria cervejeira, os enzimas utilizados possuem uma diversa ação e propriedades. Apesar de o malte possuir enzimas e estes serem essenciais ao processo cervejeiro, por vezes são adicionados enzimas comerciais ao processo fabril. Estes são adicionados de forma a melhorar a qualidade da clarificação, cor, textura, *flavour*, entre outros, e a utilização de enzimas de origem externa é essencial quando os enzimas do malte não são suficientes para atingir os níveis de qualidade pretendidos (Gomaa, 2018). São particularmente importantes nas caldas (processo de

aquecimento dos adjuntos antes da adição destes à empastagem), em que a adição de amilases permite hidrolizar parcialmente o amido dos adjuntos e reduzir a viscosidade (Ryder, 2018).

Desta forma, os enzimas exógenos mais comumente adicionados no processo cevejeiro são:

- **β -glucanases** – hidrolizam os β -glucanos (polímeros de glucose provenientes das paredes celulares das células do endosperma) diminuindo a viscosidade e a turbidez e aumentando o rendimento; costumam ser de origem bacteriana, têm pH ótimo a 6,0 e têm temperaturas ótimas de 45 a 50° C (Gomaa, 2018);
- **α -amilase** – hidroliza a amilose e a amilopectina, transformando-as em dextrinas ao quebrar as ligações glicosídicas internas destas moléculas de amido; pode ser de origem bacteriana ou fúngica, tem pH ótimo abaixo de 5,2 e temperatura ótima de 72° C; pode ser usada na sua forma termorresistente (Gomaa, 2018);
- **β -amilase** – hidroliza a amilose e amilopectina através da quebra das ligações glicosídicas exteriores; pode ser de origem bacteriana ou fúngica, tem pH ótimo a 5,5 e temperatura ótima de 62° C (Gomaa, 2018);
- **peptidases** – hidrolizam as ligações peptídicas das proteínas diminuindo a viscosidade do mosto, clarificando-o e tornando os aminoácidos mais disponíveis para o consumo pela levedura; têm temperatura ótima a 52° C e atuam principalmente em pH ácido (Gomaa, 2018);
- **papaína e ficina** – proteases que podem ser adicionados após a fermentação para hidrolizar proteínas e polipéptidos causadores de turbidez; têm temperatura ótima entre 60 a 65° C (Gomaa, 2018);
- **α -acetolactato descarboxilase** – liase utilizado para reduzir o tempo de fermentação e aumentar a velocidade de produção da cerveja; converte o α -acetolactato diretamente a acetoína exogenamente, sem ser necessária a conversão do α -acetolactato a diacetilo; o pH ótimo está entre 5 e 7 e a temperatura ótima entre 25 a 40° C (Gomaa, 2018).

3.1.6.5.3 Auxiliares de filtração

Após a fermentação e maturação da cerveja, para se obter cerveja com um aspeto límpido e ausente de suspensões, como a levedura, recorrem-se a auxiliares de filtração. Estes compostos são misturados com a cerveja, sendo esta mistura depois passada por filtros porosos, separando-se assim os auxiliares, que retiveram as substâncias coloides, da cerveja límpida. Devido ao seu preço e abundância, os auxiliares de filtração mais utilizados são a perlite e a diatomite, também chamada de *kieselguhr* (Bolton & Quain, 2001). O *kieselguhr* é uma rocha altamente porosa que consiste nos restos fossilizados de células de algas com carapaça rija (Barth, 2013).

3.1.6.5.4 Outros auxiliares

Durante todo o processo cervejeiro, podem ainda ser utilizados outros auxiliares tecnológicos tais como agentes antiespumantes, clarificantes, estabilizadores coloidais, estabilizadores de *flavour*, estabilizadores de espuma e estabilizadores biológicos (Ryder, 2018).

3.1.6.6 Levedura

A levedura é um dos ingredientes fundamentais para a cerveja. O facto deste ser vivo ser um microrganismo, levou a que, durante séculos, não se soubesse a verdadeira causa da ocorrência da fermentação; sabia-se apenas que as melhores cervejas eram produzidas junto a padarias (Tenge, 2009). Em 1680, Antonie van Leeuwenhoek foi o primeiro a observar as células de levedura ao microscópio, mas foi apenas em 1876 que Louis Pasteur publicou os seus estudos sobre a cerveja. Nestes, Pasteur observou o crescimento das células de levedura e considerou-as como responsáveis pela fermentação, contrariando a ideia da época de que a fermentação era um processo oxidativo espontâneo (Tenge, 2009; Pires & Brányik, 2015; SCC, 2017). Em 1883, Hansen foi o primeiro a cultivar culturas puras de levedura para o uso cervejeiro nos laboratórios da *Carlsberg*. Já durante o século XX, houve avanços significativos no estudo das vias de fermentação e de formação de subprodutos e na identificação de estirpes, tendo sido a levedura o primeiro organismo eucariota com o genoma totalmente sequenciado (Tenge, 2009).

As leveduras cervejeiras são organismos eucariotas, unicelulares, heterotróficos, de forma oval e anaeróbios facultativos que, durante a fermentação, se reproduzem assexuadamente por gemulação. A levedura, um fungo, pode gemular cerca de 10 a 30 vezes, sendo que a cada divisão se observa uma espécie de cicatriz na célula mãe (Pires & Brányik, 2015). Sob condições ótimas, a levedura pode gemular a cada 90 a 120 minutos (Russel, 2016).

A maioria das cervejas (exceto as *Lambic*) são produzidas com leveduras do género *Saccharomyces*, que significa “fungo do açúcar”. Apesar de se conhecerem 10 espécies de leveduras *Saccharomyces*, apenas duas estão envolvidas na fermentação da cerveja: a levedura de alta fermentação e a levedura de baixa fermentação (Tenge, 2009). As principais diferenças entre estes dois tipos revelam-se na sua temperatura ideal de fermentação, capacidade de fermentação de diferentes açúcares, condições ambientais, capacidade de flocculação e sedimentação, e produção e metabolismo de subprodutos da fermentação (SCC, 2017).

A levedura de alta fermentação pertence à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Estas leveduras estão desde tempos ancestrais associadas ao processo cervejeiro e dão origem às cervejas do tipo *Ale*. A designação de “alta fermentação” deriva do facto de se aglomerarem, formarem colónias e acumularem espuma no topo do fermentador. As leveduras *Ale* tendem a necessitar de temperaturas mais altas para se manterem ativas, de entre 18 a 25° C, o que se traduz em fermentações rápidas, com elevada concentração de ésteres, que proporcionam aromas mais frutados e adocicados (Pires & Brányik, 2015). A tolerância ao álcool é também maior, sendo que

algumas estirpes atingem os 12% de álcool em volume. As suas atenuações variam entre 69 a 80%, sendo que a espécie fermenta os açúcares mais comuns, como a glucose, maltose, frutose e sacarose, podendo fermentar parcialmente a rafinose (SCC, 2017). A rafinose é um trissacárido de frutose, glucose e galactose. A levedura *Ale* não possui o enzima responsável pela clivagem da ligação entre a glucose e galactose, a α -galactosidade, sendo que apenas fermenta a rafinose em um terço: a fração composta pela frutose (Tenge, 2009).

Por outro lado, a classificação das leveduras de baixa fermentação é mais difícil. Conhecidas anteriormente por *Saccharomyces carlsbergensis* e por *Saccharomyces uvarum*, estas leveduras dão origem às cervejas do tipo *Lager*. Sabe-se que esta levedura é resultado da hibridação da *Saccharomyces cerevisiae* com a *Saccharomyces eubayanus*, assumindo atualmente o nome de *Saccharomyces pastorianus* (Tenge, 2009; Pires & Brányik, 2015). Esta levedura necessita de temperaturas mais baixas para ocorrer a fermentação, de 8 a 13° C. A sua tolerância ao álcool é inferior às *Ale*, atingindo os 8% em volume. A atenuação aparente atinge por norma os 67 a 77% e destacam-se, pois para além de fermentarem os mesmos açúcares que as *Ale*, conseguem fermentar completamente a rafinose. Estas leveduras, para além de sedimentarem na base do fermentador, produzem uma menor quantidade de ésteres e levam a que a cerveja tenha um aroma mais límpido a lúpulo e malte (SCC, 2017). A floculação mais rápida neste tipo de levedura pode levar a uma menor redução no diacetilo, o que se pode revelar um problema (Tenge, 2009).

Em suma, a levedura é responsável pela conversão dos açúcares fermentescíveis provenientes do malte e dos adjuntos, convertendo-os em álcool (etanol) e conferindo *flavours* à cerveja, que podem ser agradáveis ou não, consoante os metabolitos produzidos, tais como ésteres, álcoois superiores, diacetilo, entre outros, que dependem não só da espécie de levedura utilizada, como da estirpe (Tenge, 2009; Russel, 2016; SCC, 2017).

3.2 Processo de produção da cerveja

O fabrico de cerveja está dividido em vários processos diferentes. Estes são a maltagem, o fabrico de mosto (brassagem), a fermentação, a maturação, a filtração, a pasteurização, e ainda o enchimento (SCC, 2017).

3.2.1 Maltagem

O processo de maltagem consiste na germinação controlada de sementes de cevada ou outros cereais de forma a ativar a produção de enzimas responsáveis pela hidrólise do amido e das proteínas no grão. Após este processo, de forma a evitar o gasto das reservas do grão, a germinação é parada através de calor e o grão é secado, mantendo parte da atividade dos seus enzimas. O grão é depois separado da sua radícula. Desta forma, o processo de maltagem compreende a demolha, germinação, secagem e desradiculagem (para além da armazenagem prévia e posterior do grão) (Pires & Brányik, 2015).

3.2.1.1 Receção e armazenamento

O transporte do grão é feito em camiões cisterna certificados para a indústria alimentar. Ao chegar à fábrica, a carga é inspecionada visualmente em busca de pragas, perigos físicos ou biológicos e os boletins de conformidade são analisados. São colhidas amostras para o laboratório, que analisará o conteúdo proteico, humidade, entre outros. Após aceitação do lote, se estiver de acordo com as especificações, este é submetido a processos de limpeza para remoção de poeiras, galhos e pedras ou outras impurezas, eliminando perigos físicos. Os processos de limpeza envolvem a utilização de classificadoras, peneiras, polidoras, entre outras. O grão é também calibrado de acordo com as especificações necessárias e é depois armazenado por calibre. O armazenamento do grão é feito em silos de cimento com aeração, com humidade e temperatura controladas, sendo o seu conteúdo analisado antes de ser utilizado. É nesta altura que é colhida uma amostra para a micromaltagem, que consiste em mimetizar o processo de maltagem do grão de forma a poder prever as condições necessárias para uma eficiente obtenção do malte pretendido (Kreis, 2009).

3.2.1.2 Demolha

O processo de demolha tem como principal objetivo o de aumentar a humidade do grão de cerca de 12% até valores acima dos 40%, atingindo a humidade necessária para que ocorra a germinação do grão. Com este processo é também possível lavar o grão, removendo inibidores de germinação e materiais flutuantes. A humidade final do grão que é necessário atingir depende do tipo de malte pretendido, sendo, por exemplo, de 42-44% no caso de maltes *Pilsner*, e de 44-47% no caso de maltes mais escuros (Palmer, 2018; Howe, 2020; Viking Malt, 2020).

Inicialmente, a cevada é transferida dos silos para grandes tinhas de demolha (Figura 3.3). Nestas, ocorre a total submersão do grão de cevada em água, a temperaturas controladas que podem variar entre os 14 e os 20° C, durante algumas horas. Após este período, a água é removida, evitando a asfixia do grão. Ao remover a água, o grão é arejado, permitindo que o oxigénio penetre nos grãos. O embrião pode então realizar respiração e iniciar a sua atividade, enquanto que os grânulos de amido são hidratados. A submersão seguida de arejamento do grão é repetida outras vezes, podendo o processo de demolha demorar na totalidade até 48h. Alternativamente, o grão pode ser submergido em água que é arejada periodicamente com ar comprimido, o que encurta o tempo do processo e reduz o consumo de água. Com o aumento da atividade do embrião do grão, são libertadas giberelinas, hormonas vegetais, que se difundem para a camada de aleurona e estimulam a produção de enzimas hidrolíticos responsáveis pelo processo de germinação (Boulton & Quain, 2001; Hughes & Baxter, 2001; Palmer, 2018; Howe, 2020; Viking Malt, 2020).



Figura 3.3 - Tina de demolha da cevada

3.2.1.3 Germinação

O limiar necessário para que ocorra a germinação do grão atinge-se aos 30% de humidade. Após a demolha, a cevada húmida é transferida das tinas de demolha para as chamadas caixas de germinação (Figura 3.4), que consistem em estruturas semelhantes a piscinas onde o grão é espalhado e oxigenado. Aqui, o grão permanece durante 4 a 7 dias a germinar, tempo este que varia consoante o tipo de malte produzido. Nos primeiros dias, o grão é regado até atingir a humidade final pretendida e de forma a que a germinação não pare. Em todo o processo, é mantida uma temperatura constante de 18 a 20° C, sendo necessário arrefecimento na sala, devido à germinação ser um processo exotérmico. Ocasionalmente, o grão é também remexido por um volteador, de forma a que a oxigenação de todos os grãos seja uniforme. O controlo destas condições permite que não ocorra o crescimento exagerado do caule da planta, o que levaria a um esgotamento dos nutrientes disponíveis, em particular do amido (Hughes & Baxter, 2001; Howe, 2020; Viking Malt, 2020).



Figura 3.4 - Caixa de germinação do malte

Durante a germinação, devido à ação do ácido giberélico, são produzidos enzimas hidrolíticos nas células da camada de aleurona. Formam-se então enzimas proteolíticos, como carboxipeptidases e endopeptidases, que degradam as proteínas em péptidos e aminoácidos;

enzimas celulíticos, como β -glucanases, que destroem as paredes celulares das células do endosperma, tornando os grãos de amido mais disponíveis; e enzimas amilolíticos, como a α -amilase e a β -amilase, que permitem a degradação do amido. Desta forma, são produzidos os nutrientes necessários à proliferação da planta, ocorrendo a formação de uma radícula no grão. Apesar de ocorrer grande hidrólise protéica e dos componentes da parede celular do endosperma durante a germinação, a maior parte dos grânulos de amido são mantidos intactos, ficando disponíveis para serem degradados na fase da empastagem (Hughes & Baxter, 2001; Boulton & Quain, 2001).

3.2.1.4 Secagem ou *Kilning*

A germinação é de seguida interrompida pelo chamado *kilning* ou secagem. O *kilning* consiste no aquecimento do malte “verde” (malte germinado) obedecendo a um gradiente de temperaturas por fases, com o auxílio de ar quente, dos 20° C até temperaturas acima de 80° C, que variam consoante o malte pretendido. Desta forma, é possível reduzir a humidade do grão a valores abaixo dos 5%. A remoção da água leva ao cessamento do crescimento do grão antes que este esgote as suas reservas energéticas. Para tal, o malte “verde” é transferido para grandes salas ou secadores, onde é submetido a condições previamente determinadas (Hughes & Baxter, 2001; Boulton & Quain, 2001; Palmer, 2018; Howe, 2020).

O aquecimento do malte leva à formação de cor e *flavours*, extremamente importantes para o produto final, devido à ocorrência das reações não enzimáticas de Maillard entre os açúcares e aminoácidos, que levam à formação de melanoidinas e da cor acastanhada. O calor leva também a uma perda de atividade enzimática parcial do malte, que é superior em maltes sujeitos a torra ou a temperaturas de *kilning* muito elevadas (que permitem, por outro lado, obter *flavours* mais intensos a café e chocolate, assim como cor mais escura). Esta técnica permite também obter um produto estável, com ausência de microrganismos e de fácil armazenamento em silos por longos períodos (Hughes & Baxter, 2001; Boulton & Quain, 2001; Palmer, 2018; Howe, 2020). O *kilning* permite também eliminar parcialmente o dimetilsulfito (DMS) formado na germinação, através das altas temperaturas, que se volatiliza. A queima de dióxido de enxofre (SO₂) durante este processo também auxilia a remoção da N-nitrosodimetilamina (NDMA), um composto cancerígena que se forma durante a germinação do embrião (Wainwright, 1986; Palmer, 2018; Viking Malt, 2020).

3.2.1.5 Desradiculagem

Após o *kilning*, as radículas formadas pela germinação do grão estão secas e são facilmente removidas do grão através do processo de desradiculagem (Viking Malt, 2020). A separação é feita quando o malte percorre uma série de tambores rotativos que atuam como peneira, levando a que a radícula se desprenda do grão maltado pela fricção a que fica sujeita

(Kreisz, 2009). O malte pode depois ser armazenado e as radículas, muito ricas em proteína, podem ser utilizadas para alimentação animal (Charlton & Vriesekoop, 2018).

3.2.2 Brassagem (Fabricação de Mosto)

Do francês *brassage*, a brassagem é o ato da fabricação do mosto, a mistura que será fermentada pela levedura e transformada em cerveja. É nesta fase que o amido do malte é convertido em açúcares que podem ser utilizados pela levedura para formação de etanol (Hughes & Baxter, 2001). Para tal, o malte e os adjuntos necessários à produção do mosto são primeiramente moídos e misturados com água, sofrendo depois o processo de empastagem. Nesta fase são ativados os enzimas que degradam o amido da mistura em açúcares solúveis, tal como os enzimas reponsáveis pela degradação proteica. A mistura é depois filtrada para a separação dos componentes insolúveis do mosto doce, que é depois fervido, altura em que se lhe é adicionado o lúpulo, clarificado e arrefecido (SCC, 2017).

3.2.2.1 Moagem

As reações necessárias à produção do mosto dão-se na superfície de contacto entre o sólido (malte) e o líquido (água). Desta forma, é preciso proceder à moagem do grão de forma a libertá-lo da casca e a aumentar a superfície de contacto do endosperma do malte com a água, permitindo aumentar a velocidade e extensão das reações (Boulton & Quain, 2001; Barth, 2013).

A moagem do grão é um processo mecânico e pode ser feita através de moinhos de martelo ou por moinhos de rolo, e pode ser realizada a seco ou com molha. O processo mais comum de moagem do grão é feito a seco e com 6 rolos (Krottenthaler *et al.*, 2009; SCC, 2017; Miedl-Appelbee, 2018).

O grau de farinação e o tamanho dos fragmentos da casca e do endosperma é controlado pelo tamanho dos espaços entre os rolos do moinho (Barth, 2013). Se o tamanho das partículas for muito grande, o mosto durante a filtração vai fluir facilmente pela camada sólida que resta; no entanto, o contacto entre os grãos de amido e a água durante a empastagem vai ser mínimo, o que leva a uma formação de açúcares muito baixa e a um fraco rendimento do malte. Se por outro lado o tamanho das partículas for muito pequeno, apesar de haver um grande contacto do amido com a água e grande formação de açúcares e assimilação dos compostos nitrogenados durante a empastagem, a filtração do mosto vai ser muito lenta e difícil devido à grande viscosidade, sendo necessário aplicar maior pressão para que a filtração ocorra de forma eficiente. É necessário encontrar então um equilíbrio para se obter uma boa conversão do amido em açúcares e uma eficiente filtração (Boulton & Quain, 2001; Barth, 2013; Pires & Brányik, 2015).

3.2.2.2 Mistura

A receita para uma determinada cerveja é ajustada consoante as matérias primas disponíveis, de forma a se obter um produto final estandardizado. Após a moagem, o malte moído

é misturado com água aquecida, consoante o extrato que se pretende obter durante a empastagem, ou seja, conforme a quantidade de açúcares solúveis que se pretende no mosto. Para cervejas mais claras e com menor teor alcoólico, a quantidade de água adicionada é maior, enquanto que uma menor diluição leva a um maior extrato e teor alcoólico (SCC, 2017).

Por baixo dos moinhos normalmente existem básculas que permitem regular a quantidade de grão moído. Ao atingir os pesos pretendidos pela receita, é dada a ordem para se misturar a correta quantidade de água aquecida e previamente tratada, com as condições pretendidas para o fabrico da cerveja. Nesta fase também podem ser adicionados adjuntos que não precisam de ser moídos ou outros tipos de malte, enzimas ou auxiliares tecnológicos, que terão influência no *flavour*, pH, nutrição da levedura ou rendimento do extrato (Boulton & Quain, 2001; Miedl-Appelbee, 2018).

3.2.2.3 Empastagem

A empastagem é o processo em que ocorre a solubilização dos componentes do malte por via enzimática, física e química (Krottenthaler *et al.*, 2009). Nesta operação, o malte e os adjuntos misturados com água são sujeitos a determinadas temperaturas, enquanto os enzimas atuam para degradar o amido, as proteínas e outros compostos, de forma a aumentar o rendimento do extrato solúvel e a ser produzido o mosto doce (Eaton, 2018).

Na empastagem ocorre uma série de reações bioquímicas que dependem da temperatura, pH e disponibilidade de sais presentes que terão influência na atuação dos enzimas. Consoante as matérias primas e o produto pretendido, a empastagem pode ser realizada de diferentes formas. A empastagem por infusão simples é aplicada quando apenas são utilizados maltes de alta qualidade e bem germinados e consiste na aplicação de uma única temperatura, sem agitação. A empastagem por decoção ou rampas de temperatura é utilizada para maltes menos germinados; consiste na aplicação de vários patamares de temperatura, sendo que, em cada um destes, diferentes enzimas atuam, e o aumento da temperatura pode ser realizado por aquecimento direto ou por remoção de parte do mosto, que é fervido e adicionado de volta à caldeira de empastagem (decoção) (Figura 3.5). Já a empastagem dupla é empregada em mostos que utilizem um volume considerável de adjuntos que requerem pré-cozimento, como será explicado em 3.2.2.4; uma fração do mosto rico em adjuntos é cozida numa segunda caldeira, enquanto que a primeira é sujeita a um patamar de temperatura. O aumento da temperatura é realizado por trasfega do conteúdo da segunda caldeira para a primeira (Boulton & Quain, 2001; Eaton, 2018).

Tal como mencionado, o pH da empastagem deve ser inferior a 6,0, evitando alterações na turvação e sabor da cerveja e aumentando a atividade enzimática (SCC, 2017). Isto é conseguido em parte pelos fosfatos orgânicos presentes no malte que, por ação dos fosfatases, são convertidos em fosfatos primários. Estes por sua vez reagem com o cálcio e o magnésio e

diminuem o pH, criando um efeito tampão que mantém o pH ligeiramente ácido. É assim importante a suplementação da água de fabrico com sais destes iões (Krottenthaler *et al.*, 2009).



Figura 3.5 – Caldeira de empastagem do mosto

Durante a empastagem ocorrem também processos de autooxidação lipídica e degradação enzimática de lípidos, assim como oxidação e polimerização de polifenóis com consequência no sabor da cerveja (Krottenthaler *et al.*, 2009).

Para maltes com menor germinação, utilizados para a produção de cervejas *Lager*, são utilizados vários patamares térmicos. A temperaturas de 45° C, os enzimas proteolíticos e celulíticos vão atuar, levando a uma degradação das proteínas e péptidos a aminoácidos necessários ao metabolismo da levedura e a uma degradação dos β -glucanos, hemiceluloses e gomas, diminuindo a viscosidade do mosto (Hughes & Baxter, 2001; SCC, 2017). Este patamar não pode ser muito extenso, pois pode ter efeitos nefastos, quer pela ausência de formação de espuma, quer pelo excesso de FAN. Também não pode ser muito curto, pois pode levar a baixas concentrações de FAN, insuficientes para o metabolismo da levedura. A este passo é chamado de pausa proteolítica (Krottenthaler *et al.*, 2009).

A mistura sofre depois um aquecimento (que pode ser direto, por decoção, ou por adição da mistura dos adjuntos pré-cozinhados) até a um patamar próximo dos 65° C. A esta temperatura dá-se a gelatinização do amido e os enzimas glicolíticos podem atuar nas moléculas de amido (Krottenthaler *et al.*, 2009; SCC, 2017)

O amido é composto por cerca de 25% de amilose e 75% de amilopectina. A amilose é uma molécula linear longa de cerca de 2000 unidades de glucose unidas por ligações α -1,4. Por outro lado, a amilopectina é uma molécula muito grande e ramificada, com cerca de 25 unidades de glucose por ramo, em que estas estão unidas por ligações α -1,4 e também α -1,6. O α -amilase consegue atacar as ligações α -1,4 intramoleculares da amilopectina junto às ramificações, formando dextrinas e cadeias glicosídicas longas, assim como outras ligações α -1,4

intramoleculares da amilose e das moléculas formadas. Em contrapartida, o β -amilase apenas atua nas ligações α -1,4 das extremidades não redutoras das moléculas de amido ou dextrinas, o que limita a sua atividade. Nenhum destes enzimas consegue degradar as ligações glicosídicas α -1,6 (Hughes & Baxter, 2001; Pires & Brányik, 2015).

Atingindo-se os 65° C, o β -amilase começa a atuar na quebra das ligações amilolíticas, nomeadamente, degradando a amilose e as extremidades da amilopectina. Subindo a temperatura para cerca de 75° C, o α -amilase tem a sua temperatura ótima de ação, mas o β -amilase perde parte da sua atividade por desnaturação enzimática. O α -amilase vai então atuar, “cortando” as cadeias amilolíticas, diminuindo a viscosidade do mosto e ocorrendo o processo de sacarificação, ou seja, a transformação do amido em açúcares fermentescíveis como a glucose, maltose e maltotriose (Barth, 2013; Pires & Brányik, 2015). Formam-se também pequenas dextrinas não fermentescíveis que podem ser hidrolisadas a açúcares fermentescíveis por adição de amiloglucosidase exógeno, aumentando o rendimento da empastagem (Barth, 2013). Para evitar a desnaturação enzimática podem-se adicionar enzimas amilolíticas exógenos termorresistentes. Já para ativar o α -amilase, deve-se suplementar o mosto com sais de cálcio (Boulton & Quain, 2001).

A temperatura é depois aumentada até 78° C para o mosto passar para o processo de filtração (SCC, 2017).

3.2.2.4 Caldas

A caldeira das caldas consiste no local onde ocorre um processo complementar à empastagem. Este é iniciado antes da própria empastagem (Eaton, 2018).

Adjuntos como o milho e o arroz, apesar de contribuírem com *flavours*, aumentarem a estabilidade da espuma e serem favoráveis economicamente, têm também as suas desvantagens. A baixa atividade enzimática destes adjuntos e a maior temperatura de gelatinização fazem com que tenham de ser pré-cozidos, antes de adicionados à empastagem. Assim, nesta caldeira, os adjuntos são misturados com uma pequena parte de malte, podendo-se também adicionar enzimas termoestáveis e auxiliares tecnológicos, e a mistura é submetida a um aumento de temperatura até, ao ponto de ebulição, de forma a permitir a gelatinização completa do amido (Boulton & Quain, 2001; Eaton, 2018). Na gelatinização ocorre a quebra das pontes de hidrogénio que se estabelecem entre as moléculas de amido, permitindo a penetração da água e dos enzimas, reduzindo a viscosidade. No caso do milho e arroz, esta só acontece a temperaturas acima das empregadas na empastagem, daí a importância deste passo prévio (Barth, 2013).

Após o aquecimento até à ebulição, a mistura é transferida para a caldeira de empastagem, aumentando a sua temperatura (Eaton, 2018).

3.2.2.5 Filtração do mosto

Depois da empastagem, deve-se realizar uma separação sólido-líquida em que se obtém, por um lado, os componentes do malte que foram dissolvidos durante a empastagem sobre a forma de mosto, e por outro as componentes insolúveis do malte, como as cascas e borras. Para tal, pode-se recorrer a uma cuba-filtro ou a um filtro de mosto (Krottenthaler *et al.*, 2009).

A cuba-filtro consiste num largo tanque com um fundo falso e poroso para onde o mosto é transferido. Dentro da cuba-filtro existem braços com facas que efetuam movimentos circulares ao longo da cuba, remexendo o empaste e facilitando a filtração. Os próprios sólidos do empaste atuam como filtro e o líquido é escorrido pelo fundo falso e pode ser recirculado para se obter um mosto mais límpido. Ocasionalmente, água quente é regada sobre o empaste para facilitar a lavagem deste e aumentar o rendimento do mosto, aproveitando eventuais substâncias solúveis que ainda estejam retidas na *drêche* (Boulton & Quain, 2001; Barth, 2013).

A aplicação do filtro de mosto (Figura 3.6) é mais rápida, eficiente e evita que o empaste contacte com o oxigénio. O filtro consiste numa série de placas verticais adjacentes côncavas com membranas porosas no seu exterior que, quando em contacto, formam câmaras de ar nas quais o empaste é inserido. A mistura é então prensada e o mosto doce atravessa as membranas, percorrendo um circuito até a um tanque tampão. O empaste pode ser sucessivamente lavado com água quente de forma a aproveitar-se o máximo das substâncias solúveis ainda presentes na *drêche*. As membranas podem também ser insufladas com ar, num processo de pré-compressão, o que aumenta a velocidade de filtração do mosto e torna a *drêche* mais seca (Krottenthaler *et al.*, 2009; Barth, 2013; SCC, 2017).



Figura 3.6 – Filtro de placas para mosto

A *drêche*, ou seja, os sólidos insolúveis que se depositam no fundo da cuba-filtro ou na câmara entre os placas, é um subproduto levemente humidificado que pode ser utilizado para alimentação de gado (SCC, 2017).

3.2.2.6 Fervura

O mosto doce filtrado deve de seguida passar pelo processo de fervura. É neste passo que se adiciona o lúpulo e, caso se aplique, adjuntos líquidos, como extrato de açúcar (Boulton & Quain, 2001).

A fervura, que como o nome indica, consiste em sujeitar o mosto a temperaturas de ebulição durante um período, tem vários objetivos. A aplicação de altas temperaturas permite a esterilização do mosto, matando as potenciais bactérias, fungos e leveduras selvagens que podem estar no mosto, evitando contaminações e assegurando a qualidade organolética do mosto, tal como a sua segurança alimentar (Boulton & Quain, 2001; Barth, 2013). Por outro lado, altas temperaturas permitem que os enzimas do mosto sejam desnaturados e inativados, o que em caso contrário poderia dar origem a perfis de sabor atípicos (Krottenthaler *et al.*, 2009).

No caso da adição de lúpulo não isomerizado, a fervura leva a uma isomerização dos seus α -ácidos, o que contribui para o aumento do amargor da cerveja. No entanto, a aplicação de altas temperaturas durante um longo período leva também a uma perda significativa de óleos e outros compostos aromáticos do lúpulo e a uma oxidação dos iso- α -ácidos. Desta forma, tipos de lúpulo responsáveis pelo amargor devem ser adicionados cedo e tipos de lúpulo que confirmam aromas devem ser adicionados tardiamente na fervura de forma a que se mantenham parte dos óleos aromáticos pretendidos, mas a que se volatilizem outros menos pretendidos, como o mirceno (Boulton & Quain, 2001; Krottenthaler *et al.*, 2009; Barth, 2013).

A fervura permite também uma concentração do mosto, pela evaporação da água, até ao extrato pretendido para a fermentação, corrigindo possíveis diluições com a água utilizada na lavagem da *drêche*. Por outro lado, a esta temperatura vários outros compostos voláteis não pretendidos e provenientes do malte podem ser volatilizados. O DMS é um destes compostos, com aroma a vegetais cozidos, que se forma durante a empastagem a partir da S-metilmetionina do malte (Boulton & Quain, 2001; Krottenthaler *et al.*, 2009; Barth, 2013). Durante a fervura ocorrem também reações de Maillard entre açúcares e proteínas, que resultam num escurecimento do mosto e formação de *flavours*, com alguma perda de FAN (Hughes & Baxter, 2001).

Por último, a fervura tem efeito na clarificação do mosto. Parte das proteínas do mosto coagulam nesta fase, assim como outras reagem com os polifenóis, como os taninos, e formam precipitados. O oxalato, que cria turbidez, precipita sobre a forma de oxalato de cálcio (Boulton & Quain, 2001). A formação destes precipitados e coágulos leva a uma redução do pH do mosto (SCC, 2017).

3.2.2.7 Clarificação do mosto

Terminada a fervura, o mosto fervido deve ser clarificado a quente, evitando problemas na fermentação. No casos de produção de cerveja com lúpulo na forma sólida, o mosto é filtrado de uma maneira semelhante à cuba-filtro, em que o lúpulo atua como o próprio filtro da mistura

e retém também os precipitados e proteínas coaguladas. Nos outros casos, recorre-se a uma centrifugação ou, mais comumente, ao *whirlpool* (Boulton & Quain, 2001; Hughes & Baxter, 2001).

Sobre o efeito da fervura, as proteínas do mosto perdem a sua conformação e as regiões hidrófobas tendem a agregar-se, formando coágulos que flutuam à superfície do mosto. A estes dá-se o nome de *trub* (Barth, 2013). O *whirlpool* é uma forma muito eficiente de separação do *trub*, pois consiste num tanque para o qual o mosto é bombeado tangencialmente, o que leva a um efeito hidrociclónico. Desta forma, o *trub* concentra-se no centro da base do tanque e forma um monte compacto, permitindo que o mosto clarificado abandone o *whirlpool* pela periferia do tanque, mantendo-se o cone de *trub* no tanque (Boulton & Quain, 2001; Hughes & Baxter, 2001; Barth, 2013).

3.2.2.8 Arrefecimento

A produção do mosto termina com o arrefecimento deste, de forma a que a levedura não morra aquando da sua inoculação. O arrefecimento é feito através de um permutador de placas, que consiste numa série de placas metálicas por onde o mosto e água fria são bombeados alternadamente e em contracorrente, levando a uma transferência de calor do mosto para a água de arrefecimento. A água quente pode ser depois utilizada noutra processos, poupando energia (Barth, 2013; SCC, 2017).

Durante o arrefecimento ocorre ainda uma turvação a frio, que é originada por uma nova coagulação proteica (Barth, 2013). A temperatura final pretendida para o mosto depende da levedura inoculada e do tipo de cerveja que se pretende (Eaton, 2018).

3.2.3 Fermentação

A definição de fermentação consiste na metabolização de um substrato, originando um produto, por ação de microrganismos para obtenção de energia. A fermentação cervejeira é o processo que permite transformar o mosto em cerveja. Para tal, os açúcares do mosto são transformados em etanol e CO₂, por ação da levedura, obtendo-se energia. São também formados subprodutos do metabolismo da célula, como ésteres e álcoois superiores, que vão ter um efeito substancial no *flavour* da cerveja (Kunze, 2004; Eßlinger, 2009; Pires & Brányik, 2015).

O processo da fermentação da cerveja envolve uma fase de proliferação celular, ou seja, uma fase em que a leveduras se reproduzem, aumentando entre duas a três vezes a sua massa, com libertação de energia. Para a formação da sua membrana, a levedura necessita de aminoácidos, que podem estar presentes no mosto, ou que então terá de sintetizar. É também necessária a produção de lípidos para a membrana, cuja formação está dependente da presença de oxigénio. Assim, é necessário arejar o mosto para que a síntese lipídica aconteça. A célula da

levedura precisa também de certos minerais, como o magnésio e o zinco, que atuam como cofatores (Eßlinger, 2009).

O comportamento da levedura ao longo da fermentação é variável. Inicialmente, existe uma fase *lag* em que a levedura sintetiza os compostos necessários à sua multiplicação e adapta-se ao meio. Esta fase é seguida de um crescimento exponencial, com formação de espuma, até se esgotarem os nutrientes necessários à sua multiplicação. A massa celular tende então a estabilizar, enquanto que a concentração de açúcares se torna cada vez mais baixa; nesta altura a levedura começa a flocular e sedimentar, enquanto realiza a metabolização de subprodutos como o diacetilo, durante o descanso do diacetilo. As leveduras *Lager* costumam flocular e sedimentar na base do fermentador, enquanto que as *Ale* se agregam no topo do fermentador. Com o tempo, a levedura inicia um processo de autólise devido à morte celular, algo que não é pretendido pelos *off-flavours* gerados, pelo que deve ser removida da cerveja (Boulton & Quain, 2001; SCC, 2017).

Apesar da fermentação ocorrer mais rapidamente a temperaturas mais altas, a formação de *off-flavours* é também maior, assim como a perda de etanol e dos compostos voláteis da cerveja. Desta forma, o controlo da temperatura de fermentação é exigido. A temperatura de fermentação depende do tipo de levedura utilizada, ou seja, deve ser mais baixa em leveduras *Lager* (baixa fermentação) e mais alta em leveduras *Ale* (alta fermentação), tal como explicado em 3.1.6.6. Da mesma forma, as fermentações que utilizam leveduras *Lager* costumam ser mais demoradas, visto que se dão a temperaturas mais baixas (Rodman & Gerogiorgis, 2016).

Os *flavours* que a cerveja apresenta dependem de três principais fatores: a composição do mosto, a estirpe de levedura utilizada e as condições de fermentação que são aplicadas. Desta forma, para se obter um produto homogéneo entre as várias fermentações é necessário grande controlo das condições de fermentação, assim como a utilização de uma estirpe específica de levedura, normalmente patenteada e protegida pela unidade fabril (Stewart, 2018b; Boulton, 2020).

3.2.3.1 *Pitching* e Arejamento

A fermentação é iniciada com o *pitching* da levedura, ou seja, com a inoculação da levedura no mosto. Após o arrefecimento do mosto, este é transportado em tubagens até ao fermentador. Nestas tubagens ocorre a inoculação da levedura, ou seja, levedura guardada e proveniente de fermentações anteriores ou de uma propagação de levedura é injetada e dissolvida no mosto de acordo com uma quantidade predefinida (Pires & Brányik, 2015; Eaton, 2018; Boulton, 2020). A taxa de inoculação, ou seja, a quantidade de células de levedura que são suspensas no mosto por unidade de volume, costuma situar-se entre os 15 a 20×10⁶ células por mL de mosto (Eßlinger, 2009; Pires & Brányik, 2015). A levedura injetada deve apresentar alta viabilidade e vitalidade, assim como deve ser pura, podendo-se aplicar lavagens ácidas para assegurar a ausência de outros microrganismos (Eaton, 2018).

O mosto é também arejado com ar estéril antes de ser inserido no fermentador. A concentração de oxigénio deve variar entre os 8 e os 10 ppm de forma a existir a quantidade de oxigénio necessário à proliferação celular. O mosto é então conduzido até ao fermentador e inicia-se a fermentação primária (Eßlinger, 2009; Eaton, 2018).

3.2.3.2 Tipos de fermentadores

Ao longo da História, o processo de fabrico de cerveja foi sofrendo grandes transformações tecnológicas que tiveram influência na produção desta bebida. Inicialmente, pensa-se que a cerveja tenha sido produzida em bolsas de pele e taças de madeira. Com a evolução da produção cervejeira, a cerveja passou a ser produzida em ânforas, sendo depois substituídas por barris de carvalho. Os barris foram atingindo dimensões cada vez maiores e podiam estar em posições verticais ou horizontais, passando a ser chamados de fermentadores (Kissmeyer & Oliver, 2020).

A Revolução Industrial permitiu um grande avanço nas características destes recipientes. Por um lado, surgiram novos materiais cada vez mais resistentes à pressão exercida pelos grandes volumes de cerveja produzida, resistentes aos processos de limpeza e esterilização, assim como inertes em contacto com a cerveja e sem potencial de contaminação tóxica do produto, dos quais o aço inoxidável é, atualmente, o mais comumente utilizado. Por outro lado, o surgimento da refrigeração permitiu controlar a temperatura da cerveja durante a fermentação, um processo exotérmico, reduzindo assim a formação de *off-flavours*; para isso, contribuiu o desenvolvimento de mangas de refrigeração nas paredes interiores do fermentador. Por último, o desenvolvimento de fermentadores em posições verticais, com formas geométricas distintas e fechados também permitiu vários avanços (Boulton & Quain, 2001; Kissmeyer & Oliver, 2020).

O design de um fermentador deve facilitar as várias operações que ocorrem durante a fermentação. A criação de vários tipos de fermentadores verticais, veio eliminar a necessidade da transferência da cerveja para outros fermentadores para realização de fermentação secundária, tornou os processos de limpeza mais eficientes, permitiu o isolamento de diferentes fermentadores, uma maior automatização dos processos, um coleta eficiente do CO₂ para reutilização e uma maior facilidade de recolha da levedura (Boulton & Quain, 2001; Kissmeyer & Oliver, 2020).

Os fermentadores *Asahi* são fermentadores cujo design foi desenvolvido de forma a serem utilizados como unitanques, ou seja, onde o processo de fermentação e maturação da cerveja é realizado no mesmo local. Estes têm uma estrutura cilíndrica, com uma base de grande diâmetro e um fundo inclinado que facilita a remoção da levedura. Este fermentador tem a desvantagem de não ser possível colher a levedura que se encontra sedimentada no fundo antes do seu esvaziamento, para posterior inoculação noutra mosto (Boulton & Quain, 2001; Kissmeyer & Oliver, 2020).

O tipo mais comum de fermentadores utilizados são os cilindrocônicos (Figura 3.7). Este tipo de fermentador possui uma forma cilíndrica no topo, com um cone invertido na base. O enchimento deste fermentador é feito pela base, o que permite uma eficiente dispersão da levedura pelo mosto. Durante a fermentação, a formação do CO₂ cria movimentos de ascensão da levedura, o que a mantém dispersa por todo o meio líquido. No entanto, leveduras flocculentas como as *Lager* têm tendência a sedimentar. O cone invertido na base deste fermentador permite a sedimentação da levedura, que é depois facilmente removida e utilizada para inoculação de outros mostos antes do fim da fermentação. Este passo permite poupar tempo em caso de indisponibilidade de levedura, assim como obter leveduras com maiores viabilidades e evitando a sua autólise na cerveja. A razão entre a base e altura do fermentador deve ser controlada, mas sabe-se que fermentadores mais altos criam movimentos de circulação mais fortes e conseqüentemente uma fermentação mais homogênea e eficiente (Boulton & Quain, 2001; Kissmeyer & Oliver, 2020).



Figura 3.7 – Fermentadores cilindrocônicos

A indústria cervejeira continua constantemente a inovar-se. Desta forma, uma evolução futura na fermentação pode ainda dar-se no sentido da realização de fermentações contínuas e com leveduras imobilizadas (Boulton & Quain, 2001).

3.2.3.3 Fermentação primária

A fermentação primária é o processo que se inicia após a inoculação da levedura. Esta possui uma fase aeróbia, em que a levedura consome o oxigénio do mosto para se reproduzir, e uma fase anaeróbia, em que ocorre a atenuação do mosto, ou seja, a conversão dos açúcares fermentescíveis em álcool e CO₂, assim como se formam subprodutos. Com o fim da atenuação, a temperatura é normalmente elevada durante um determinado período, o chamado descanso do diacetilo (Boulton & Quain, 2001; SCC, 2017).

3.2.3.3.1 Consumo do oxigénio

Nas primeiras 12 a 24 horas após a inoculação da levedura, considera-se que este microrganismo se encontra em fase *lag*. Nesta fase, existe uma baixa alteração na concentração de açúcares do mosto, baixa concentração de álcool e pouca alteração no número de células em suspensão. No entanto, há uma queda abrupta na concentração de oxigénio dissolvido no mosto, que se extingue após 24 horas, observando-se uma diminuição das concentrações do FAN e um aumento da concentração hidrogeniónica. A fase *lag* é assim um período de adaptação da célula, em que ela sintetiza intracelularmente os compostos necessários para a sua proliferação (Boulton & Quain, 2001).

A levedura *Saccharomyces* possui uma particularidade que a distingue dos outros organismos aeróbios facultativos. Normalmente, este tipo de organismos, na presença de oxigénio, tem preferência por utilizar a cadeia respiratória mitocondrial para a obtenção de energia – efeito de Pasteur. No entanto, em concentrações de açúcar superiores a 5 g/L, ocorre o chamado efeito de Crabtree. O efeito de Crabtree consiste no facto da levedura realizar preferencialmente fermentação alcoólica na presença de oxigénio e de açúcar. Isto dá-se, pois as altas concentrações de açúcar levam a uma repressão na produção dos enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, o que leva a que a respiração anaeróbia seja residual, por repressão catabólica. A levedura consegue assim a produção mais rápida de etanol, que é tóxico para as bactérias, ganhando desta forma uma vantagem competitiva face a estes microrganismos, provocando a morte destas. Apesar da produção de energia por fermentação ter um rendimento mais baixo, é, por outro lado, mais rápida, o que também favorece este efeito (Boulton & Quain, 2001; Tenge, 2009; Barth, 2013; Dzialo *et al.*, 2017).

O oxigénio dissolvido no mosto tem, então, uma função nutritiva para a célula. Este entra pela membrana celular por difusão facilitada e é utilizado na síntese de esteróis, como o ergosterol, e ácidos gordos insaturados, que são essenciais para a formação das membranas celulares, à fluidez e integridade destas, assim como à multiplicação da levedura. Estes lípidos encontram-se em baixas concentrações no mosto, pelo que a sua síntese é de extrema importância para uma eficiente fermentação (Tenge, 2009; Russel, 2018; Boulton, 2020). A levedura apenas consegue multiplicar-se em condições estritamente anaeróbias quando na presença destes compostos em quantidade suficiente (Boulton & Quain, 2001; Russel, 2018).

Durante a síntese lipídica, a levedura utiliza como fonte de energia as suas reservas de glicogénio (Boulton & Quain, 2001; Tenge, 2009). Após o esgotamento do oxigénio, termina a fase *lag* e a levedura começa a multiplicar-se exponencialmente por gemulação, utilizando na sua membrana os lípidos formados durante a fase aeróbia e iniciando a fermentação anaeróbia do mosto (Boulton, 2020).

3.2.3.3.2 Metabolização dos açúcares

Após as primeiras 24 horas, a taxa de fermentação aumenta. Tal pode ser observado pelo aumento do teor alcoólico e da biomassa, que é inversamente proporcional à densidade específica (Boulton & Quain, 2001).

A densidade específica é a razão entre o peso de um volume fixo de um líquido e o peso do mesmo volume de água à temperatura de 20° C. Este valor é igual a 1,0000 para a água pura. Quando o líquido possui açúcares dissolvidos, esta densidade aumenta. Por outro lado, a presença de álcool faz este valor diminuir. A densidade específica permite observar a evolução da fermentação, pois vai diminuindo com o consumo dos açúcares e com o aumento do teor alcoólico. A escala mais utilizada para observar a percentagem de açúcares dissolvidos no mosto é a escala dos graus Plato, que foi originada pela correção da antiga escala de Balling. Cada grau de Plato corresponde a 4 graus de densidade específica, ou seja, por exemplo, uma densidade específica de 1,0020 corresponde a 5° Plato (Barth, 2013; SCC, 2017; Boulton, 2020).

O mosto possui principalmente sacarose, frutose, glucose, maltose e maltotriose, para além de dextrinas. A absorção de cada um destes açúcares pela levedura é diferente. A glucose e a sacarose são os açúcares que são consumidos em primeiro lugar. A sacarose é hidrolisada em frutose e glucose pelo invertase no periplasma da célula, entre a parede e a membrana, sendo os monossacáridos resultantes transportados por difusão facilitada para o interior da célula. Tal transporte é realizado por proteínas de membrana transportadoras que têm uma maior afinidade para a glucose que para a frutose. Desta forma, a glucose é removida mais rapidamente do mosto, após o qual é removida a frutose (Boulton & Quain, 2001; Tenge, 2009; Russel, 2018).

Só quando estes monossacáridos são totalmente consumidos é que se inicia o transporte da maltose, o açúcar mais comum do mosto, e da maltotriose. Quando a concentração de glucose é mínima, inicia-se a expressão dos genes *MAL*, que codificam para as permeases responsáveis pelo transporte da maltose e da maltotriose. O transporte destes açúcares requer energia, sendo realizado por transporte ativo, envolvendo o simporte de um protão, com excreção de um ião potássio. Apesar de utilizarem os mesmos transportadores, estes têm menor afinidade para com a maltotriose, sendo que este açúcar nem sempre é totalmente removido do mosto (Boulton & Quain, 2001; Russel, 2018).

Após o *uptake* dos açúcares pela célula dá-se início à glicólise, de acordo com a via Embden-Meyerhof-Parnas (Figura 3.8). Cada molécula de glucose dá assim origem a duas moléculas de piruvato e a duas moléculas de ATP (Kunze, 2004; Barth, 2013; Nelson & Cox, 2017).

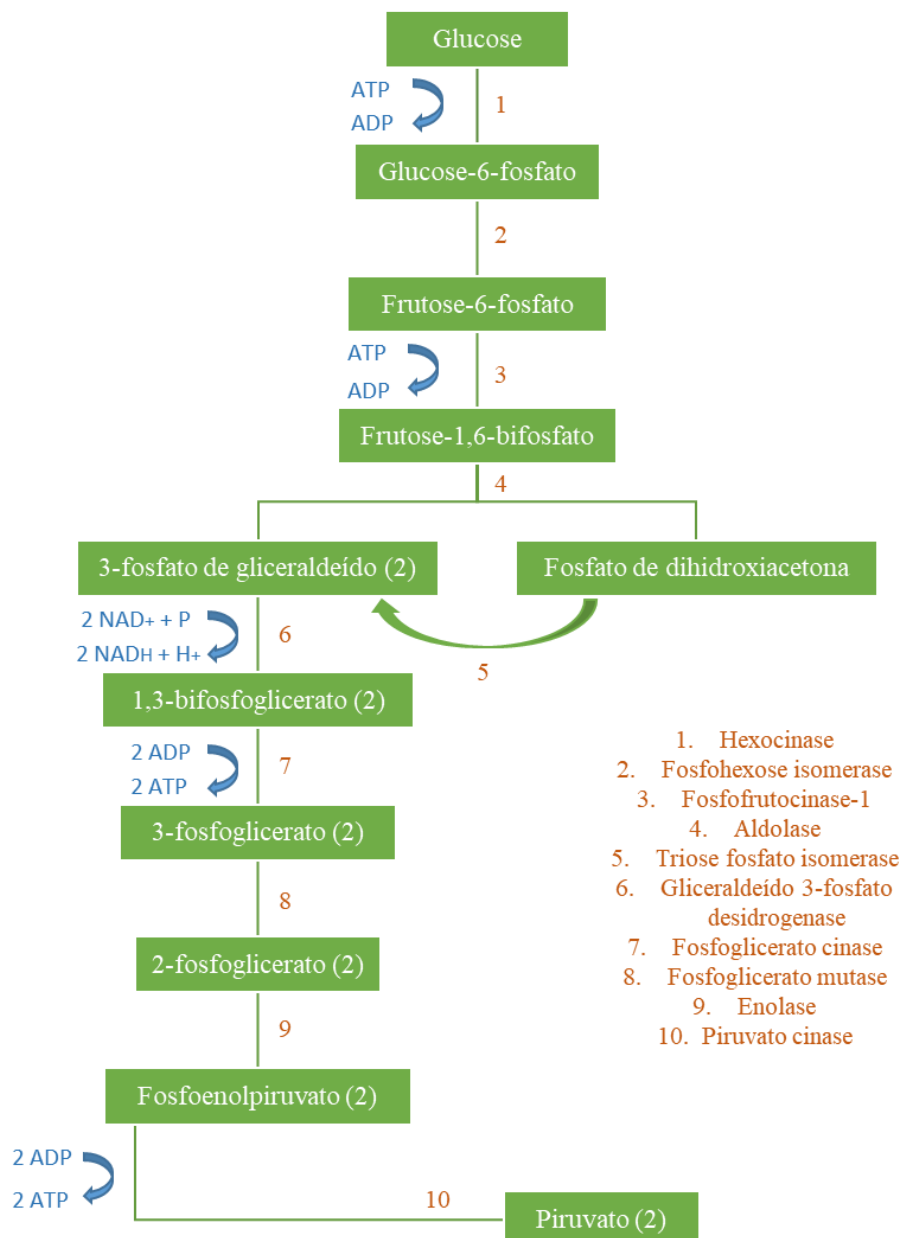


Figura 3.8 – Glicólise de acordo com a via Embden-Meyerhof-Parnas. Adaptado de Nelson & Cox (2017). **Legenda de cores:** **vermelho** – enzimas envolvidos na via; **verde** – substratos envolvidos na via; **azul** – cofatores envolvidos na via.

Para que a glicólise ocorra é necessária uma *pool* de NAD^+ na célula. Em condições de anaerobiose (ou sob efeito de Crabtree), o ciclo do ácidos tricarboxílicos não ocorre, pelo que não há regeneração do NADH a NAD^+ ; a levedura recorre então à fermentação para realizar esta reação. O piruvato formado na glicólise é ácido, pelo que a levedura tem tendência a convertê-lo em acetaldeído e CO_2 pelo piruvato descarboxilase. O álcool desidrogenase converte então o NADH a NAD^+ através de uma redução do acetaldeído a etanol. A rápida regeneração do NAD^+ por este mecanismo é uma das razões da levedura sofrer o efeito de Crabtree (Tenge, 2009; Barth, 2013; Dzialo *et al.*, 2017).

A maior parte do CO₂ formado durante a fermentação é recolhido pela unidade fabril de forma ser utilizado na gaseificação da cerveja ou para venda. Durante a fermentação primária ocorre também uma grande formação de espuma (Eßlinger, 2009; SCC, 2017).

3.2.3.3.3 Absorção dos compostos nitrogenados

Para que ocorra uma correta proliferação e atividade celular da levedura esta necessita de captar compostos nitrogenados do mosto, visto que representam 6 a 9% da massa celular (Russel, 2018). Estima-se que, no mosto, apenas 30 a 40% do nitrogénio disponível esteja sobre a forma de aminoácidos, sendo o restante pertencente a polipéptidos, proteínas e nucleótidos (Boulton & Quain, 2001; Russel, 2018). De facto, apenas os aminoácidos, alguns di- e tripéptidos e os iões amónia podem ser assimilados pela levedura, sendo essenciais para a formação de novos aminoácidos, síntese proteica, viabilidade, taxa de fermentação, tolerância ao álcool e absorção de açúcares. Os restantes compostos nitrogenados têm influência principalmente a nível da turbidez e espuma (Stewart *et al.*, 2013; Russel, 2018).

Um importante indicador da qualidade de um mosto é o FAN. O FAN, também chamado de azoto α -aminado, é dado pela soma de todos os aminoácidos livres (exceto a prolina), pequenos péptidos (di- e tripéptidos) e iões amónia, ou seja, corresponde ao nitrogénio que pode ser utilizado pela levedura para a sua atividade (Stewart *et al.*, 2013; Hill & Stewart, 2019).

A concentração de FAN é muito importante para a atividade da levedura. O FAN é o produto da degradação peptídica dos grãos utilizados no fabrico do mosto. Cerca de 70% do FAN é proveniente da atividade dos peptidases durante a germinação do malte, sendo os restantes 30% provenientes dos peptidases que estão ativos durante o processo de empastagem. A utilização de adjuntos com baixo teor de FAN obriga a um controlo das misturas utilizadas para a produção de mosto, de forma a assegurar as quantidades de FAN necessárias para uma eficiente fermentação (Lekkas, 2010; Stewart *et al.*, 2013; Hill & Stewart, 2019). A concentração de FAN no mosto deve situar-se entre os 160 e 190 mg/L de mosto (Russel, 2018). Abaixo dos 100 mg/L de mosto, o crescimento da levedura torna-se dependente dos compostos azotados, ou seja, a levedura terá um menor crescimento devido à baixa disponibilidade destes compostos, levando a uma fermentação incompleta. Em mostos de alta atenuação, pretende-se um maior teor de FAN, de forma a que ocorra uma fermentação mais eficiente. No entanto, teores de FAN elevados (>300 mg/L) levam a uma maior formação de álcoois superiores (ou de fusel) e de dicetonas vicinais, o que terá implicações no *flavour* da cerveja (Lekkas, 2010; Hill & Stewart, 2019).

A assimilação dos aminoácidos do mosto é realizada por uma série de permeases específicas para um tipo de aminoácido ou grupo de aminoácidos. No entanto, existe um grupo de permeases, as GAP, que não são específicas para nenhum tipo de aminoácido, mas cuja atividade é regulada por repressão catabólica, de forma a que a célula não absorva certos

aminoácidos que não são necessários no imediato para a célula (Boulton & Quain, 2001; Hill & Stewart, 2019).

O mosto possui 19 aminoácidos essenciais (não possui cisteína). A levedura tem tendência a absorver os aminoácidos enquanto a concentração de etanol é baixa, armazenando-os no vacúolo para posterior utilização. Isto acontece, pois as altas concentrações de etanol tornam a membrana permeável a protões, sendo que a célula necessita de exportar ativamente protões, o que a leva a terminar o transporte de aminoácidos acoplados a protões (Hill & Stewart, 2019).

Em 1964, Jones & Pierce descobriram que a absorção e utilização dos compostos nitrogenados e a sua síntese intracelular dependia da concentração de azoto assimilável no mosto, da concentração individual dos aminoácidos e do seu rácio, e da inibição competitiva da absorção destes compostos. Estes autores subdividiram então os vários aminoácidos por grupos, de acordo com a velocidade de absorção destes pela levedura, tal como apresentado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Divisão dos aminoácidos (e amónia) do mosto por grupos de acordo com a velocidade de absorção da levedura, tal como proposto por Jones & Pierce (1964).

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Ácido glutâmico	Valina	Glicina	Prolina
Ácido aspártico	Metionina	Fenilalanina	
Asparagina	Leucina	Tirosina	
Glutamina	Isoleucina	Triptofano	
Serina	Histidina	Alanina	
Treonina		Amónia	
Lisina			
Arginina			

A absorção dos aminoácidos do Grupo A é a mais rápida, sendo que os aminoácidos do Grupo B são absorvidos mais lentamente. Os aminoácidos do Grupo C são apenas absorvidos após a absorção total dos do Grupo A, enquanto que a prolina praticamente não é absorvida (Lekkas *et al.*, 2007; Lekkas, 2010; Stewart *et al.*, 2013). A prolina não é absorvida nas condições normais de fermentação, pois a sua absorção é dependente do prolina oxidase, um enzima que requer a presença de oxigénio, que já não se encontra dissolvido no mosto quando os aminoácidos dos outros grupos já foram totalmente assimilados (Lekkas, 2010; Russel, 2018).

Apesar de alguns aminoácidos terem velocidade de absorção superiores a outros, nem todos os aminoácidos são extremamente necessários para a levedura. Através de reações de transaminação, a levedura pode formar certos aminoácidos a partir de outros, a partir de açúcares do mosto, ou também utilizando o ião amónia. Desta forma, Pierce (1987) agrupou os aminoácidos pela sua natureza essencial à levedura (Tabela 3.3). Na Classe 1, Pierce agrupou os

aminoácidos cuja síntese durante o início da fermentação pode ser realizada a partir de outros aminoácidos ou a partir de açúcares do mosto, não sendo a sua concentração importante. Na Classe 2, Pierce colocou os aminoácidos cuja formação através de açúcares ou por reações de transaminação dá origem a esqueletos de carbono que são metabolizados e geram a compostos associados a *off-flavours* e conseqüentemente problemas na qualidade organolética da cerveja; estes aminoácidos devem assim estar presentes no mosto. Na Classe 3 estão agregados os aminoácidos que são essenciais para a levedura e que não podem ser sintetizados quando não se encontram no mosto (Pierce, 1987).

Tabela 3.3 - Divisão dos aminoácidos do mosto por classes de acordo com a importância para o metabolismo da levedura, tal como proposto por Pierce (1987).

Classe 1	Classe 2	Classe 3
Ácido aspártico	Isoleucina	Lisina
Asparagina	Valina	Histidina
Ácido glutâmico	Fenilalanina	Arginina
Treonina	Glicina	Leucina
Serina	Tirosina	
Metionina		
Prolina		

Durante a fermentação ocorre uma diminuição rápida do pH. Isto deve-se principalmente aos processos de absorção do FAN (que atuava como tampão), reações de transaminação, à formação de ácidos orgânicos e à excreção prótonica pela levedura (Taylor, 2018a).

3.2.3.4 Descanso do diacetilo

O crescimento exponencial da levedura termina quando os lípidos formados durante a fase aeróbia são totalmente utilizados. A população da levedura tende então a estabilizar e começa a flocular. A floculação ocorre pela ligação entre as floculinas presentes na superfície das células com os recetores de manose. A quantidade de açúcares é também agora mais baixa (Boulton, 2020).

Nesta altura, a levedura inicia a metabolização de subprodutos da fermentação, como o diacetilo. É então importante, nas cervejas *Lager*, aumentar ou manter a temperatura mais alta do que no início da fermentação primária, de forma a ocorrer a conversão do precursor do diacetilo a diacetilo, tal como será abordado de forma mais detalhada em 3.3.4. A esta fase de condicionamento a uma temperatura mais elevada, que pode ser até 20° C, é dado o nome de descanso do diacetilo ou *Ruh*. É normalmente durante esta fase que se procede à recolha da levedura floculada, que precipitou na base do fermentador, e que será utilizada para a inoculação de outros fermentadores (Boulton & Quain, 2001; SCC, 2017).

A fermentação termina, quando a redução do extrato ao longo do tempo já é mínima e a concentração de diacetilo atinge os valores aceitáveis. Nesse momento, aplica-se o chamado golpe de frio, em que a temperatura da cerveja é reduzida a temperaturas perto dos 0° C, de forma a que ocorra a precipitação das leveduras em suspensão (Hughes & Baxter, 2001; Pires & Brányik, 2015).

3.2.3.5 Centrifugação

Após o golpe de frio, o fermentador é esvaziado e a cerveja “verde” é encaminhada para tanques onde procederá à maturação. No entanto, para evitar dificuldades na filtração da cerveja, assim como *off-flavours* produzidos pela autólise da levedura, a cerveja deve passar por uma centrifugação (Boulton & Quain, 2001).

A cerveja “verde” é então introduzida numa centrífuga de forma cilíndrica com vários discos. Ao ser sujeita a forças centrípetas, a cerveja clarificada abandona a centrífuga pelo topo, enquanto que os sólidos ficam retidos nos discos e migram do centro para o exterior, acumulando-se nas paredes da centrífuga. A cada período, a centrífuga dispensa os sólidos acumulados, permitindo o tratamento de um novo volume de cerveja (Boulton & Quain, 2001).

3.2.4 Maturação

A maturação ou fermentação secundária é um processo que ocorre em tanques diferentes dos utilizados na fermentação primária. Durante esta fase, a cerveja centrifugada é mantida a temperaturas entre -2 e 0° C durante um período de tempo que pode ir até várias semanas (Boulton & Quain, 2001; Pires & Brányik, 2015).

A maturação tem três principais objetivos. A manutenção da cerveja a baixas temperaturas leva a uma formação de complexos polifenol-polipéptido que são coloides e causam turvação. Ao longo do tempo, estes coloides, tais como alguma levedura residual que se encontre na cerveja, acabam por precipitar, o que ajuda a clarificar a cerveja. Por outro lado, a maturação ajuda a um ajuste final dos *flavours* da cerveja. Em menor extensão, a maturação permite uma carbonatação da cerveja por saturação desta com CO₂; a formação deste composto será, no entanto, residual devido à baixa presença de levedura no meio (Boulton & Quain, 2001; SCC, 2017; Eaton, 2018).

3.2.5 Filtração

A maior parte das cervejas produzidas industrialmente requer uma clarificação para evitar a turvação da bebida e formação de depósito, e para aumentar o tempo de prateleira. Para tal, recorre-se à filtração da cerveja utilizando-se auxiliares de filtração, como o chamado *kieselguhr* (Boulton & Quain, 2001; Eaton, 2018).

Durante a filtração são usadas membranas porosas entre as quais o pó de *kieselguhr* é inserido. Parte deste pó é também dissolvido na cerveja, que atravessa depois os vários filtros. Os

coloides ficam retidos nos poros da rocha que, por sua vez, forma uma espécie de bolo semi-sólido que não atravessará as membranas. Obtém-se assim uma cerveja límpida (Boulton & Quain, 2001; Eaton, 2018).

3.2.6 Pasteurização e Enchimento

Antes do enchimento das garrafas ou barris de cerveja, é necessário garantir a esterilidade do produto. Desta forma, assegura-se a ausência de microrganismos patogénicos na cerveja, a segurança do alimento e a estabilidade da cerveja ao longo do tempo. Para tal, recorre-se a uma pasteurização (Boulton & Quain, 2001).

A pasteurização *flash* da cerveja é realizada quando esta vai ser embalada em barris, assegurando um menor tempo de prateleira. Este tipo de pasteurização é muito rápido e consiste na passagem da cerveja por permutadores de calor. A temperatura da cerveja é aumentada até 70° C durante 20 a 30 segundos, após os quais é arrefecida de novo pelo permutador. A pasteurização por túnel é utilizada para garrafas ou latas de cerveja. Este tipo de pasteurização é realizado após acondicionamento e o produto é aquecido com jatos de água quente (60° C) por um período de 10 a 20 minutos, o que a torna mais lenta (Boulton & Quain, 2001).

Consoante o destino final da cerveja, esta pode ser acondicionada de várias formas. Quando acondicionada em barril, a cerveja é normalmente inserida em grandes recipientes de aço inoxidável, com os quais se deve acompanhar um barril de CO₂ para proceder à recarbonatação da bebida, quando aberto o barril. É também tradicionalmente consumida em garrafas de vidro escuro, que a protegem da radiação solar e da formação de *off-flavours*. Por outro lado, um popular método de acondicionamento desta bebida é em latas, principalmente de alumínio. Tanto para as garrafas, como para as latas, a cerveja deve ser recarbonatada antes do enchimento, para se usufruir da melhor experiência possível (Eaton, 2018).

3.3 Formação de *flavours*

O sabor e aroma finais de uma cerveja são o resultado dos tipos de matérias primas utilizadas, dos processos de brassagem aplicados, da levedura utilizada, do controlo da fermentação e do acondicionamento efetuado. Se muitos dos *flavours* caramelizados, torrados e doces são fornecidos pelo tipo de malte utilizado e pelas condições de fervura do mosto, *off-flavours* podem ser produzidos por um ineficiente controlo da fermentação ou mau acondicionamento, que provoque degradação microbiológica. Dos compostos voláteis que conferem *flavour* produzidos pela própria levedura durante a fermentação, os álcoois superiores, os ésteres, o dióxido de enxofre e as dicetonas vicinais são os que apresentam uma maior importância (Boulton & Quain, 2001; Russel, 2018).

3.3.1 Álcoois superiores

Os álcoois superiores ou de fusel são uma classe de compostos voláteis produzidos pela levedura e presentes na cerveja que dão origem a uma variada gama de *flavours*. Os que se encontram em maior abundância na cerveja e cuja concentração é suficiente para se atingir o limiar de deteção são o n-propanol (*flavour* de solvente), isobutanol (*flavour* alcoólico), álcool isoamil (*flavour* frutado, a banana) e 2-feniletanol (*flavour* floral, a rosa) (Saerens *et al.*, 2008; Swiegers *et al.*, 2016; Dzialo *et al.*, 2017).

A formação máxima dos álcoois superiores coincide quando a concentração de FAN é mínima e a multiplicação da levedura termina (Brányik *et al.*, 2008). A biossíntese destes compostos envolve a descarboxilação de α -cetoácidos para formar aldeídos, seguidos de uma redução dos mesmos aos álcoois correspondentes (Saerens *et al.*, 2008, Tenge, 2009). A formação dos α -cetoácidos pode dar-se por uma via catabólica (Erhlich) ou anabólica. A via de Erhlich dá-se quando um aminoácido é convertido no seu respetivo α -cetoácido por ação de um transaminase, que transfere o seu grupo amina para outro aminoácido (Dzialo *et al.*, 2017; Ferreira & Guido, 2018; Hill & Stewart, 2019). A via anabólica consiste na formação dos α -cetoácidos através da glucose como intermediários da síntese dos aminoácidos (Saerens *et al.*, 2008; Ferreira & Guido, 2018; Hill & Stewart, 2019).

A produção de álcoois superiores está intimamente ligada com o metabolismo dos aminoácidos e, conseqüentemente, com o crescimento celular. As altas temperaturas de fermentação, a abundância de lípidos, a elevada oxigenação e os altos teores de FAN estão assim relacionados com a produção destes compostos (Saerens *et al.*, 2008). Maiores pressões de CO₂ podem levar, pelo contrário, a uma menor formação destes compostos voláteis (Rice *et al.*, 1977).

3.3.2 Ésteres

Os ésteres são outra classe de compostos orgânicos voláteis produzidos pela levedura durante a fermentação que têm um papel importantíssimo no *flavour* da cerveja, tendo *flavours* principalmente frutados. Dos ésteres mais importantes e cujo limiar de deteção é atingido na cerveja, temos o isoamil acetato (*flavour* a banana) e o etil hexanoato (*flavour* a maçã ácida), mas vários outros ésteres podem ter um efeito sinérgico (Saerens *et al.*, 2008; Swiegers *et al.*, 2016).

A formação dos ésteres é dependente da presença de álcoois superiores, pelo que se atinge a produção máxima destes compostos após o fim da proliferação celular, quando a concentração de álcoois superiores é elevada. Os ésteres são o produto de aciltransferases que catalisam uma reação de condensação entre uma molécula de acetil-CoA ou acil-CoA e um álcool superior ou etanol (Brányik *et al.*, 2008; Ferreira & Guido, 2018). O resultado são dois tipos de ésteres: os ésteres de acetato (provenientes do acetil-CoA) e os ésteres etílicos de ácidos gordos (acil-CoA). Os ésteres de acetato devido ao seu tamanho reduzido atravessam facilmente a membrana da célula, sendo os que contribuem principalmente para os *flavours* (Dzialo *et al.*, 2017).

A produção de ésteres é extremamente dependente da estirpe de levedura utilizada, sendo que as leveduras *Ale* produzem maior quantidade destes compostos. Uma alta oxigenação do mosto leva a uma menor concentração de acetil-CoA, o que terá um impacto negativo na formação destes compostos. Altas temperaturas de fermentação permitem ainda uma maior produção de ésteres (Saerens *et al.*, 2008; Brányik *et al.*, 2008). Maiores pressões de CO₂ podem levar, pelo contrário, a uma menor formação destes compostos voláteis (Rice *et al.*, 1977).

3.3.3 Dióxido de enxofre

O dióxido de enxofre é um antioxidante natural da cerveja que ajuda à estabilização da mesma. A concentração máxima legal deste composto deve ser inferior a 10 mg/L (Ferreira & Guido, 2018). Em altas concentrações este associa-se a compostos com *flavours* relacionados com o envelhecimento da cerveja (Russel, 2018).

A formação deste composto está ligada com o crescimento celular: quanto maior o crescimento, menor a formação de SO₂. Durante o crescimento da célula, esta realiza o transporte ativo dos sulfatos do mosto, que reduz enzimaticamente a sulfitos para serem utilizados na síntese de aminoácidos sulfurados. Se a levedura parar o seu crescimento, os sulfitos são excretados e forma-se o dióxido de enxofre (Tenge, 2009).

3.3.4 Diacetilo e 2,3-pentanodiona

Uma das classes mais importantes de compostos que se formam na fermentação e que têm influência tanto no *flavour* final da cerveja, como no processo cervejeiro em si são as dicetonas vicinais (VDK – *vicinal diketones*). As duas principais dicetonas vicinais que se formam na cerveja e cuja importância é enorme para a qualidade do produto são o diacetilo, também chamado de 2,3-butanodiona, e a 2,3-pentanodiona (Figura 3.9). Ambas são subprodutos da biossíntese de aminoácidos, nomeadamente a valina e a isoleucina, respetivamente (Boulton & Quain, 2001; Tenge, 2009; Krogerus & Gibson, 2013a). Apesar de poderem estar levemente presentes nos *flavours* de algumas cervejas, as dicetonas vicinais são praticamente sempre consideradas como *off-flavours*, sendo que a sua formação não é pretendida (Hughes & Baxter, 2001; Krogerus & Gibson, 2013a).

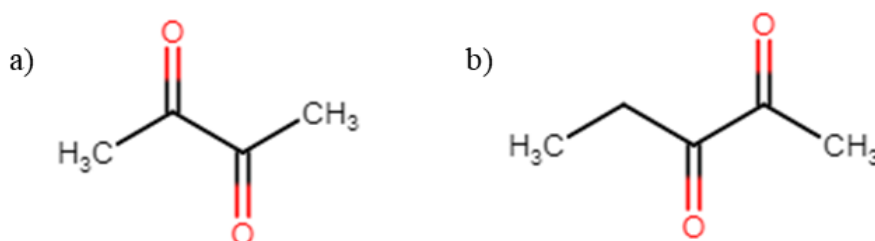


Figura 3.9 – Estrutura química do diacetilo (a) e da 2,3-pentanodiona (b).

O diacetilo forma-se como intermediário da síntese anabólica da valina pela levedura. É descrito como tendo um *flavour* a *butterscotch*, semelhante à manteiga (Saerens *et al.*, 2008; Krogerus & Gibson, 2013a; Ferreira & Guido, 2018; Taylor, 2018b). De facto, o diacetilo está naturalmente presente na manteiga e é usado como aromatizante em indústrias de produção de pipocas com sabor a este laticínio. Foi baseado em estudos nestas fábricas que se descobriu que o diacetilo apresenta um perigo ocupacional, estando relacionado com a bronquiólite obliterante, uma doença do trato respiratório (Shibamoto, 2014; Clark & Winter, 2015; Anders, 2017; Hubbs *et al.*, 2019). Atualmente, estudos têm sido realizados para analisar o impacto da utilização do diacetilo como aromatizante em cigarros eletrónicos e a sua potencial nocividade (Anders, 2017; Malgorzata *et al.*, 2020).

O limiar de deteção do diacetilo tem sido apontado como 0,1 a 0,2 ppm em cervejas *Lager* e de 0,1 a 0,4 ppm em cervejas *Ale* (Wainwright, 1973; Krogerus & Gibson, 2013a). No entanto, já foram reportados limiares de deteção tão baixos como de 0,017 ppm (Saison *et al.*, 2009). Apesar de em algumas *Ale* o diacetilo contribuir para o palato final da cerveja e do seu aroma, nas *Lager* este composto é altamente indesejado, devendo sempre ser mantido abaixo do limiar de deteção no produto final; em cervejas mais leves, sem *flavours* intensos a lúpulo e a malte este composto é mais facilmente distinguido (Boulton & Quain, 2001; Krogerus & Gibson, 2013a; Taylor, 2018b). Níveis excessivos de diacetilo na cerveja podem ser indicadores de contaminação microbiológica por *Pediococcus* e *Lactobacillus* e tal pode ser confirmado caso os níveis de 2,3-pentanodiona sejam baixos, em comparação com os teores de diacetilo (Wainwright, 1973; Hughes & Baxter, 2001; Shibamoto, 2014; Russel, 2018).

A 2,3-pentanodiona forma-se como intermediário da síntese anabólica da isoleucina pela levedura. O seu *flavour* é descrito como semelhante ao do diacetilo, mas mais semelhante ao do caramelo e do mel (Saerens *et al.*, 2008; Krogerus & Gibson, 2013a; Ferreira & Guido, 2018). Tal como o diacetilo, é considerada como perigosa para o trato respiratório e associada ao desenvolvimento de doenças neste por exposição ocupacional (Anders, 2017; Hubbs *et al.*, 2019; Malgorzata *et al.*, 2020). O limiar de deteção da 2,3-pentanodiona tem sido relatado entre os 0,9 a 1,0 ppm, ou seja, muito superior ao do diacetilo, o que a torna muito menos importante para o palato da cerveja, não sendo geralmente um problema (Krogerus & Gibson, 2013a).

3.3.4.1 Mecanismo de formação e degradação

Como já referido, o diacetilo e a 2,3-pentanodiona são produtos secundários da síntese de valina e isoleucina pela levedura (Figura 3.10). Durante o crescimento celular, a célula necessita destes aminoácidos para síntese proteica e enzimática. No entanto, o *uptake* da valina e isoleucina do mosto não é suficiente para suprimir a necessidade destes aminoácidos. A célula vai então sintetizar estes compostos na sua mitocôndria, por anabolismo. A partir do piruvato, a levedura vai produzir um precursor do diacetilo, o α -acetolactato, enquanto que a partir da treonina a

levedura vai produzir o α -acetohidroxitirato, o precursor da 2,3-pentanodiona (Tenge, 2009; Lekkas, 2010; Krogerus & Gibson, 2013a; Pires & Brányik, 2015).

No início da fermentação, a formação do α -acetolactato e do α -acetohidroxitirato é superior à sua metabolização pela via de síntese dos respectivos aminoácidos. Desta forma, a levedura excreta estes dois compostos para o mosto em fermentação, criando uma *pool* destes. No mosto, os precursores sofrem uma reação de descarboxilação espontânea, com libertação de CO_2 , formando-se o diacetilo a partir do α -acetolactato, e a 2,3-pentanodiona a partir do α -acetohidroxitirato. A ocorrência deste reação é favorecida pelo aquecimento do mosto em condições anaeróbicas (Tenge, 2009; Dzialo *et al.*, 2017; Russel, 2018).

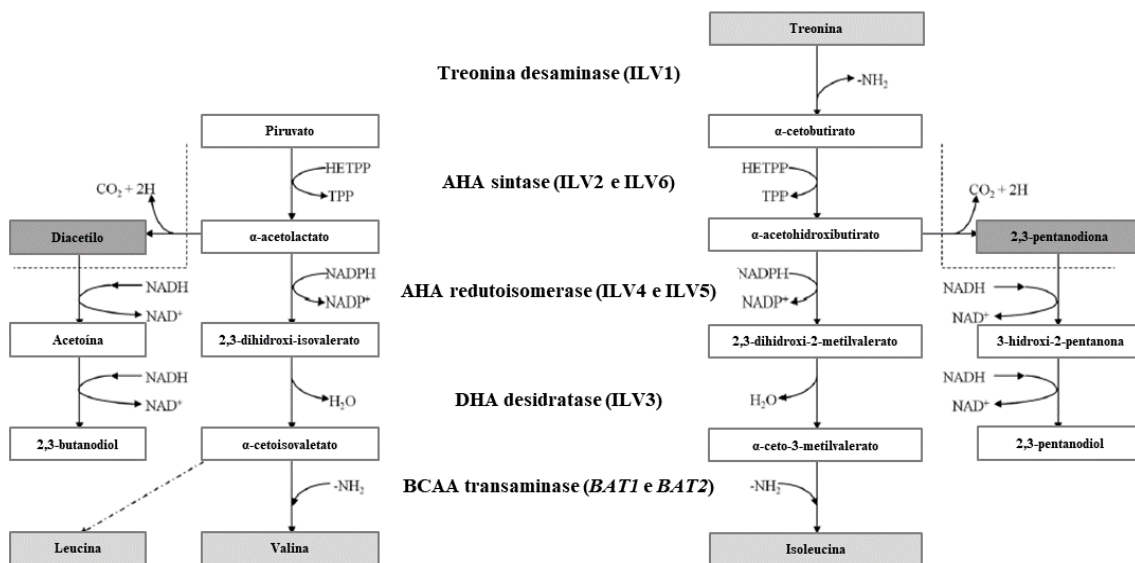


Figura 3.10 – Via metabólica da síntese da valina e da leucina, com formação e redução do diacetilo e da 2,3-pentanodiona na levedura *Saccharomyces* spp.. AHA – acetohidroxiácido; DHA – dihidroxiácido; BCAA – *branched chain aminoacid* (aminoácido de cadeia ramificada). Adaptado de Krogerus & Gibson (2013).

Apesar da grande excreção dos precursores das VDK que ocorre, a quantidade real de diacetilo e 2,3-pentanodiona no mosto costuma manter-se muito baixa. Isto, porque a reação de descarboxilação espontânea é lenta, tornando-se um passo limitante à formação destes compostos. Desta forma, a concentração dos seus precursores aumenta no mosto enquanto a síntese de valina e isoleucina se dá na célula. No entanto, dando-se a reação de descarboxilação, o diacetilo e a 2,3-pentanodiona voltam a entrar na célula e a levedura assimila-os facilmente (Inoue & Yamamoto, 1969; Taylor, 2018b).

Dentro da célula, o diacetilo sofre a ação de diacetilo redutases, sendo reduzido a acetoína e posteriormente a 2,3-butanodiol, por acetoína redutases. Estes dois compostos possuem um limiar de deteção muito superior ao do diacetilo, na ordem dos 4500 ppm. Desta forma, estes deixam de contribuir para o palato e *flavour* da cerveja, eliminando-se o problema (Taylor,

2018b). A redução das dicetonas é também favorável, pois permite à levedura a regeneração da sua *pool* de NAD⁺ (de Revel & Bertrand, 1994).

A redução do diacetilo pela levedura foi estudada por Boulton e Box (2003), que injetaram no mosto em fermentação 1 ppm de diacetilo; este foi rapidamente metabolizado pela levedura, o que confirma que o passo limitante para a redução do diacetilo é a reação de descarboxilação do seu precursor. A reação de redução do diacetilo pela levedura é assim 10 vezes mais rápida que a reação de descarboxilação do α -acetolactato. Tradicionalmente, para acelerar esta segunda reação, o mosto é sujeito ao descanso do diacetilo, uma fase da fermentação em que se aumenta a temperatura do mosto de forma a reduzir o tempo necessário para se obter a concentração de diacetilo pretendida (Petersen *et al.*, 2004).

A ausência de diacetilo na cerveja, por si só, não permite garantir a qualidade do produto final. Se o α -acetolactato estiver presente em altas quantidades na cerveja e se se interromper a fermentação antes da sua *pool* ser bastante reduzida, a descarboxilação do mesmo vai continuar a ocorrer durante a maturação. Quando a cerveja é sujeita ao processo de pasteurização e se, quando engarrafada, for mantida em ambientes quentes, o diacetilo vai formar-se em grandes concentrações, levando a um forte aroma a manteiga e deterioração da qualidade do produto (Wainwright, 1973). Como tal, deve ser quantificada na fermentação a concentração de diacetilo e dos seus precursores, em vez de apenas o diacetilo, ou seja, o diacetilo total ou potencial. É a partir da soma da concentração destes compostos que se deve dar a ordem de terminar a fermentação. Só desta forma se permite obter um produto de qualidade e livre deste *off-flavour* (Krogerus & Gibson, 2013a; Russel, 2018; Taylor, 2018b).

3.3.4.2 Importância da concentração de FAN e da valina

A formação das VDK está intimamente ligada com a disponibilidade do FAN e da valina durante a fase *lag* e de proliferação celular. Tal como explicado em 3.2.3.3.2, a absorção dos vários aminoácidos pela levedura é efetuada a diferentes velocidades e com diferentes preferências (Jones & Pierce, 1964; Krogerus & Gibson, 2013a). A valina é um aminoácido do Grupo B, o que leva a que não seja prioritariamente absorvida pela levedura. Nas primeiras 12h, o *uptake* da valina é muito baixo, visto que estão a ser absorvidos prioritariamente os aminoácidos do Grupo A (Garcia *et al.*, 1994). Sabe-se também que a valina é dos aminoácidos com maior fase *lag* até começar a ser absorvida. Desta forma, a levedura recorre à síntese anabólica da valina, o que leva à formação do α -acetolactato (Romkes & Lewis, 1971; Pires & Brányik, 2015).

O importe da valina é realizado pelas permeases Gap1p, Bap2p, Bap3p e Tat1p por transporte ativo com simporte protónico. No entanto, nenhuma destas proteínas é específica apenas para a valina, sendo que ocorre competição com outros aminoácidos (Pires & Brányik, 2015). Na presença de altas concentrações de valina o acetohidroxiácido sintase é inibido. Este enzima é o responsável pela conversão do piruvato a α -acetolactato, pelo que deixa de se formar na célula o

precursor do diacetilo (Inoue *et al.*, 1973; Petersen *et al.*, 2004; Brányik *et al.*, 2008). O estudo desenvolvido por Krogerus & Gibson (2013b) demonstrou que a suplementação do mosto com valina pode inibir fortemente a produção de diacetilo; no entanto, a quantidade de valina necessária para a suplementação pode não ser economicamente viável para a unidade fabril, devendo-se analisar o custo da suplementação em relação ao custo da prolongação da fermentação.

A concentração total do FAN tem uma importância considerável na produção de diacetilo, pois tem uma influência direta na concentração de valina (Brányik *et al.*, 2008). Em mostos com uma concentração adequada de FAN (150-210 mg/L) a concentração de diacetilo descreve uma curva, em que inicialmente há um aumento do diacetilo total, atinge-se um pico, e a sua concentração começa a baixar (Petersen *et al.*, 2004). A formação deste pico tem uma explicação lógica: antes do início do *uptake* da valina, ou seja, durante a absorção dos aminoácidos do Grupo A, o α -acetolactato forma-se na célula e a sua *pool* aumenta no mosto. Quando a concentração de aminoácidos do Grupo A é baixa e se inicia o *uptake* dos aminoácidos do Grupo B, onde se insere a valina, a célula deixa de metabolizar a valina por via endógena, visto que as concentrações no mosto são suficientes para a sua necessidade metabólica. A levedura deixa assim de produzir o α -acetolactato e começa a reduzir o diacetilo do mosto mais rapidamente do que o produz, o que leva a uma diminuição deste composto (Boulton & Quain, 2001; Krogerus & Gibson, 2013a).

Mostos com uma concentração baixa de FAN (<100 mg/L) foram considerados como limitadores para o crescimento da levedura, pois a utilização de baixas concentrações de FAN leva à formação de dois picos de diacetilo em vez de apenas um. Neste tipo de mostos, o α -acetolactato forma-se também durante a absorção dos aminoácidos do Grupo A, atingindo um primeiro pico de concentração durante esta fase. No entanto, como a concentração de FAN é baixa, esta absorção é rápida, passando a valina a ser absorvida de seguida. Durante a absorção de valina, a célula passa a metabolizar o diacetilo, observando-se um ligeiro decréscimo na sua concentração. No entanto, a valina acaba por se esgotar rapidamente; isto leva a que a síntese deste aminoácido tenha de ocorrer novamente, o que leva à formação de um segundo pico mais pronunciado que o primeiro e que ocorre mais tarde, atrasando assim a fermentação (Boulton & Quain, 2001; Petersen *et al.*, 2004).

Mostos com alto teor de FAN (>210 mg/L) também foram considerados como prejudiciais para a qualidade da cerveja (Krogerus *et al.*, 2015). Altas concentrações de FAN não só estão associadas a uma maior produção de ésteres e de álcoois superiores, que podem fornecer *flavours* indesejados, como têm influência na concentração de diacetilo observada. A existência de uma maior concentração total de aminoácidos leva a que também haja uma maior concentração de aminoácidos do Grupo A no mosto (Boulton & Quain, 2001). Assim, o período de absorção destes aminoácidos é prolongado, o que leva a que a síntese de valina também ocorra durante mais tempo. Desta forma, observa-se a ocorrência de um pico de diacetilo mais elevado e mais

prolongado e, por consequência, é necessário um maior tempo de fermentação para que se atinjam os valores pretendidos para a concentração deste composto (Boulton & Quain, 2001; Sampaio, 2004).

3.3.4.3 Influência do pH

O pH do mosto tem grande importância na concentração de diacetilo formado e reduzido, pois tem influência no crescimento da levedura (e consequente síntese de aminoácidos), na reação espontânea de descarboxilação do α -acetolactato a diacetilo, e ainda na atividade dos enzimas responsáveis pela redução do diacetilo pela levedura (Garcia *et al.*, 1994; Krogerus & Gibson, 2013a; Taylor, 2018b).

Quanto ao crescimento da levedura, observou-se que a pH's mais baixos a célula produz mais transcritos dos genes *BAP2* e *BAP3*, que codificam para permeases de alta afinidade para a leucina e transportadores de valina (Schoondermark-Stolk *et al.*, 2005). Isto poderá levar a um maior *uptake* de valina do mosto e consequentemente a uma menor formação de diacetilo na fermentação (Krogerus & Gibson, 2013a).

Quanto à reação de descarboxilação do α -acetolacto, sabe-se que com a diminuição do pH do mosto a velocidade da reação espontânea é aumentada, formando-se diacetilo mais rapidamente (Branen & Keenan, 1972; Krogerus & Gibson, 2013a; Ferreira & Guido, 2018). Este aumento da velocidade não é linear com a redução do pH, mas apresenta um comportamento exponencial. Desde que mantidos os pH's adequados à cerveja e ao seu palato, a taxa de conversão do diacetilo vai assim aumentando bastante com a redução deste parâmetro (Branen & Keenan, 1972; Haukeli & Lie, 1978). Tal foi explicado, pois o α -acetolactato em pH's mais altos tem tendência a sofrer efeitos mesoméricos no seu grupo carboxilato, o que o torna mais estável e menos propício a sofrer descarboxilação (Inoue & Yamamoto, 1970; Rondags *et al.*, 1996).

Quanto à atividade dos enzimas, um pH mais baixo foi dado como ótimo para a atuação do diacetilo redutase, o que aumenta a taxa de conversão do diacetilo a acetoína, tornando a remoção do diacetilo do mosto mais rápida (Bamforth & Kanauchi, 2004).

Desta forma, deve-se procurar obter um pH inicial do mosto o mais baixo possível, desde que se mantenha o palato pretendido e as especificações legais da mesma, pois o seu efeito na redução do diacetilo na cerveja é evidente (Krogerus *et al.*, 2015).

3.3.4.4 Influência da temperatura

A temperatura é considerada como um fator com elevada importância para a concentração de diacetilo na cerveja e o tempo de fermentação. Como já referido, a temperatura é aumentada, principalmente em *Lager*, no final da fermentação, no chamado descanso do diacetilo. Isto está intimamente ligado com o facto da reação de descarboxilação do α -acetolactato a diacetilo ser mais rápida com o aumento da temperatura, levando a uma consequente conversão do diacetilo mais cedo na fermentação (Taylor, 2018b).

O efeito da temperatura tem efeito também na própria levedura. Um aumento da temperatura de fermentação está também associado a uma maior produção inicial de α -acetolactato como consequência de um crescimento mais acelerado e maior da levedura. No entanto, forma-se também mais massa celular disponível para a remoção do diacetilo do mosto. Por outro lado, o passo limitante da descarboxilação pode anular o efeito do aumento da biomassa (Boulton & Box, 2008; Krogerus & Gibson, 2013a). De acordo com de Medeiros (2010), uma redução na temperatura de fermentação primária e um aumento da temperatura do descanso de diacetilo têm como consequência uma redução no tempo de fermentação total.

3.3.4.5 Influência da levedura

As características da levedura em si têm uma grande influência na produção de diacetilo. Diferentes estirpes podem ter diferentes comportamentos em relação à formação e redução deste composto, sendo que podem apresentar maiores ou menores picos de concentração e possuir uma capacidade mais alta ou baixa de o remover do mosto. Uma diferença considerável é observada entre leveduras *Ale* e *Lager* (Haukeli & Lie, 1972; Brányik *et al.*, 2008).

Nas cervejas *Ale* o diacetilo não costuma ser um problema; não só o limiar de detecção deste composto é mais alto nestas cervejas devido à maior presença de ésteres que o mascaram, como a fermentação é realizada a temperaturas mais altas, que permitem uma conversão mais rápida do α -acetolactato a diacetilo. Por outro lado, este tipo de levedura tem tendência a manter-se suspensa mais tempo e acumula-se no topo do fermentador, aumentando o contacto da levedura com o meio e reduzindo o diacetilo mais rapidamente. As altas temperaturas permitem também uma fermentação mais efusiva, com um *uptake* do diacetilo mais rápido pela alta atividade da levedura (Taylor, 2018b).

Nas cervejas *Lager* o diacetilo já é um problema. Este tipo de levedura fermenta a temperaturas mais baixas, o que não favorece a conversão do α -acetolactato, sendo necessário aplicar um aumento de temperatura (descanso do diacetilo) após a fermentação mais efusiva. Este aumento da temperatura pode desencadear alterações organoléticas na cerveja e problemas com a viabilidade da levedura, provocando a sua autólise (Taylor, 2018b). Por outro lado, baixas temperaturas de fermentação também tornam a fermentação mais lenta e a levedura menos ativa, sendo mais vagarosa a redução do diacetilo a acetoína. Por fim, este tipo de levedura costuma ser mais floculenta; a levedura forma ligações entre outras leveduras, criando aglomerados que vão precipitar na base do fermentador. Desta forma, a levedura em suspensão é reduzida drasticamente, havendo menos levedura em contacto com o mosto e menos disponível para realizar a conversão do diacetilo (Verstrepen *et al.*, 2003).

A floculação da levedura tem influência na quantidade de células em suspensão disponíveis para a redução do diacetilo do mosto. Tal como explicado anteriormente, a floculação é o resultado da ligação das floculinas da levedura aos mananos da parede celular. Na presença

de compostos nitrogenados e de açúcares, é inibida a transcrição dos genes *FLO*, responsáveis pela produção das floculinas. No entanto, com o término da multiplicação celular e o gasto destes compostos, a floculina é expressa. Um fraco arejamento do mosto leva a uma floculação precoce, enquanto que leveduras mais velhas também tendem a flocular prematuramente (Verstrepen *et al.*, 2003).

Uma lavagem ácida da levedura, que leva a uma menor floculência e viscosidade desta, foi também apontada como tendo influência no diacetilo. A redução na floculência deve-se principalmente a alterações na parede celular, como na hidrofobicidade, carga e conformação. De facto, quando acidificada, a levedura realiza uma mais rápida redução do diacetilo do meio devido a encontrar-se mais suspensa no mosto, atingindo as concentrações pretendidas mais rapidamente (Wilcocks & Smart, 1995; de Medeiros, 2010).

Quanto ao efeito da idade e geração da levedura sobre a remoção do diacetilo, a tendência é para que leveduras mais velhas deem origem a cervejas com mais diacetilo. Foi sugerido que o *stress* fisiológico a que a levedura é sujeita após várias divisões pode levar a alterações das propriedades da membrana celular da levedura e a uma maior floculação (Verstrepen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2019). Foi também observado que a concentração de dicetonas vicinais aumenta com a geração, ou seja, com o número de fermentações a que a levedura é sujeita (Carpentier *et al.*, 1991). A levedura ao longo da fermentação vai diminuindo a sua taxa de redução do diacetilo, taxa esta que é dependente da própria concentração de diacetilo no momento. Desta forma, quanto mais baixos os valores de diacetilo, também é menor a capacidade da célula de o remover do meio. Foi sugerido que tal aconteça ou por alterações no transporte do diacetilo pela membrana ou por inibição dos diacetilo redutases (Boulton & Box, 2008). O investigador Tolls e os seus colaboradores (1970) reportaram uma diminuição da atividade do diacetilo redutase com o aumento da percentagem de etanol, o que fortalece a hipótese anterior.

A taxa de inoculação da levedura também tem influência no perfil do diacetilo. Uma grande taxa de inoculação leva a uma redução rápida do FAN do mosto e consequentemente da valina. Desta forma, o pico de diacetilo atinge-se mais cedo e a sua redução também vai ocorrer mais cedo, sendo possível encurtar a fermentação (Wainwright, 1973). Também vão estar mais células em suspensão para remover o diacetilo. Por outro lado, uma baixa taxa de inoculação da levedura obriga a uma maior multiplicação celular, o que também provoca uma maior síntese de aminoácidos e consequentemente de diacetilo. Deve-se então procurar um equilíbrio na taxa de inoculação (Saerens *et al.*, 2008).

O crescimento mais rápido da levedura, na existência de condições favoráveis, tem estado associado a um aumento na produção de diacetilo. O aumento da taxa de arejamento em si, ou seja, o aumento da concentração de oxigénio, não costuma estar associado a uma maior produção deste composto. No entanto, este vai contribuir para uma maior proliferação celular e

consequentemente um maior pico do diacetilo (Portno, 1966). O mesmo foi observado quando na presença de uma elevada concentração de lípidos no mosto (Carpentier *et al.*, 1991).

Em fermentações onde leveduras secas reidratadas foram utilizadas, observou-se que a absorção máxima de valina foi muito mais tardia em relação a fermentações onde se usaram leveduras ativas provenientes de outras fermentações. Desta forma, observaram-se picos de diacetilo muito maiores, o que sugere que o processo de secagem da levedura pode provocar alterações na membrana que influenciem o *uptake* da valina (Cyr *et al.*, 2007).

3.3.4.6 Engenharia genética e adição de enzimas

A utilização de estirpes geneticamente modificadas na produção cervejeira não é permitida, tal como existe pouca aceitação do público a este processo. Não deixa, no entanto, de ser interessante para o estudo da formação e redução do diacetilo (Brányik *et al.*, 2008).

Através de engenharia genética foi possível realizar algumas alterações no metabolismo de síntese da valina que tiveram resultados relevantes. A inibição da expressão do gene responsável pela formação do acetohidroxiácido sintase (ILV2) permitiu uma redução muito notória na produção de diacetilo, pois o piruvato deixa de ser convertido a α -acetolactato, formando-se uma menor *pool* deste, e consequentemente diminui-se a o tempo de fermentação necessário (Dzialo *et al.*, 2017; Gibson *et al.*, 2018). Por outro lado, o aumento da expressão e atividade do acetohidroxiácido reductoisomerase (ILV5) leva a uma conversão mais rápida do α -acetolactato a 2,3-dihidroxi-isovalerato na célula, evitando a sua excreção para o mosto (Villanueva *et al.*, 1990; Dzialo *et al.*, 2017). Outra modificação genética sugerida consiste na introdução no genoma da levedura do gene que permite a expressão do enzima α -acetolactato descarboxilase. Este enzima é expressado por algumas bactérias e catalisa a reação não-oxidativa de descarboxilação do α -acetolactato diretamente a acetoína. Desta forma, a reação de descarboxilação espontânea do α -acetolactato a diacetilo deixaria de ser o passo limitante da fermentação, assim como se formaria muito menos quantidade deste composto (Taylor, 2018b).

A adição do α -acetolactato descarboxilase por via exógena é permitida, estando o enzima disponível comercialmente. A utilização deste enzima reduz substancialmente o tempo de fermentação necessário. No entanto, a utilização de enzimas tem um elevado preço associado, pelo que se deve estudar se compensa mais, financeiramente, a dosagem do enzima ou o prolongamento da fermentação (Hughes & Baxter, 2001; Choi *et al.*, 2015).

Uma técnica de redução do diacetilo pode-se também prender na utilização de leveduras imobilizadas. Esta técnica requer um grande investimento pela unidade fabril. No entanto, cerveja cuja fermentação tenha terminado pode sofrer um tratamento térmico para a conversão de todo o α -acetolactato a diacetilo, sendo de seguida passada por um reator ou coluna que contenha leveduras imobilizadas, que removerão rapidamente o diacetilo do meio; a levedura imobilizada, por outro lado, não vai ter crescimento nem formará mais α -acetolactato (Yamauchi *et al.*, 1995;

Taylor, 2018b). O mesmo princípio é aplicado quando se realiza o *kräusenig*, ou seja, quando se adiciona uma pequena quantidade de levedura ativa e em fermentação à cerveja maturada, de forma a reduzir o diacetilo que, entretanto, se tenha formado, sem ocorrer nova proliferação (Hughes & Baxter, 2001).

3.3.5 *Off-flavours*

Alguns dos *flavours* detetados na cerveja podem contribuir para uma menor qualidade da mesma, sendo que a sua formação não é pretendida (Taylor & Organ, 2009). Desta forma, reúnem-se alguns dos *off-flavours* que a cerveja pode desenvolver:

- **aroma a maçã verde** – este aroma é dado pela presença de acetaldeído em concentrações superiores a 10 mg/L; é o resultado da remoção prematura da levedura ou de uma levedura de fraca qualidade, que não converte este composto a etanol (Taylor & Organ, 2009; SCC, 2017);
- **aroma a vegetais cozidos** – é dado pelo dimetilsulfito em quantidades acima de 60 µg/L; é formado durante a fervura pela quebra da S-metilmetionina e acumula-se no mosto quando a fervura é demasiado curta (Taylor & Organ, 2009; SCC, 2017);
- **sabor a cartão** – dado pelo 2-transnonenal em concentrações acima de 0,1 µg/L; desenvolve-se pela oxidação de ácidos gordos insaturados de cadeia longa (Taylor & Organ, 2009; SCC, 2017)
- **sabor a luz (*lightstruck*)** – proveniente dos 3-metilbut-2-eno-1-tiol, um mercaptano, em concentrações acima de 7 ng/L; forma-se quando a luz ultravioleta divide as isohumulonas, criando radicais que reagem com compostos de enxofre (Barth, 2013; SCC, 2017);
- **sabor a levedura** – forma-se devido à autólise da levedura quando é mantida muito tempo no fermentador ou sujeita a grandes períodos de armazenamento (Taylor & Organ, 2009).

3.4 Enquadramento teórico dos métodos aplicados

Para a obtenção de um produto de alta qualidade e consistente, vários parâmetros na cerveja deve ser analisados periodicamente. De forma a atingir-se um consenso a nível das análises a realizar pela indústria cervejeira, várias organizações uniram-se e criaram compilações de métodos analíticos para o estudo da cerveja. Desta forma, as normas EBC (*European Brewery Company*), MEBAK (*Methodensammlung der Mitteleuropaischen Brautechnischen Analysen Kommission*), ASBC (*American Society of Brewing Chemists*) e IBD ou IoB (*Institute of Brewing and Distilling*) são consideradas como normas universais e transversais nesta indústria (Anger *et al.*, 2009; Philliskirk, 2018).

3.4.1 Medição do extrato

Uma das medições mais importantes e recorrentes é a medição do extrato do mosto, que permite seguir a evolução da fermentação ao longo do tempo. Apesar do extrato ser a uma mistura homogênea de açúcares, dextrinas, compostos nitrogenados e minerais, por defeito, considera-se que o extrato corresponde à quantidade de sacarose no meio. O açúcar mais comum no mosto é a maltose, mas o método é considerado correto devido às semelhanças físico-químicas entre estes compostos (Anger *et al.*, 2009).

O investigador Goldiner e os seus colaboradores (1966) construíram uma tabela que correlaciona a densidade de uma solução de sacarose com a massa de sacarose diluída, o que permite, com base na densidade específica de um mosto obter o respetivo extrato em graus Plato.

3.4.1.1 Extrato primitivo, real e aparente

O extrato primitivo é a concentração de sólido solúveis, em graus Plato, que se encontram dissolvidos no mosto antes da sua inoculação. Este é um indicador da eficiência do processo da brassagem e permite ter uma noção da quantidade de álcool que pode ser formada (SCC, 2017).

O extrato aparente é o que é usualmente medido. Este refere-se ao extrato medido na presença de álcool, que por ser menos denso que a água, leva a uma diminuição da gravidade específica do mosto (SCC, 2017).

Já o extrato real refere-se à concentração real de sólidos solúveis após correção com o teor de álcool. Este permite obter a concentração de sólidos solúveis que ainda se encontram no meio após a fermentação (SCC, 2017).

Para se obter a densidade específica do mosto e dessa forma calcular-se o respetivo extrato, recorre-se a um densitómetro eletrónico. O densitómetro possui um tubo de vidro em forma de U que, quando atravessado por um determinado líquido, apresenta uma certa frequência de ressonância dependente da densidade do líquido em questão (Anger *et al.*, 2009).

A utilização do aparelho *Alcolyzer* da *Anton Paar* é considerada como benéfica e mais moderna, pois permite obter também o teor de álcool do mosto (ASBC, 2009).

3.4.1.2 Medição do teor de álcool

Para a medição do teor de álcool do mosto ou da cerveja recorre-se à espectroscopia de infravermelhos próximos (Anger *et al.*, 2009). O aparelho *Alcolyzer* pode ser utilizado para esta análise. Para tal, uma radiação entre 1170 e 1200 nm atravessa o mosto (previamente filtrado), obtendo-se a concentração de álcool na amostra em questão (BCOJ Collaborators, 2019).

3.4.2 pH

A medição do pH da água e do mosto é um parâmetro que deve ser monitorizado, pois influencia não só a atuação dos enzimas durante a brassagem, como o próprio metabolismo da

levedura e a sensação organolética da cerveja. Pode também indicar contaminações microbiológicas, dificuldades na fermentação e autólise da levedura (Anger *et al.*, 2009).

Para se medir o pH utiliza-se um eléctrodo de vidro previamente calibrado e limpo. O eléctrodo vai detetar a diferença de potencial eléctrico entre a solução e um eléctrodo de referência, quantificando assim a concentração protónica da amostra (Anger *et al.*, 2009).

3.4.3 FAN

Para a determinação do azoto α -aminado utiliza-se o método colorimétrico da ninidrina. Neste método as amostras de mosto são aquecidas com ninidrina, a um pH de 6 a 7. A ninidrina atua como agente oxidante e causa uma descarboxilação oxidativa dos aminoácidos (exceto prolina), com libertação de CO₂ e amónia. A ninidrina reage depois com a ninidrina não reduzida e com a amónia, criando um composto de cor azul. O mosto é depois diluído com iodeto de potássio, que mantém a ninidrina oxidada (Lie, 1973).

A intensidade da cor formada é medida espectralmente a uma radiação de 570 nm, permitindo-se obter a concentração de azoto α -amino pela absorvência da solução (Anger *et al.*, 2009).

3.4.4 Contagem de células

O controlo da viabilidade da levedura, ou seja, da percentagem de células vivas que se encontram numa amostra de mosto ou de levedura armazenada, é muito importante para a qualidade da cerveja. Tradicionalmente, utiliza-se o método do azul de metileno. Este método consiste na adição deste composto à amostra em estudo, sendo que as células mortas ficam tingidas de azul. Pode-se depois proceder a uma contagem ao microscópio das células mortas e calcular a percentagem de viabilidade com base no número de células totais (Russel, 2018).

Um método mais rápido e mais moderno para proceder a esta análise consiste na utilização de um aparelho, o *NucleoCounter YC-100*. Para tal, utiliza-se uma *NucleoCassette*, que é um acessório descartável com uma pequena entrada por onde é aspirada a amostra. Dentro desta *NucleoCassette*, o corante iodeto de propídeo está imobilizado e vai entrar em contacto com as células mortas e atravessa-as, corando-as. O *NucleoCounter* realiza depois uma contagem das células coradas utilizando tecnologia de imagem, obtendo-se o número de células não viáveis da amostra. Para se obter o número de células totais na amostra (e consequente cálculo da viabilidade), a amostra é sujeita a um tratamento com o Reagente Y100 que vai permeabilizar as membranas da levedura. Utilizando uma nova *NucleoCassette*, as células deixar-se-ão corar todas pelo iodeto de propídeo, obtendo-se assim a população total (ChemoMetec, 2005).

3.4.5 Cromatografia gasosa de headspace

Para a análise e quantificação das dicetonas vicinais do mosto tem sido sugerida a utilização da cromatografia gasosa de *headspace* (Ruppel & Grecsek, 2005; Tian, 2010).

Para a aplicação deste método é preparada uma amostra desgaseificada do mosto que é inserida num *vial* de vidro e adequadamente selada com um septo de borracha. A amostra é depois termostatizada até se atingir um equilíbrio dinâmico entre o líquido e o vapor no frasco. De seguida, uma seringa perfura o septo e uma alíquota do vapor é retirada, sendo injetada no cromatógrafo gasoso. A alíquota é arrastada por um gás (fase móvel) até a uma coluna (fase estacionária) onde ocorre a separação dos seus componentes. Cada componente quando termina de percorrer a coluna capilar dá origem a um sinal elétrico diferente que é identificado por um detetor de captura de eletrões. Com base nos tempos de retenção e na calibração do cromatógrafo para os compostos em estudo, obtém-se assim um pico cuja área pode ser calculada, obtendo-se a concentração do composto na amostra (Robards *et al.*, 2004).

3.5 Objetivos

O diacetilo é um composto de extrema importância, uma vez que afeta a qualidade sensorial da cerveja e, como tal, não é pretendido no produto final. As análises efetuadas aos valores de diacetilo ao longo das fermentações têm dado a entender que as concentrações deste composto têm vindo a ser sucessivamente mais altas, o que leva a um maior tempo de ocupação dos fermentadores e gasto energético. As altas concentrações deste composto têm-se vindo a repercutir nas guardas e no produto final, comprometendo a qualidade deste.

Desta forma, o estudo realizado teve como objetivos os de, através da análise do histórico da empresa para Sagres Branca e Sagres Preta, identificar possíveis explicações para o problema, estudando os vários fatores com influência no diacetilo. Pretendeu-se também conseguir prever a curva do diacetilo, como forma de auxílio dos operadores. Com base nos dados recolhidos, pretendeu-se sugerir possíveis alterações a realizar na produção. Procurou-se depois responder a duas questões: Será possível, ao alterar certos parâmetros, conseguir reduzir as quantidades de diacetilo e, conseqüentemente, o tempo de fermentação? E, se sim, quais os parâmetros que podem ser alterados sem ter impacto no perfil sensorial do produto?

Decidiu-se então realizar dois ensaios em Sagres Branca para não só estudar a curva padrão do diacetilo, como analisar a influência de uma redução da temperatura de fermentação e de uma redução do pH de fabrico, através da observação de vários parâmetros ao longo da fermentação. Desta forma, procurou-se obter melhorias significativas na redução do tempo de fermentação.

4 Metodologia

Para se atingirem os objetivos propostos, o estágio foi dividido em duas fases. A identificação do problema foi o primeiro passo necessário para se estruturar o caminho a seguir. Após uma análise do histórico da empresa referente ao diacetilo, foi possível cruzar os dados obtidos com a literatura e projetar possíveis alterações no processo produtivo que teriam influência na produção deste composto.

Numa segunda fase, foram colhidas amostras de fermentações controle, assim como amostras de fermentações cujos parâmetros foram alterados, com base nas conclusões obtidas anteriormente. Partindo da análise da composição dos mostos destas fermentações, foi possível acompanhar a evolução de parâmetros como o FAN, viabilidade da levedura, quantidade de células mortas em suspensão e totais em suspensão, pH, extrato aparente e diacetilo, 2,3-pentanodiona e seus precursores ao longo das fermentações. A comparação da evolução das fermentações controle com as dos ensaios permitiu obter resultados concretos que possibilitaram o esclarecimento de dúvidas quanto aos fatores com influência na produção de diacetilo, sendo sugeridas possíveis alterações ao processo industrial com vista à melhoria deste parâmetro.

4.1 Identificação do problema

O diacetilo é um composto que gera um *off-flavour* a manteiga, não sendo pretendido na maioria das cervejas, especialmente as *Lager*. Como tal, a existência deste composto em quantidades superiores ao limite de detecção humano na cerveja torna-a de qualidade inferior, o que não é pretendido pelo produtor. O tempo de fermentação da cerveja depende do diacetilo que, quando presente em altas concentrações, leva a um aumento no tempo de fermentação necessário, o que resulta num maior número de custos associados e maior tempo de ocupação dos fermentadores (Boulton & Quain, 2001; Gibson *et al.*, 2018).

A produção das cervejas Sagres Branca e Sagres Preta na SCC segue uma série de processos padronizados de forma a se obter um produto final praticamente igual entre os diferentes lotes produzidos na empresa. Desta forma, existe uma receita que define as quantidades de cada uma das matérias primas a ser utilizada, os tempos, temperaturas e condições que definem o processo de produção de mosto (diagrama de brassagem) e as condições de fermentação a que este mosto é submetido (diagrama de fermentação). No entanto, como o processo fermentativo depende de um organismo vivo – a levedura – cujo comportamento não é totalmente previsível, a fermentação não é um processo que possui um tempo fixo preestabelecido, mas sim uma reação que tem de ser monitorizada, cabendo aos operadores a identificação do momento em se reúnem as condições necessárias para o processo ser terminado.

Na produção destas bebidas, o diacetilo apresenta-se como o parâmetro decisivo para que a fermentação seja terminada. As normas de qualidade da empresa indicam que a fermentação pode ser interrompida quando a concentração de diacetilo desce abaixo do valor de 120 ppb

(partes por milhar de milhão). Nesta altura, as observações anteriores permitiram concluir que o processo fermentativo da levedura já praticamente não ocorre, estando a levedura apenas encarregue de remover o diacetilo do meio. Assim, uma redução no tempo que a cerveja leva a atingir estes valores permite uma redução no tempo de ocupação do fermentador (que está disponível mais cedo para ser utilizado para outra fermentação), uma redução no gasto energético e uma redução nas amostras analisadas no laboratório. Permite também reduzir a formação de outros *off-flavours*, como o sabor a levedura, como consequência da manutenção das altas temperaturas durante o descanso do diacetilo.

A concentração do diacetilo é analisada diariamente após o 7º dia de fermentação, até ao término desta. A análise dos valores de diacetilo ao 7º dia nos meses anteriores ao início do estágio deram a entender que estes valores têm sido sucessivamente mais altos, o que leva a um maior tempo de ocupação dos fermentadores. Foram criados grupos laboratoriais para análise deste problema que não chegaram a uma conclusão clara sobre as possíveis causas do aumento do diacetilo ao longo dos meses. Este problema surgiu também no produto final, a cerveja, em que as concentrações de diacetilo se apresentaram como superiores às estabelecidas como aceitáveis pela empresa. Desta forma, surgiu como oportunidade de estágio o estudo dos fatores que influenciam a formação e degradação do diacetilo, de forma a se identificarem possíveis causas para este problema e, com base nas conclusões obtidas, adaptar o processo produtivo a nível industrial para tentar contrariar esta tendência e, se possível, reduzir o número de dias de ocupação dos fermentadores.

4.2 Análise do histórico de resultados

De forma a se identificarem potenciais fatores com influência na concentração do diacetilo nas fermentações, foi analisado o histórico da empresa quanto a este composto. O procedimento padrão realizado pela empresa determina que as concentrações de diacetilo devem ser determinadas uma vez por dia, a partir do 7º dia, para todas as fermentações. Desta forma, recorrendo ao *Microsoft Excel (Microsoft Office)*, foi possível cruzar as concentrações de diacetilo em Sagres Branca e Sagres Preta ao longo das fermentações com os vários parâmetros controlados pelos operadores. Foi analisada a distribuição da concentração de diacetilo nas fermentações, em guarda e em produto acabado, mas também o tempo total de fermentação, tempo até ao *Ruh*, tempo de *Ruh*, tempo de permanência da levedura, taxa de arejamento do mosto, taxa de multiplicação da levedura, viabilidade da levedura, influência do fermentador ao nível do diacetilo e da taxa de multiplicação da levedura, e a influência da geração da levedura ao nível do diacetilo, viabilidade, tempo de fermentação e percentagem de redução do diacetilo. Foi também possível estimar as percentagens médias de redução do diacetilo e com estas prever a curva deste composto. Os parâmetros de fabrico do mosto também foram analisados de forma a detetar-se potenciais causas do problema provenientes deste passo da produção.

4.2.1 Matrizes - Cervejas Sagres

A análise do histórico da empresa quanto ao diacetilo focou-se em duas principais matrizes produzidas pela SCC, a cerveja Sagres Branca e a cerveja Sagres Preta.

A cerveja Sagres Branca é uma cerveja produzida à base de água, malte de cevada, cereais não maltados e extrato de lúpulo. De estilo *Pilsner* e com um teor de 5,0% vol. de álcool, esta cerveja surgiu no mercado em 1940. Tem um carácter seco, amargor agradável, é medianamente encorpada e tem uma cor dourada (SCC, 2020e).

A cerveja Sagres Preta é uma cerveja produzida com água, malte de cevada, milho não maltado e extrato de lúpulo. Com um teor alcoólico que se situa nos 4,1% vol., esta cerveja de estilo *Munich* (ou *Münchner Dunkel*) é comercializada desde 1940. De cor escura e medianamente encorpada, esta cerveja tem *flavour* a caramelo (SCC, 2020e).

Tanto a cerveja Sagres Branca como a Sagres Preta são cervejas de baixa fermentação, ou seja, de estilo *Lager*. Para o fabrico de ambas é utilizado o mesmo tipo de levedura, uma estirpe específica de *Saccharomyces pastorianus*.

Apesar dos objetivos deste trabalho se terem prendido na identificação de fatores com influência nas concentrações de diacetilo para ambas as matrizes, as alterações ao processo produtivo para melhorar este indicador apenas foram realizadas para fermentações de Sagres Branca, devido ao reduzido número de fermentações de Sagres Preta realizadas anualmente. Note-se também que os dados referentes à Sagres Branca se referiram apenas a fermentações realizadas em fermentadores cilíndricos, por corresponderem ao processo padrão, enquanto que os dados referentes à Sagres Preta foram obtidos de fermentadores cilíndricos e *Asahi*, por haver pouca quantidade de dados.

Nos ensaios realizados, foram comparadas fermentações controlo de Sagres Branca com fermentações desta mesma matriz com alterações na temperatura de fermentação e no pH de fabrico do mosto.

4.3 Amostragem

Uma amostra de um alimento deve ser representativa do alimento como um todo, pelo que deve ser homogénea, assim como se deve assegurar que não ocorrem alterações na sua composição entre a amostragem e a sua análise. Na segunda fase do trabalho, foram colhidas amostras de fermentações controlo e de ensaios para uma possível comparação entre estes. Para tal, colheram-se dois tipos de amostras, as de mosto arrefecido e as de mosto em fermentação, que foram sujeitas a diferentes tratamentos.

4.3.1 Amostra de mosto arrefecido

O mosto arrefecido consiste no mosto que provém da brassagem e que será depois inoculado e entrará no fermentador. Sendo que em cada fermentador são depositados n fabricos de mosto, procedeu-se à realização de uma amostra composta. Para tal, foi colhido 1 L de cada

um dos fabricos que deram entrada em determinado fermentador, pelo que no laboratório se procedeu à mistura dos n fabricos em partes iguais, como forma de se obter uma amostra representativa.

A colheita das amostras de cada fabrico foi realizada por um dos operadores responsável pelo arrefecimento do mosto. Desta forma, após o início do arrefecimento do mosto proveniente da fervura, o operador aguardou alguns minutos, permitindo a purga do sistema e a minimização da ocorrência de amostras tendenciosas. O operador acedeu então a um ponto de colheita localizado após o permutador de temperatura e, depois de uma breve purga, colheu cerca de 1 L de mosto arrefecido para uma garrafa de colheita escura, previamente lavada. A amostra foi então identificada com o lote de fabrico e a hora da colheita, sendo guardada em condições de refrigeração à temperatura de, aproximadamente, 4° C.

Após a colheita dos vários fabricos, procedeu-se à realização da amostra composta que será representativa das condições iniciais da fermentação que ocorrem aquando da mistura dos fabricos no fermentador. Para tal, juntaram-se 250 mL de cada um dos mostos num balão, sendo este misturado por agitação manual. Esta foi, então, a amostra de mosto arrefecido que foi analisada para se obter os vários resultados necessários: pH, extrato primitivo, atenuação limite aparente e FAN.

4.3.2 Amostra de mosto em fermentação

A colheita das amostras do mosto em fermentação foi realizada uma vez por dia, sempre que possível, para cada um dos fermentadores em estudo, durante um período de cerca de uma semana e meia. Para tal, acedeu-se ao ponto de colheita de amostras de cada um dos fermentadores, situados no exterior destes, a uma altura de alguns metros da base do fermentador cilindrocónico. Abriu-se a torneira de colheita e, após uma breve purga para eliminar potenciais resíduos e bactérias contaminantes presentes no canal entre o interior do fermentador e o exterior, colheu-se cerca de 1 L de amostra para uma garrafa de colheita escura, previamente lavada e identificada com o número do fermentador em causa, hora e dia de colheita, sendo a amostra analisada nos minutos seguintes.

As análises realizadas ao mosto em fermentação foram a contagem de células mortas em suspensão, contagem total de células em suspensão, determinação da viabilidade da levedura, pH, extrato aparente, teor de álcool em volume, FAN e determinação do diacetilo e 2,3-pentanodiona e dos seus precursores.

4.4 Análises laboratoriais

Os métodos e procedimentos utilizados para as determinações têm como base as fichas HMESC do Grupo *Heineken*. Estas fichas descrevem o método laboratorial a aplicar para realizar uma determinação, baseando-se nas normas da *European Brewery Convention*. Desta forma, com a normalização dos métodos e pela realização de testes interlaboratoriais com amostras iguais, é

possível uma harmonização das determinações realizadas no Grupo *Heineken*, tornando possível a comparação de resultados e facilitando a deteção de potenciais erros tanto na produção, como por parte do operador.

4.4.1 Contagem de células mortas em suspensão

Após a colheita da amostra do mosto em fermentação, procedeu-se imediatamente à contagem celular, evitando assim a obtenção de resultados tendenciosos devido à morte da levedura com o passar do tempo e com as variações da temperatura. Inicialmente, inverteu-se a garrafa de colheita algumas vezes e transferiu-se parte do mosto em fermentação para um pequeno copo. Colocou-se este em agitação com recurso a um agitador magnético, evitando a sedimentação da amostra e descarbonatando-a. Após ressuspensão, procedeu-se de diferentes formas.

Nos casos de mostos em fermentação referentes aos primeiros 3 dias após inoculação, retirou-se 50 µL da amostra para um tubo *Eppendorf*® e diluiu-se a amostra 10 vezes com solução salina fisiológica (9 g/L de NaCl (*Merck*, 7647-14-5), 9,31 g/L de EDTA dissódico dihidratado (*Merck*, 6381-92-6)) estéril. A amostra diluída foi depois vortexada durante alguns segundos. Em mostos cuja fermentação já decorrerá por mais de 3 dias, não se realizou esta diluição, transferindo-se uma pequena quantidade diretamente para o tubo e vortexando-se. A não realização da diluição das fermentações com mais de 3 dias prende-se ao facto de que, após este período, a concentração de células em suspensão decai bastante, pelo que uma diluição faz com que o número de células contadas caia fora do intervalo de precisão do aparelho, sendo o resultado menos fiável.

Aspirou-se depois o conteúdo do tubo para uma *NucleoCassete*TM (*ChemoMetech*) e inseriu-se esta no aparelho *NucleoCounter*® *YC-100*TM (*ChemoMetech*). Após se abrir o *software NucleoView*TM, pressionou-se o botão *RUN* do *NucleoCounter* e inseriu-se a respetiva diluição no *software* (10x – no caso de fermentações jovens - ou 1x – no caso de fermentações com mais de 3 dias) no separador *Measurement*, e marcou-se como *Non-viable sample*. O valor apresentado no campo *Concentration of cells in suspension* correspondeu, então, ao número de células mortas em suspensão, por mL de mosto, no mosto em fermentação.

4.4.2 Contagem total de células em suspensão

Para a contagem total das células em suspensão no mosto em fermentação, retiraram-se 50 µL da amostra analisada no ponto anterior para um tubo *Eppendorf*®, diluindo-se esta 10 vezes em Reagente de Lise Y-100 (*ChemoMetech*) – diluição final da amostra de 100x em mostos com até 3 dias de fermentação e de 10x em mostos mais antigos. Depois de se vortexar a amostra diluída durante alguns segundos, aspirou-se a diluição para uma *NucleoCassete*TM, inseriu-se esta no *NucleoCounter*® *YC-100*TM e pressionou-se o botão *RUN* do aparelho. No *software NucleoView*TM inseriu-se a respetiva diluição e o valor apresentado no campo *Concentration of*

cells in suspension correspondeu ao número de células total em suspensão, por mL de mosto, no mosto em fermentação.

4.4.3 Viabilidade da levedura

No separador *Viability* do *NucleoView™*, selecionou-se o ficheiro correspondente às células totais em suspensão e o correspondente às células mortas. Foi possível, assim, neste separador, determinar a viabilidade da levedura (percentagem de células vivas em relação às totais), assim como obter o número de células vivas em suspensão no mosto em fermentação.

4.4.4 pH, extrato primitivo, extrato aparente e teor alcoólico

Para a determinação do pH, dos extratos primitivo e aparente, assim como do teor de álcool em volume, filtrou-se parte da amostra de mosto através de um papel de filtro seco com uma colher de *kieselguhr*. De seguida, transferiu-se parte do filtrado para um copo de plástico e inseriu-se o copo num trocador de amostras (*Xsamples 520 by Anton Paar*), identificando-se a posição e o nome da amostra. Este trocador de amostras encontrava-se acoplado a um medidor de intensidade (*DMA 4500 M by Anton Paar*), a um eléctrodo de pH (*ME by Anton Paar*) e a um medidor do conteúdo alcoólico (*Alcolyzer Beer ME by Anton Paar*), tendo o sistema sido previamente lavado com água. Por último, a amostra foi sugada por uma bomba peristáltica, sendo esta analisada por estes vários aparelhos, obtendo-se em *Excel* os valores de pH, percentagem de álcool em volume, extrato primitivo (mosto arrefecido) e extrato aparente.

4.4.5 Atenuação limite aparente

Ao se estudar a atenuação limite aparente de um mosto, realizou-se inicialmente a determinação do extrato primitivo da amostra composta através do método descrito em 4.4.4. Após o registo deste valor, numa balança (*AE200 by Mettler*), pesaram-se aproximadamente 5 g de levedura prensada (Levedura Sagres) que foram transferidas para um balão. De seguida, transferiu-se 150 mL da amostra em estudo para o balão e tapou-se a entrada com algodão hidrófobo. O balão foi colocado em agitação mecânica durante 24 ± 1 horas a cerca de 100 rotações por minuto, numa sala climatizada a cerca de 20° C. Após o tal período, o mosto resultante foi filtrado em papel de filtro com uma colher de *kieselguhr* e transferido para um copo de plástico. O extrato aparente foi de seguida determinado de acordo com o método descrito em 4.4.4. A atenuação limite aparente foi depois determinada de acordo com a seguinte expressão:

$$ALA (\%) = \frac{EPM - EAMAF}{EPM} \times 100$$

Em que:

ALA – atenuação limite aparente (%);

EPM – extrato primitivo do mosto (%);

EAMAF – extrato aparente do mosto após fermentação (%).

4.4.6 FAN

Para a determinação do FAN foi necessário, primeiramente, a preparação de algumas soluções:

- **Solução corada de ninidrina** - Dissolveram-se em 200 mL de água destilada *Milli-Q* 9,943 g de hidrogenofosfato dissódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (*Merck*, 10028-24-7) com 12,0 g de dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) (*Merck*, 7778-77-0), 1,00 g de ninidrina (*Merck*, 485-47-2) e 0,600 g de D-(-)-frutose (*Merck*, 57-48-7). Após dissolução completa dos sólidos com recurso a ultrassons, arrefeceu-se a solução a 20° C em banho. De seguida, aferiu-se o pH até ao intervalo entre 6,6 e 6,8 com uma solução de NaOH 10 N (previamente preparada pelos técnicos do laboratório) e colocou-se em condições de refrigeração à temperatura de, aproximadamente, 4° C em frasco âmbar;
- **Reagente de diluição** - Em 1200 mL de água destilada *Milli-Q* dissolveram-se 2,00 g de iodato de potássio (KIO_3) (*Merck*, 7758-05-6) através de ultrassons e adicionaram-se 800 mL de etanol a 96% (v/v) (*Sigma-Aldrich*, 64-17-5), agitando-se para a correta mistura e guardando-se em condições de refrigeração à temperatura de, aproximadamente, 4° C;
- **Solução stock de glicina** - Num balão volumétrico dissolveram-se 107,2 mg de glicina (*Merck*, 56-40-6) e aferiu-se com água destilada *Milli-Q* até perfazer o volume 100 mL. A solução foi guardada em condições de refrigeração à temperatura de, aproximadamente, 4° C;
- **Solução standard de glicina** - Da solução *stock* de glicina preparada anteriormente, transferiu-se 1,0 mL que foi diluído 100x com água destilada *Milli-Q*. Esta solução teve de ser preparada sempre que se realizou a análise do FAN;
- **Amostras para análise do FAN** - Retirou-se 1,0 mL de mosto arrefecido ou em fermentação e dilui-se 100x com água destilada *Milli-Q*. O procedimento foi repetido para cada uma das amostras a analisar.

Após a preparação das várias soluções, procedeu-se à análise do teor de FAN. Para tal foram transferidos para 3 tubos de ensaio 2,0 mL da amostra diluída em estudo, para outros 3 tubos 2,0 mL da testemunha (solução *standard* de glicina) e adicionou-se 2,0 mL de água destilada *Milli-Q* em 2 tubos de ensaio (branco). Ou seja, o branco foi analisado em duplicado, enquanto que as amostras e a testemunha em triplicado.

Depois de se adicionar 1,0 mL de solução corada de ninidrina a cada um dos tubos, taparam-se os tubos com berlines e colocaram-se em banho fervente. Após os berlines começarem a saltar (ao atingir o ponto de ebulição), esperou-se exatamente 16 minutos. Findo este período, colocaram-se os tubos em banho maria a 20° C durante cerca de 20 minutos, após os quais se adicionou 5,0 mL do reagente de diluição a cada um destes. Depois de se vortexar os

tubos, foi analisada a absorvência das soluções a 570 nm num espectrofotómetro (*Cary 100 UV-Vis by Agilent Technologies*), utilizando um autoamostrador (*SPS 3 by Agilent Technologies*) e recorrendo-se ao *software Advanced Reads (Agilent Technologies)*. A mistura dos dois brancos foi utilizada como branco do espectrofotómetro. O valor do FAN foi então calculado com base na seguinte expressão:

$$\text{FAN} = \frac{\text{Am} \times 2 \times 100}{\text{At}}$$

Em que:

FAN - concentração de azoto aminado livre existente na amostra de mosto (mg/L);

Am – média dos triplicados das absorvências da amostra de mosto;

2 – concentração de azoto aminado livre na solução *standard* de glicina (2,0 mg/L);

100 – fator de diluição da amostra;

At – média dos triplicados das absorvências da testemunha.

4.4.7 Determinação da concentração de dicetonas vicinais

Para determinar a concentração de diacetilo, 2,3-pentanodiona e os seus precursores nas amostras, foi necessário preparar duas soluções:

- **Solução *stock* de 2,3-hexanodiona (SH)** - Num balão volumétrico de 100 mL foram adicionados 90 mL de etanol absoluto (*Sigma-Aldrich*, 64-17-5). Após a adição de 150 µL de 2,3-hexanodiona (*Merck*, 3848-24-6), perpez-se o balão com etanol absoluto a 0° C e manteve-se no frio;
- **Solução de trabalho de padrão interno de 2,3-hexanodiona (TPHI)** - Num balão volumétrico de 200 mL adicionou-se 50 mL de uma solução etanólica a 5% (v/v). Após se pipetar 2,0 mL da solução SH (0° C), perpez-se o balão com a solução etanólica a 0° C e manteve-se no frio.

Após a elaboração das soluções e colheita das amostras de mosto em fermentação, filtraram-se 250 mL das amostras com papel de filtro seco e uma colher de *kieselguhr*.

4.4.7.1 Determinação da quantidade de diacetilo, 2,3-pentanodiona e seus precursores

As amostras filtradas foram de seguida incubadas num banho a 80° C durante 20 minutos. Após este período, foram colocadas em água com gelo até atingirem uma temperatura inferior a 10° C. Pipetou-se para um frasco de vidro com rolha de plástico 2,0 mL da solução TPHI e transferiu-se a amostra para o frasco, misturando-se os líquidos por agitação do frasco fechado. Com recurso a pipetas refrigeradas em congelador, transferiu-se 10 mL da mistura da amostra com 2,3-hexanodiona para um *vial*, tapando-se com um septo e selando o *vial*.

Depois da preparação das amostras, colocaram-se os *vials* no amostrador (*TurboMatrix 40 Trap by PerkinElmer*) do cromatógrafo gasoso (*Clarus 500 by PerkinElmer*). No *software Clarity (Version 8.2.1.84 by DataApex)*, selecionou-se o equipamento *PE Clarus* e identificou-se no sistema cada amostra e a sua respetiva posição no amostrador. No amostrador foram também inseridos *vials* com amostra controlo e, nas últimas posições, *vials* vazios para limpeza do sistema. Alternou-se para o *software TurboMatrix* onde se inseriu o número de amostras a correr e se deu a ordem de início da corrida, de acordo com os valores definidos para cada parâmetro, apresentados na Tabela 4.1. O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio, com uma pressão de arraste de 60 psi; já o detetor utilizado foi um detetor de captura de eletrões.

Tabela 4.1 - Parâmetros e respetivos valores definidos para a corrida das amostras em cromatografia gasosa.

Parâmetro	Valor
Temperatura da agulha	80° C
Temperatura da linha de transferência	150° C
Temperatura do forno do vial	60° C
Tempo de termostatização	15 min
Tempo de pressurização	2 min
Tempo de transferência para a coluna	0,2 min
Tempo de injeção	0,1 min
Tempo de corrida GC	47 min
Pressão da coluna	19 psi
Pressão da injeção	20 psi

A análise da área dos picos apresentados no cromatograma permitiu calcular a concentração, em ppb, do diacetilo + percursos e da 2,3-pentanodiona + percursos.

4.4.7.2 Determinação da quantidade de diacetilo e 2,3-pentanodiona

Para a determinação das quantidades de diacetilo e 2,3-pentanodiona livres em solução, após a filtração com *kieselguhr* das amostras, não se realizou o aquecimento a 80° C durante 20 minutos, sendo que as amostras foram logo colocadas em água com gelo para arrefecimento. Após este passo, o procedimento foi semelhante ao realizado em 4.4.7.1.

4.5 Análise e comparação das curvas de fermentação

Após a realização das análises laboratoriais e a obtenção dos dados necessários, estes foram tratados utilizando o *software Excel (Microsoft Office)*, para se proceder a uma correta comparação entre as fermentações controlo e as fermentações ensaio. Foi assim possível retirar as conclusões necessárias para este trabalho.

5 Abordagem experimental

Tendo em conta o efeito organolético das altas concentrações de diacetilo na cerveja e o facto deste ser um fator limitante para o término da fermentação, o estudo do comportamento deste composto durante a fermentação é de extrema importância. Uma redução na formação do diacetilo ou um aumento na velocidade de degradação deste são, como tal, pretendidos, permitindo uma redução dos custos do processo e a manutenção de altos padrões de qualidade. Este capítulo é então dedicado ao estudo dos vários fatores que afetam a formação e redução de diacetilo em fermentadores, de forma a selecionar as variáveis que podem ser alteradas com o intuito de reduzir a concentração deste composto à escala fabril, levando a uma melhoria deste processo. Para tal, foi analisado o histórico de resultados do período de 2019 e, com base neste, foram propostas várias melhorias e realizados ensaios em que se alteraram alguns parâmetros cuja influência na formação de diacetilo foi reportada na literatura. Também se tentou encontrar um modo de prever o teor de diacetilo ao longo das fermentações, podendo este ser utilizado como ferramenta de auxílio dos colaboradores no planeamento da produção.

5.1 Análise do histórico de resultados

Para identificar as possíveis causas, fatores e parâmetros que podem afetar a formação e redução de diacetilo em fermentadores, foi necessário realizar uma análise aprofundada do histórico recente da empresa. Desta forma, foi possível estabelecer uma correlação lógica, ou não, entre a prevalência deste composto na cerveja e as variáveis em estudo. Esta análise foi realizada para os dois principais produtos que apresentaram problemas em relação aos valores de diacetilo – a Sagres Branca e a Sagres Preta.

Numa primeira fase, foi estudada a concentração de diacetilo durante a fermentação e no produto final e na guarda, confirmando a existência do problema. Numa segunda fase, foi possível cruzar os valores de diacetilo aos 7º e 8º dias com vários parâmetros da fermentação, procurando estabelecer relações entre estes e o diacetilo. Por último, foram analisados os vários parâmetros do mosto, procurando detetar prováveis fontes do problema.

5.1.1 Análise da concentração de diacetilo nas fermentações

Como explicado anteriormente em 3.3.4 e 4.1, o diacetilo é um composto cuja concentração é monitorizada durante a fermentação, pois apresenta-se como um fator limitante para a produção de cerveja. A presença deste composto tem influência direta no perfil sensorial da cerveja, prejudicando a qualidade desta bebida, pelo que é pretendido que este seja removido pela levedura o mais rapidamente e que se forme nas menores quantidades possíveis. Se o diacetilo se formar em altas concentrações e se for degradado a uma baixa velocidade, a cerveja terá de ocupar os fermentadores durante longos períodos, impedindo-os de serem reutilizados, para além de apresentar uma maior despesa energética e económica. A concentração de 120 ppb de diacetilo é considerada como o limite aceitável para a cerveja Branca “verde” ser retirada dos

fermentadores e passada para os tanques de guarda (maturação). No caso da cerveja Preta, o valor situa-se nos 90 ppb.

No entanto, foi observado pelos operadores e funcionários da empresa que, num contexto recente, os valores de diacetilo têm sido cada vez mais altos, o que prolonga as fermentações durante vários dias, tendência esta que se tem vindo a arrastar. Devido ao impacto económico que longas fermentações apresentam e de forma a serem realizadas alterações para contrariar esta tendência, o histórico recente dos valores de diacetilo foi analisado.

O plano de amostragem em vigor na empresa considera que o diacetilo deve ser analisado diariamente a partir do 7º dia de fermentação (sendo considerado como 1º dia o dia em que ocorreu a inoculação do primeiro fabrico). Desta forma, foram compilados os valores da concentração de diacetilo ao 7º e 8º dias nas fermentações realizadas no período de 2019. Para Sagres Branca, apenas foram consideradas as fermentações realizadas em fermentadores cilíndricos; para Sagres Preta, para além das fermentações realizadas em fermentadores cilíndricos, também foram incluídas as fermentações realizadas em fermentadores *Asahi*, devido à baixa quantidade de dados. O estudo focou-se nas fermentações realizadas em fermentadores cilíndricos a pedido da empresa, uma vez que o tipo de fermentador também tem influência na formação do diacetilo. A distribuição destes resultados apresenta-se na Figura 5.1.

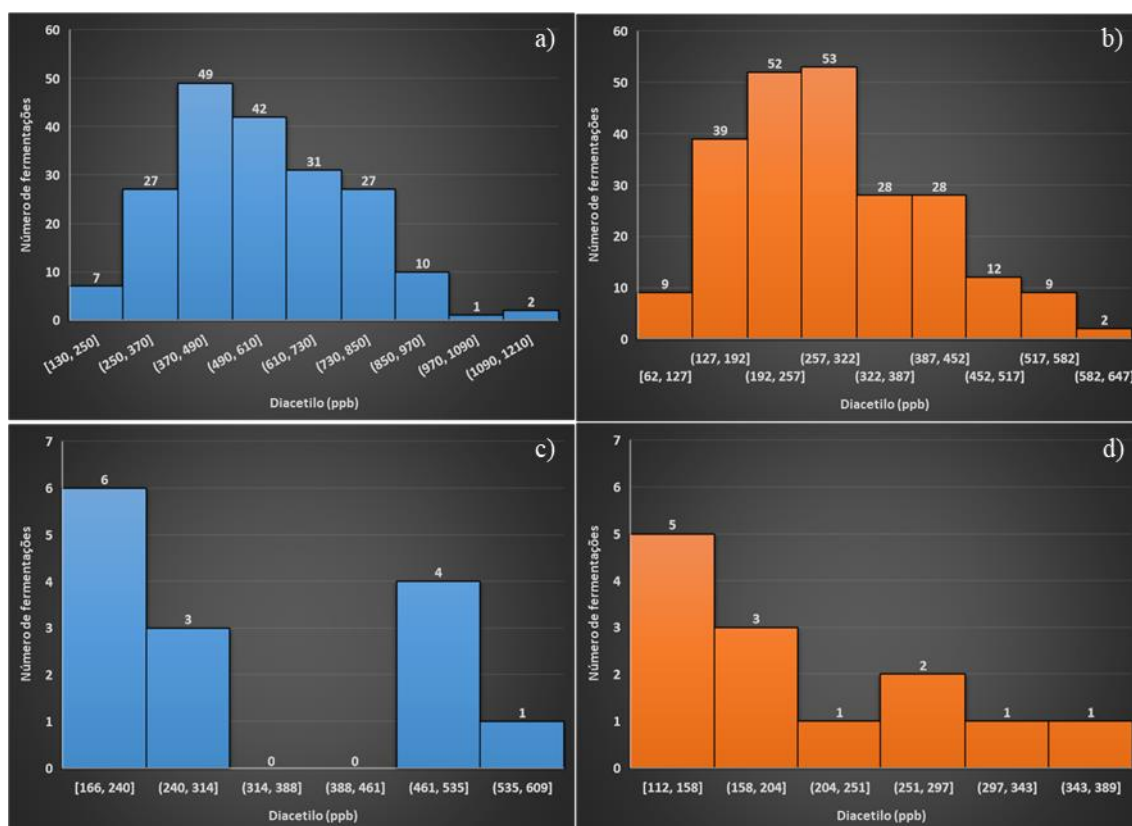


Figura 5.1 - Distribuição das concentrações de diacetilo (ppb) aos 7º e 8º dias nas fermentações realizadas em 2019 para Sagres Branca e Sagres Preta: **a)** Diacetilo ao 7º dia em Sagres Branca; **b)** Diacetilo ao 8º dia em Sagres Branca; **c)** Diacetilo ao 7º dia em Sagres Preta; **d)** Diacetilo ao 8º dia em Sagres Preta.

A Figura 5.1-a) apresenta a distribuição dos valores de diacetilo obtidos ao 7º dia para 196 fermentações de cerveja Sagres Branca. É de notar que nenhuma das fermentações atingiu, ao 7º dia, um valor inferior a 120 ppb, pelo que foi necessário prolongar o tempo destas fermentações. Três das fermentações apresentaram valores muito altos de diacetilo, entre 970 ppb e 1210 ppb, o que sugere uma potencial contaminação microbiológica, facto este que poderia ser confirmado se se analisasse a razão diacetilo/2,3-pentanodiona (Virkajärvi *et al.*, 2004; Nickel, 2020). Os dados de cada fermentação (não apresentados) permitiram calcular a média e o desvio padrão associado da concentração de diacetilo ao 7º dia, que se situou nos $553,22 \pm 193,61$ ppb, sendo que o desvio representou 35,00% do valor médio. A mediana, por outro lado, foi ligeiramente inferior, de 516,50 ppb. Os dados demonstram que, de facto, existem valores de diacetilo muito elevados ao 7º dia e que, caso não seja possível a redução destes valores, a análise diária deste indicador deve ser realizada apenas a partir do 8º dia, poupando recursos ao laboratório. As médias, desvios padrão e medianas referentes às fermentações da Figura 5.1 encontram-se compiladas no Anexo.

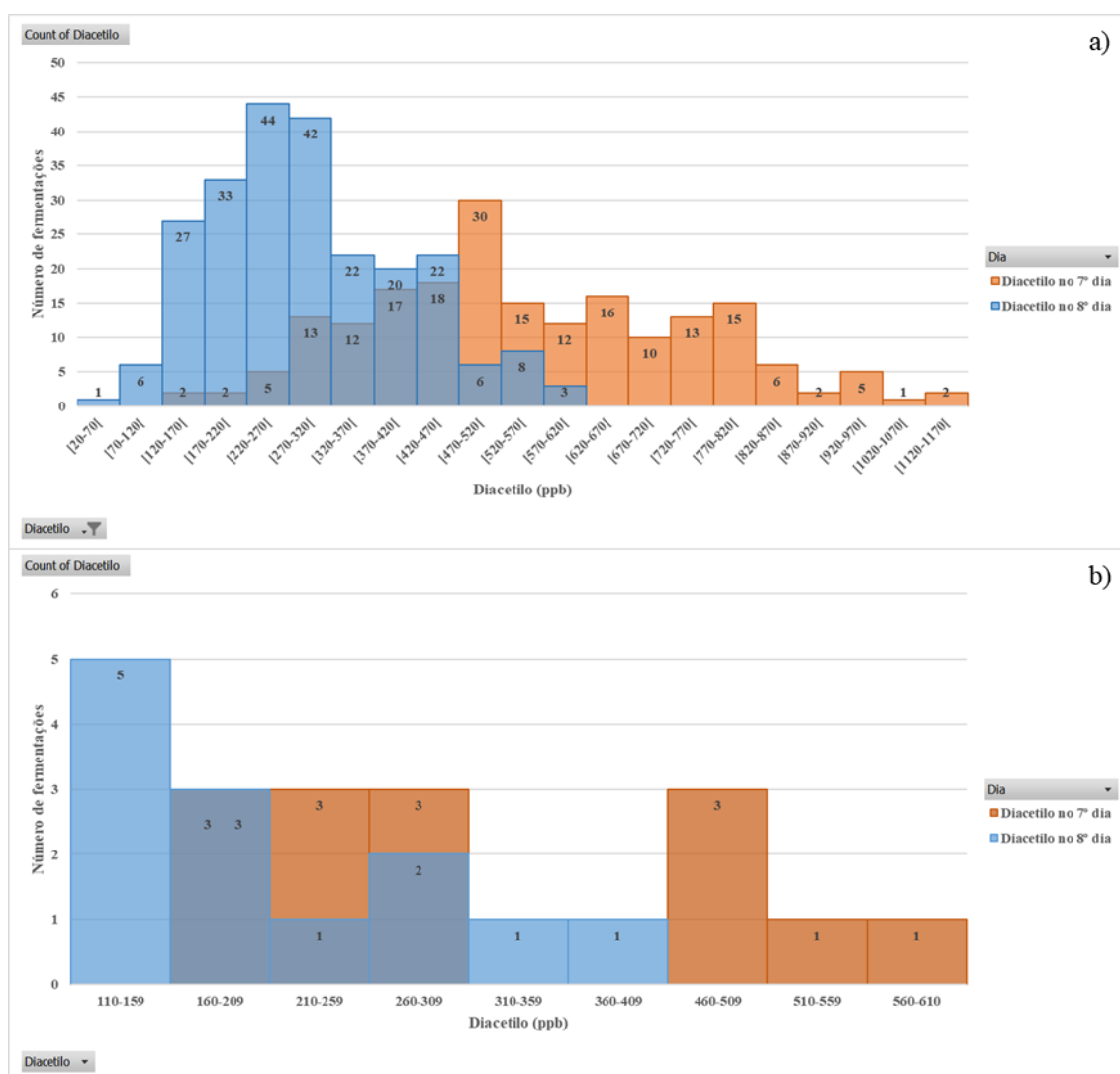
Na Figura 5.1-b) pode-se observar a distribuição dos valores de diacetilo ao 8º dia para 234 fermentações de cerveja Sagres Branca. Destas fermentações, 9 apresentaram valores entre 62 ppb e 127 ppb, o que sugere que algumas fermentações já puderam ser terminadas por possuírem uma concentração menor que 120 ppb. De um modo geral, é notável uma grande quebra nas concentrações de diacetilo em relação ao dia anterior. A média do diacetilo e o desvio padrão associado ficou nos $292,90 \pm 114,30$ ppb, sendo que o desvio representa 39,02% da média. A mediana mais uma vez foi inferior, de 277,00 ppb, o que revela um maior número de fermentações abaixo da média do que acima. Comprova-se assim a tendência na queda da concentração do diacetilo ao longo dos dias. Como referido, neste dia já se atingiram valores inferiores a 120 ppb em alguns fermentadores, pelo que já é necessário realizar o controlo diário deste indicador a partir do 8º dia.

A Figura 5.1-c) apresenta a distribuição dos valores de diacetilo ao 7º dia para 14 fermentações de cerveja Sagres Preta. É de notar uma grande disparidade de resultados, em que 9 fermentações ficaram abaixo dos 314 ppb e as restantes 5 acima dos 461 ppb, com valores muito altos para este indicador. Em nenhuma das fermentações se atingiu o limiar de 90 ppb, pelo que foi necessário prolongar a fermentação desta cerveja preta. A média e o desvio padrão associado do diacetilo ao 7º dia situou-se nos $333,71 \pm 146,66$ ppb, sendo que o desvio representou 43,95% da média. A mediana situou-se nos 275,00 ppb, abaixo da média.

Na Figura 5.1-d) é apresentada a distribuição dos valores de diacetilo ao 8º dia para 13 fermentações de cerveja Sagres Preta. Mais uma vez, é de frisar que o limite de 90 ppb não foi atingido, pelo que foi necessário prolongar todas as fermentações pelo menos mais um dia. De qualquer forma, é notória uma diminuição nos valores de diacetilo. A média e o desvio padrão associado dos valores de diacetilo situou-se nos $205,92 \pm 82,42$ ppb, pelo que o desvio representa

40,03% da média. A mediana foi de 180,00 ppb, mais uma vez abaixo da média. O facto de não se atingir o limite de 90 ppb de diacetilo ao 8º dia leva a que, caso não seja possível reduzir os valores de diacetilo nas fermentações futuras, seja benéfico para a empresa começar a realizar a análise diária deste indicador apenas após o 8º dia, poupando recursos do laboratório.

A Figura 5.2 permite uma comparação da distribuição da concentração de diacetilo entre o 7º e o 8º dias de fermentação. Desta forma, foi possível observar na Figura 5.2-a) que, do 7º para o 8º dia, na Sagres Branca, os valores de diacetilo tendem a baixar e a apresentar uma menor dispersão, concentrando-se num menor intervalo de valores. A Figura 5.2-b) permite tirar as mesmas conclusões em relação à Sagres Preta, apesar de menos perceptível devido ao menor número de resultados, o que confirma que o diacetilo diminui com o tempo de fermentação.



O estudo da distribuição dos valores de diacetilo na fermentação permitiu retirar várias conclusões. Por um lado, foi possível observar que alguns dos valores obtidos no 7º dia são muito

altos e vão de acordo com o reportado pelos operadores da empresa. Por outro, é notória uma redução dos valores de diacetilo entre o 7º e 8º dias de fermentação, pelo que os altos valores não se deverão a contaminações bacterianas, e mostrando que as leveduras utilizadas se encontram em boas condições fisiológicas e com capacidade de reduzir o diacetilo (Virvajärvi *et al.*, 2004; Nickel, 2020). Tanto na Sagres Branca, como na Sagres Preta, os limites máximos admitidos na cerveja “verde” não foram atingidos ao 7º dia, pelo que, caso não seja possível melhorar o indicador, não faz sentido a análise regular do diacetilo neste dia. É de notar que na Sagres Preta, ao 8º dia, também ainda não se atinge este valor.

Por último, pode-se observar que, apesar dos valores de diacetilo serem mais altos na Sagres Branca em comparação com a Sagres Preta, a redução de diacetilo é mais rápida na primeira. Isto deve-se principalmente ao tipo de malte utilizado. A cerveja preta é produzida através de uma mistura de maltes claros com maltes torrados. Os maltes torrados dão origem a mostos com extratos mais baixos, pois durante a torra, não só ocorre desnaturação dos enzimas do malte, como ocorrem reações não enzimáticas de caramelização e de Maillard entre os açúcares redutores e os aminoácidos, formando melanoidinas. Desta forma, não só a concentração de açúcares e aminoácidos disponíveis para o metabolismo da levedura é mais baixa, como as melanoidinas têm um efeito tóxico na levedura, inibindo o seu metabolismo, sendo a redução do diacetilo mais lenta (Coghe *et al.*, 2005). A presença das melanoidinas explica assim a grande diferença entre a velocidade de redução do diacetilo, que é maior na Sagres Branca que na Sagres Preta. No entanto, não explica que a concentração média de diacetilo ao 7º dia seja menor na Sagres Preta.

O menor teor de FAN dos maltes torrados poderia levar à formação de uma curva de diacetilo com dois picos (Nakatani *et al.*, 1984). No entanto, isto não parece ser o caso, visto que os valores de diacetilo ao 7º dia são mais reduzidos em comparação com os da Sagres Branca. Desta forma, pode ter ocorrido sim uma redução do período do pico do diacetilo por haver esgotamento dos aminoácidos do Grupo A prematuramente, levando a que a célula pare de produzir diacetilo mais cedo (Krogerus & Gibson, 2013a). Como o metabolismo da célula é afetado pelas melanoidinas, a célula terá um menor crescimento e poderá não necessitar de tanto FAN para a sua multiplicação. O facto de a fermentação primária terminar mais cedo pode levar a que a levedura também comece a reduzir o diacetilo mais cedo, atingindo valores mais baixos de diacetilo ao 7º dia. Como se verá em 5.1.3, o tempo até *Ruh* é superior na Sagres Branca em relação à Sagres Preta, o que confirma que não só a Sagres Preta tem um tempo de fermentação primária inferior, como inicia o seu *Ruh* mais cedo, iniciando a redução do diacetilo mais prematuramente que a Sagres Branca.

5.1.2 Análise da concentração de diacetilo em guarda e no produto acabado

O controlo dos valores de diacetilo nos produtos finais é um procedimento que auxilia a manutenção dos parâmetros de qualidade, devido à sua importância como *off-flavour*.

Após a fermentação, a conversão do α -acetolactato a diacetilo continua a acontecer durante a guarda, apesar de a uma baixa velocidade, assim como a redução do diacetilo pelas células, devido a uma presença residual de leveduras em suspensão, o que, aliado ao facto de a cerveja ser diluída após filtração, baixará a concentração de diacetilo a valores considerados aceitáveis e sem efeitos no perfil sensorial. O plano de amostragem em vigor contempla a colheita de amostras de cerveja em guarda para análise de diacetilo. Tendo em conta estas informações, é de esperar que, na guarda, a concentração de diacetilo tenha baixado, comprovando-se que continua a haver a diminuição deste composto, de forma a se obter um melhor produto final. Por outro lado, uma análise da concentração de diacetilo no produto final permite observar se o problema das altas concentrações de diacetilo persiste no produto acabado, o que acarreta problemas ao nível da qualidade e sabor da cerveja.

Desta forma, procedeu-se a uma análise das concentrações de diacetilo em guarda e produto final, tentando perceber se os altos valores de diacetilo da fermentação estão a ter consequência direta nos processos seguintes. A Tabela 5.1 sumariza os dados obtidos para as análises ao diacetilo realizadas pelo laboratório para a Sagres Branca e Sagres Preta em produto final engarrafado e para cerveja Sagres Branca em guarda. Já a Figura 5.3 apresenta a distribuição das concentrações de diacetilo nas mesmas guardas e nos produtos finais.

Tabela 5.1 - Valores médios de concentração do diacetilo (ppb) em guarda e no produto final para as cervejas Sagres Branca e Sagres Preta, com respetivos desvios padrão, número de amostras analisadas, intervalo de datas da colheita das amostras, limites e desvios ao limite. A sombreado **vermelho** encontram-se as médias com valores superiores aos dos limites máximos (em produto final) ou aos do limite controlo (guarda)

	Diacetilo (ppb)		
	Guarda	Produto Final	
	Sagres Branca	Sagres Branca	Sagres Preta
Média	58,92	22,32	48,25
Desvio padrão	25,71	8,65	36,74
Limite de controlo	30,00	20,00	20,00
Limite máximo		30,00	30,00
Desvio em relação ao limite máximo (%)	96,41	25,60	60,84
Nº de amostras analisadas	650	60	41
Nº de amostras acima do limite máximo (produto final) ou controlo (guarda)	614	10	16
Nº de amostras abaixo do limite máximo (produto final) ou controlo (guarda)	36	50	25
Intervalo de datas	2/01 a 30/12/2019	2/01 a 26/12/2019	4/01 a 20/12/2019

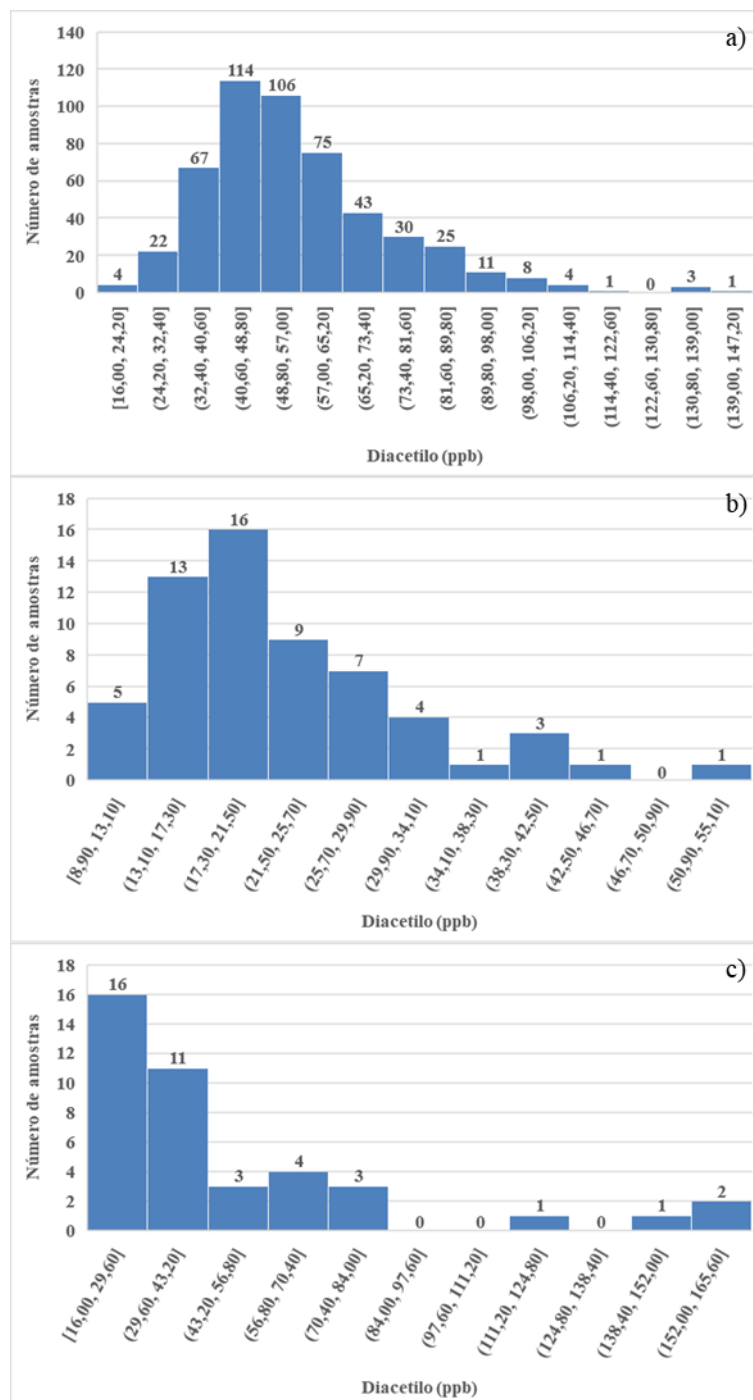


Figura 5.3 - Distribuição da concentração de diacetilo (ppb) das amostras analisadas, em 2019, no laboratório, de: **a)** guarda Sagres Branca; **b)** produto acabado Sagres Branca; **c)** produto acabado Sagres Preta

De acordo com a Tabela 5.1, foram analisadas 650 amostras de Sagres Branca em guarda durante o período de 2 de janeiro de 2019 e 30 de dezembro de 2019. A média de diacetilo e o desvio padrão associado situou-se nos $58,92 \pm 25,71$ ppb, valor que representa um desvio de 96,41% acima do limite de controlo (30,00 ppb). Apenas 36 das amostra apresentaram um valor de diacetilo abaixo do limite controlo. No entanto, este dado não é muito preocupante; tendo em conta que a fermentação é terminada após se atingir o limite de 120 ppb, uma média de 58,92 ppb para o diacetilo em guarda confirma que continuou a haver uma redução no diacetilo durante o

golpe de frio e a guarda para valores que correspondem a metade deste limite. Para além disto, estas amostras são colhidas 3 dias após a sua transferência para os tanques de guarda, pelo que ainda terão um maior período para sofrer a redução do diacetilo durante a maturação. Observam-se também 14 guardas com concentrações de diacetilo acima de 100,00 ppb, pelo que poderão representar um problema do ponto de vista da qualidade do produto pela alta concentração deste composto, uma vez que excedem o limiar de perceção sensorial do mesmo (situado entre os 100 a 200 ppb, segundo o investigador Wainwright (1973)). Destas guardas, 5 têm concentrações acima de 118,80 ppb, ou seja, próximas ou acima dos 120 ppb definidos para o término da fermentação, pelo que se pode dever a uma interrupção prematura da fermentação ou ser causadas por contaminações bacterianas, representando um risco do ponto de vista alimentar. Uma crítica deve ser feita quanto ao método aplicado na preparação destas amostras, visto que não são aquecidas, podendo haver ainda uma *pool* de α -acetolactato por converter em diacetilo, por defeito do método analítico, e sendo registados valores inferiores aos reais.

Quanto ao produto acabado, foram analisadas 60 amostras de Sagres Branca no período de 2 de janeiro a 26 de dezembro de 2019, segundo a Tabela 5.1. A média dos valores de diacetilo e o desvio padrão associado situou-se nos $22,32 \pm 8,65$ ppb, o que se encontra abaixo do limite máximo admitido pela qualidade – 30,00 ppb -, mas acima do limite de controlo de 20,00 ppb. Quando se soma o desvio padrão à média atinge-se o limite máximo, o que é um sinal alarmante. O valor médio representa um desvio de 25,60% para baixo do limite máximo. Das 60 amostras analisadas, 10 encontravam-se acima do limite máximo, encontrando-se as restantes abaixo deste valor. No entanto, uma das amostras obteve um valor muito superior ao valor máximo estabelecido para o diacetilo, superior a 50,90 ppb, e a grande maioria das amostras apresentou concentração acima de 17,30 ppb (42 amostras). Isto pode ser um problema do ponto de vista organolético, visto que o investigador Saison e os seus colaboradores (2009) determinaram que o limiar de deteção de diacetilo para algumas pessoas se situa nos 17 ppb, podendo assim ser identificado este *off-flavour* na maioria das amostras. Pode-se considerar então que a concentração de diacetilo média, apesar de abaixo do limite máximo, está próxima de atingir este valor, sendo atingida em alguns lotes, o que compromete a qualidade do produto. Desta forma, comprova-se que os altos valores de diacetilo também são um problema no produto final, pelo que esta situação deve ser corrigida.

Quanto à Sagres Preta, a Tabela 5.1 informa-nos que foram analisadas 41 amostras deste produto entre 4 de janeiro e 20 de dezembro de 2019. A média e o desvio padrão associado da concentração de diacetilo fixou-se nos $48,25 \pm 36,74$ ppb, sendo 60,84% superior ao limite máximo. Isto revela não só uma média muito acima dos limites controlo e máximos - 20,00 ppb e 30,00 ppb, respetivamente – como também uma enorme disparidade nos valores. Apesar de 25 amostras se situarem abaixo do limite máximo, 16 ultrapassaram este valor, sendo que algumas atingiram concentrações de diacetilo muito superiores. Destas, 4 amostras apresentaram um teor

de diacetilo acima de 111,20 ppb, o que é muito preocupante, visto que o limite máximo na fermentação deste tipo de cerveja é de 90 ppb antes sequer de ocorrer diluição, sugerindo uma contaminação bacteriana, algo que pode ser confirmado pelo estudo da razão diacetilo/2,3-pentanodiona ou por ensaios microbiológicos (Virkaajärvi *et al.*, 2004; Nickel, 2020). Em Sagres Preta, comprova-se assim que o problema das altas concentrações de diacetilo na fermentação se perpetua para o produto final, urgindo a sua correção, podendo inclusive ter ocorrido contaminações microbiológicas em alguns dos lotes. No entanto, do ponto de vista sensorial, uma concentração de diacetilo mais elevada pode ser menos percebida na Sagres Preta devido aos *flavours* mais intensos deste tipo de cerveja, que mascaram parcialmente o diacetilo.

Em suma, a análise da concentração de diacetilo em guarda e no produto final para Sagres Branca e Preta confirmou que o problema das altas concentrações de diacetilo durante a fermentação se propaga na maturação e se revela no produto final, sugerindo também a ocorrência de algumas contaminações microbiológicas, pelo que o controlo deste parâmetro e a tentativa da sua diminuição é de extrema importância para a qualidade do produto.

5.1.3 Relação entre o diacetilo e o tempo total de fermentação

Nos subcapítulos anteriores ficou comprovada a grande distribuição de valores encontrados para o diacetilo ao 7º e 8º dias, assim como para cerveja em guarda e produto final. Ora em todos os processos de fabrico da cerveja tenta-se ao máximo padronizar todos os elementos desta, desde as características intrínsecas do malte e dos outros ingredientes, até aos tempos e temperaturas dos processos da brassagem. Desta forma, espera-se que se obtenha um produto homogéneo e semelhante em todos os fabricos de cerveja. Tendo em conta que as condições são semelhantes, seria de esperar que os valores de diacetilo também fossem muito semelhantes. O facto de isto não acontecer torna necessário um estudo mais aprofundado para identificar as variáveis que podem ter influências na produção de diacetilo. Estas podem ter um papel mais importante na formação deste composto do que se julga à primeira vista, levando a que uma pequena variação num parâmetro leve a uma grande diferença na concentração de diacetilo.

As primeiras variáveis em estudo foram os tempos. A fermentação inicia-se com a inoculação da levedura num primeiro fabrico, seguido de arejamento, que será transferido para um fermentador. Nas horas seguintes, o fermentador é enchido com mais fabricos e é mantido a uma temperatura de fermentação durante algumas horas. Após este período, a temperatura é elevada, passando para a fase *Ruh*, onde é mantida até se atingir o limite aceitável de diacetilo. Entretanto, a levedura sedimentada foi removida após um certo período. Após o *Ruh*, aplica-se o golpe de frio em que se reduz a temperatura e se retira a cerveja “verde” do fermentador. Ora, neste processo, vários períodos de tempo são referidos, que podem todos eles ter influência nos

valores de diacetilo ao 7º e 8º dia: o tempo total da fermentação, o tempo até *Ruh*, o tempo de *Ruh* e o tempo de permanência da levedura.

Compreende-se como tempo total de fermentação o tempo que decorre desde o início da inoculação do primeiro fabrico do fermentador até ao tempo em que se inicia o golpe de frio, ou seja, em que se reduz a temperatura para precipitar a levedura. Este compreende o tempo até ao *Ruh* (que consiste no tempo de enchimento e no tempo em que decorre a atividade fermentativa da levedura) e o tempo de *Ruh*, sendo que o primeiro é controlado com *setpoints*, e o tempo de *Ruh* varia consoante os valores de diacetilo das amostras que vão sendo recolhidas, até se atingir o limite máximo admissível para concentração do composto.

A Figura 5.4 relaciona os tempos de fermentação necessários para as várias fermentações realizadas em 2019 com os valores de diacetilo para o 7º e 8º dias, para Sagres Branca e Preta. A Figura 5.4-a) permite relacionar o tempo de fermentação das cervejas Sagres Branca com os valores de diacetilo ao 7º dia. Pode-se observar que existiu uma relação entre as variáveis, em que, quanto maior o valor de diacetilo ao 7º dia, maior foi o tempo de fermentação necessário. Isto é lógico, pois quanto maior o valor de diacetilo ao 7º dia, mais tempo será necessário prolongar o *Ruh*, decorrendo um maior período para se atingir o limite de 120 ppb de diacetilo e, conseqüentemente, terminar a fermentação (Trelea *et al.*, 2002). Esta relação foi descrita por uma regressão linear, de acordo com a equação $y = 133,91x - 631,07$ em que a variável y representou

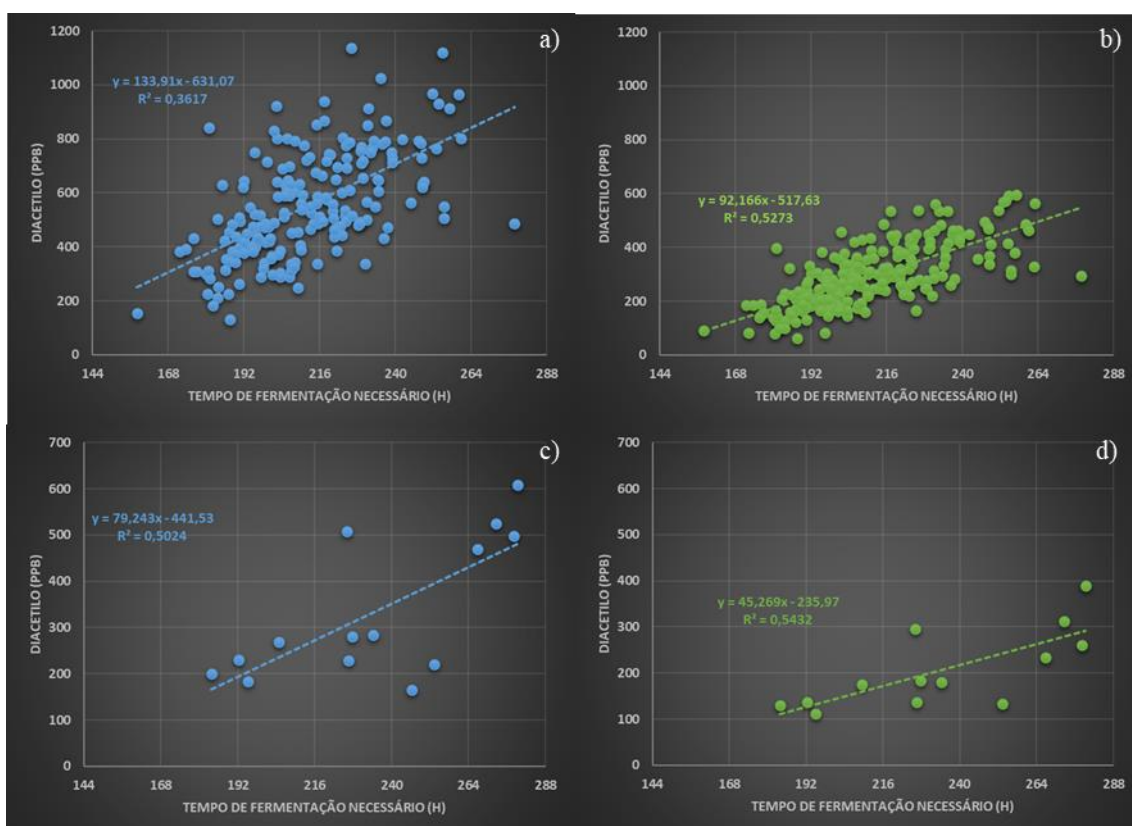


Figura 5.4 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e o tempo de fermentação necessário (h) das várias fermentações realizadas em 2019 em: **a)** Sagres Branca ao 7º dia; **b)** Sagres Branca ao 8º dia; **c)** Sagres Preta ao 7º dia; **d)** Sagres Preta ao 8º dia

o valor do diacetilo (em ppb) ao 7º dia e a variável x o tempo de fermentação total (em dias) esperado. A regressão apresentou um coeficiente de determinação (r^2) de 0,3617. O coeficiente de determinação é um valor entre 0 e 1 que descreve a proporção da variação de y que pode ser explicada por variações em x , sendo que quanto mais perto de 1, melhor é o grau de explicação da variação. Apesar do coeficiente de determinação ter sido baixo, o grande número de dados (>100) e o facto de se estar a prever o comportamento de um ser vivo (levedura), leva a que a regressão seja significativa com um nível de confiança de 99% ($r^2 > 0,07$), o que comprova que houve uma relação linear entre o diacetilo ao 7º dia e o tempo de fermentação (Hahn, 1973).

A Figura 5.4-b) reforça esta conclusão, pois os valores de diacetilo ao 8º dia relacionaram-se com o tempo de fermentação, de acordo com a equação linear $y = 92,271x - 518,55$, que apresentou um r^2 de 0,531, que é consideravelmente melhor. A média do tempo que demoraram as fermentações (até ao golpe de frio) de Sagres Branca foi de 211:01:45 h:min:s, com um desvio padrão de 21:24:25 h:min:s, que corresponde a 10,14% da média; já a mediana foi de 207:10:00 h:min:s, ligeiramente abaixo da média (Anexo).

A Figura 5.4-c) relaciona o tempo de fermentação da Sagres Preta com os valores de diacetilo ao 7º dia. Através desta, pode-se observar que as variáveis também apresentaram uma relação, sendo que quanto maior o valor de diacetilo ao 7º dia, maior foi o tempo necessário para a fermentação decorrer até se atingir o valor de 90 ppb de diacetilo. Esta relação foi descrita pela reta $y = 79,243x - 441,53$ e apresentou um r^2 de 0,5024. Apesar do coeficiente de determinação ser maior que na Figura 5.4-a), o facto de haver uma menor população de dados (14 amostras apenas) tornou esta regressão menos significativa que a anterior; no entanto, como se trata da previsão do comportamento de um organismo vivo, e o r^2 é superior a 0,44, é considerada significativa, num intervalo de confiança de 99% (Hahn, 1973).

A Figura 5.4-d) reforça estas conclusões. A concentração de diacetilo ao 8º dia relacionou-se com o tempo de fermentação de acordo com a reta $y = 45,269x - 235,97$, com um r^2 de 0,5432, ligeiramente melhor que na Figura 5.4-c) (e superior a 0,47 para 13 amostras), sendo estatisticamente significativa para um intervalo de confiança de 99% (Hahn, 1973). A média do tempo de fermentação da Sagres Preta foi de 232:15:23 h:min:s, com um desvio padrão de 30:15:29 h:min:s, que correspondeu a 13,03% da média; a mediana foi de 227:09:30 h:min:s, ligeiramente inferior à média (Anexo).

Em suma, comprovou-se que a concentração de diacetilo ao 7º e 8º dias tem uma influência direta no tempo de fermentação, sendo que quanto maior a concentração de diacetilo nestes dias, mais tempo será necessário de prolongar a fermentação, tal como reportado pela literatura (Boulton & Quain, 2001; Trelea *et al.*, 2002). A elaboração de regressões lineares permitiu afirmar que existe correlação entre as duas variáveis em estudo e obter retas que permitem prever o tempo de fermentação necessário com base no valor de diacetilo obtido ao 7º e ao 8º dias, tanto em Sagres Branca, como em Sagres Preta. As retas obtidas possuíram um r^2

aceitável, comprovando a correlação (Hahn, 1973), que foi melhor quando analisado o diacetilo ao 8º dia em relação aos valores do 7º dia, o que permite afirmar que, com o passar do tempo, há uma menor dispersão dos resultados. A Sagres Preta apresentou também um maior tempo de fermentação médio em relação à Sagres Branca, tal como esperado e comprovado em 5.1.1.

5.1.4 Relação entre o diacetilo e o tempo até ao *Ruh*

O tempo de fermentação pode ser dividido em duas parcelas: uma fixa e uma variável. A parcela fixa, que será designada por tempo até *Ruh*, consiste no tempo entre a inoculação da levedura no primeiro fabrico e a subida da temperatura até aos x° C. Esta parcela compreende o tempo de enchimento (que depende da velocidade a que está a ser fabricado o mosto) e o tempo a que se mantém a levedura a y° C (até se iniciar o *Ruh*), que são períodos cuja duração é definida por defeito e que não dependem de análises ao mosto. Já a parcela variável consiste no tempo em que a levedura é mantida em *Ruh*, que depende da concentração de diacetilo. Como tal, é importante estudar se há relação entre as concentrações de diacetilo com as pequenas variações que possam ocorrer na parcela fixa (tempo até *Ruh*), e se há relação entre o diacetilo e o tempo em *Ruh* (parcela variável).

A análise da Figura 5.5 foi clara: tanto para a cerveja Sagres Branca, como para a Sagres Preta, não existiu qualquer relação entre os valores de diacetilo nos 7º e 8º dias e o tempo até ao

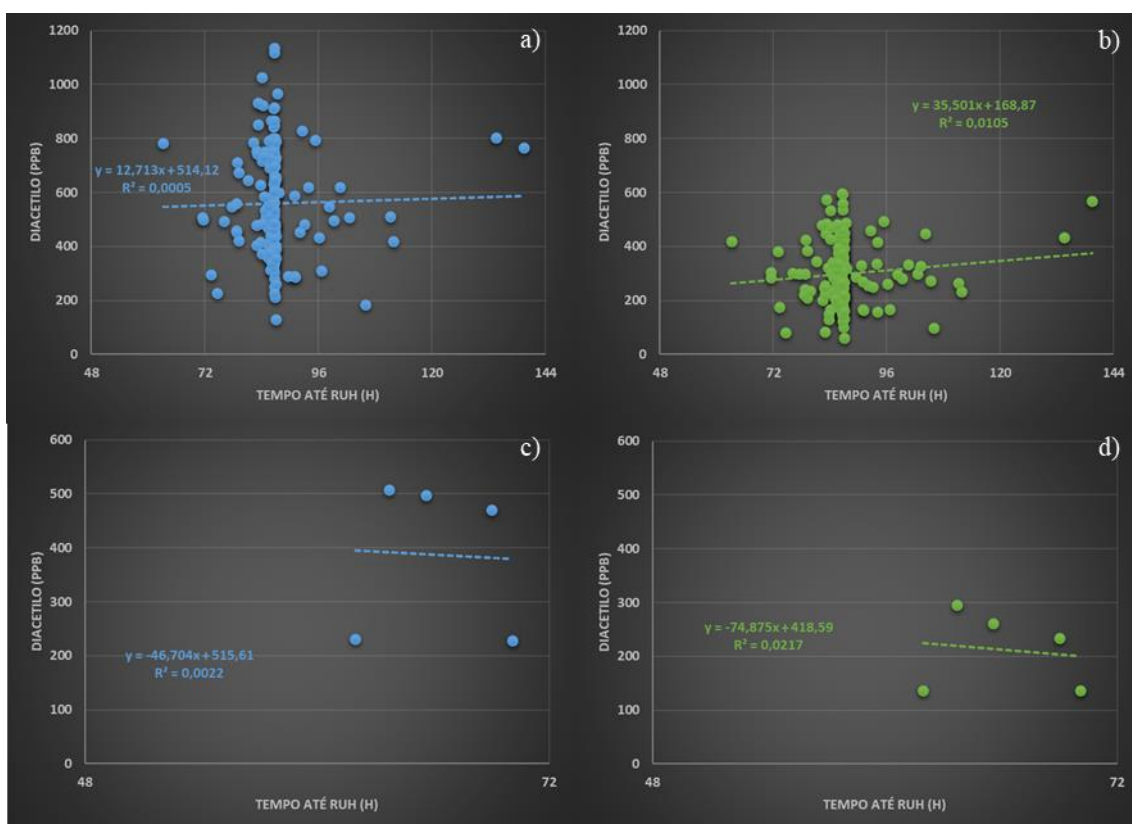


Figura 5.5 – Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e o tempo até ao *Ruh* (h) para as várias fermentações realizadas em 2019 em: **a)** Sagres Branca ao 7º dia; **b)** Sagres Branca ao 8º dia; **c)** Sagres Preta ao 7º dia; **d)** Sagres Preta ao 8º dia

Ruh. Isto pode ser observado nos gráficos, que apresentam uma grande dispersão nos dados e que não aparentam qualquer correlação entre as variáveis. As regressões lineares obtidas apresentaram valores de r^2 muito inferiores a 0,07, o que comprova a enorme dispersão de resultados e destrói qualquer possível relação entre as variáveis, tanto em Sagres Branca, como em Sagres Preta. Em Sagres Branca, o tempo até ao *Ruh* teve uma média de 87:10:42 h:min:s e um desvio padrão de 7:37:58 h:min:s, o que representou 8,76% da média; já a mediana foi de 86:35:00 h:min:s, ligeiramente abaixo da média (Anexo). Já em Sagres Preta, o tempo até ao *Ruh* teve uma média de 67:04:40 h:min:s e um desvio padrão de 3:34:34 h:min:s, o que representou 5,33% da média; já a mediana foi de 67:19:30 h:min:s, praticamente coincidente com a média (Anexo); a média e mediana do tempo até *Ruh* foi bastante inferior na Sagres Preta em relação à Sagres Branca.

O tempo até *Ruh* poderia ter influência na formação de diacetilo, principalmente devido ao tempo de enchimento do fermentador. A levedura é inoculada na totalidade durante o primeiro fabrico, sendo que os fabricos posteriores vão dar entrada no fermentador durante as horas seguintes. Tendo em conta que a levedura se encontra em contacto com o meio, esta inicia a sua fase *lag* em que se adapta às condições e começa a realizar, entre outros, o *uptake* dos aminoácidos do Grupo A, assim como a síntese do α -acetolactato. Desta forma, sempre que é introduzido no fermentador mais mosto, estamos a fornecer à levedura mais aminoácidos do Grupo A, o que pode levar a um prolongamento do *uptake* destes aminoácidos e, conseqüente, a uma pico prolongado de diacetilo. O tempo de enchimento quanto maior, teria assim um efeito negativo na qualidade da cerveja, pois levaria a uma maior produção de diacetilo. Um tempo de enchimento prolongado pode levar ao início da multiplicação celular antes do fim do enchimento, produzindo-se uma maior biomassa (Masschelein, 1981).

Apesar do mencionado no parágrafo anterior, os dados vêm desmentir esta teoria. A ausência de uma correlação direta entre as pequenas variações do tempo até ao *Ruh* e a concentração de diacetilo ao 7º e 8º, elimina este parâmetro da lista de fatores que influenciam o diacetilo. É verdade que uma pequena alteração no tempo de enchimento pode ter um pequeno efeito na formação de diacetilo, mas este não é observável ao fim de 7 dias de fermentação, sendo necessário um estudo detalhado da curva de diacetilo para tirar conclusões. Como, na prática, não se obtiveram resultados com influência direta no processo industrial, exclui-se este parâmetro, não sendo este uma das causas da grande amplitude dos valores de diacetilo observados.

5.1.5 Relação entre o diacetilo e o tempo de *Ruh*

A parcela variável do tempo de fermentação corresponde ao tempo de *Ruh*. A Figura 5.6 relaciona os tempos de *Ruh* necessários para as várias fermentações realizadas em 2019 com os valores de diacetilo para o 7º e 8º dias, para Sagres Branca e Preta.

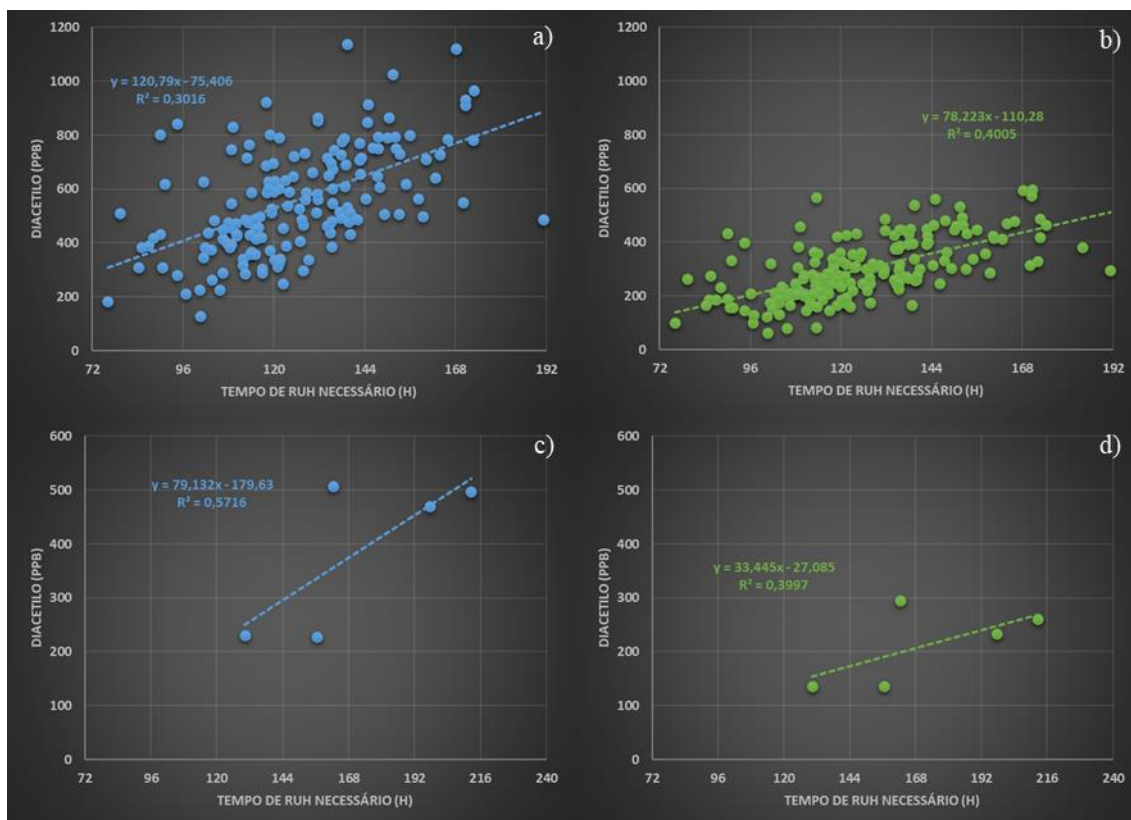


Figura 5.6 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e o tempo de *Ruh* necessário (h) para as várias fermentações realizadas em 2019 em: **a)** Sagres Branca ao 7^o dia; **b)** Sagres Branca ao 8^o dia; **c)** Sagres Preta ao 7^o dia; **d)** Sagres Preta ao 8^o dia

A Figura 5.6-a) relacionou o tempo de *Ruh* das várias fermentações de Sagres Branca com as concentrações de diacetilo ao 7^o dia. Tal como nos tempos de fermentação totais, observou-se uma relação entre as variáveis, sendo que quanto maior foi o valor do diacetilo ao 7^o dia, mais tempo foi necessário prolongar o *Ruh* até se atingir os 120 ppb deste composto. A relação foi descrita pela regressão linear de equação $y = 120,79x - 75,406$, em que x representou o tempo de *Ruh* (dias) que foi expectável para uma concentração y de diacetilo (ppb) ao 7^o dia. A regressão linear teve uma coeficiente de determinação de 0,3016 que, dado o grande número de dados e o facto da levedura ser um organismo vivo, permitiu concluir que a relação entre o tempo de *Ruh* e os valores de diacetilo ao 7^o dias foi significativa.

A Figura 5.6-b) veio reforçar a existência de uma correlação entre o *Ruh* e os valores de diacetilo. Nesta figura observaram-se os valores de diacetilo ao 8^o dia em função do tempo de *Ruh* necessário para as fermentações, obtendo-se a regressão linear de equação $y = 78,223x - 110,28$ com um r^2 de 0,4005, que foi melhor em relação ao da Figura 5.6-a). A média do tempo de *Ruh* necessário de aplicar às fermentações de Sagres Branca foi de 125:12:18 h:min:s, com um desvio padrão de 21:30:52 h:min:s, que correspondeu a 17,18% da média; por outro lado, a mediana foi de 121:25:00 h:min:s, ligeiramente inferior à média (Anexo).

Quanto à Figura 5.6-c) esta relacionou o tempo de *Ruh* necessário para as fermentações de Sagres Preta com os valores de diacetilo ao 7^o dia destas mesmas fermentações. As variáveis

em questão apresentaram uma correlação, em que quanto maior o valor de diacetilo ao 7º dia, mais tempo foi necessário de aplicar as temperaturas de *Ruh* ao mosto em fermentação até este atingir os 90 ppb de diacetilo. A relação entre as variáveis foi descrita por uma reta de equação $y = 79,132x - 179,63$ que apresentou um coeficiente de determinação de 0,5716 que, devido ao baixo número de amostras (apenas 5), não permitiu afirmar que a relação seja significativa, pois teria de ser superior a 0,65 para um intervalo de confiança de 90% (ou superior a 0,92 para um intervalo de confiança de 99%) (Hahn, 1973).

Na Figura 5.6-d) também se observou uma relação entre o tempo de *Ruh* e a concentração de diacetilo, nomeadamente os valores deste composto ao 8º dia de fermentação. Obteve-se um reta de equação $y = 33,445x - 27,085$ com um r^2 de 0,3997 que, devido ao baixo número de amostras (5), mais uma vez não permitiu concluir que a relação entre as variáveis seja estatisticamente significativa, sendo que deveria ser superior a 0,65 para um intervalo de confiança de 90% (Hahn, 1973). A média do tempo de *Ruh* necessário para as fermentações de Sagres Preta foi de 167:46:40 h:min:s, com um desvio padrão de 28:32:25 h:min:s que representou 17,01% da média; a mediana foi de 159:22:30 h:min:s, que foi bastante inferior à média (Anexo).

A análise da Figura 5.6 permitiu, em suma, comprovar que a concentração de diacetilo ao 7º e 8º dias tem uma influência direta no tempo de *Ruh* necessário de aplicar às fermentações para se atingirem as concentrações máximas de diacetilo, sendo assim necessário aplicar um maior tempo de *Ruh* quanto maiores forem estes valores de diacetilo. As regressões lineares obtidas permitiram afirmar, para a Sagres Branca, que existe uma correlação entre as duas variáveis em estudo, tal como reportado pela literatura (Boulton & Quain, 2001; Trelea *et al.*, 2002). Apesar das regressões lineares obtidas para a Sagres Preta não terem sido consideradas significativas devido ao baixo número de amostras, uma extrapolação dos resultados da Sagres Branca indica que o mesmo pode ocorrer com a Sagres Preta (Hahn, 1973). Os coeficientes de determinação foram superiores quando analisados os dados do 8º dia em relação aos do 7º dia. A relação entre o tempo total de fermentação e os valores de diacetilo deve-se, assim, à parcela variável, ou seja, ao tempo de *Ruh* necessário, e não ao tempo até ao *Ruh* (parcela fixa).

É também de referir a grande diferença entre os tempos de *Ruh* médios da Sagres Branca, que foram inferiores ao da Sagres Preta, mesmo tendo em conta o facto de que o limite máximo de diacetilo para a cerveja Sagres Preta é de 90 ppb, enquanto que o da Sagres Branca é de 120 ppb. Apesar do menor valor registado para a média do tempo até *Ruh* na Sagres Preta em relação à Sagres Branca, o tempo de *Ruh* tem um comportamento inverso, que tem até um peso superior no tempo de fermentação total, tal como visto anteriormente na relação entre os valores de diacetilo e o tempo total de fermentação e em 5.1.1. Desta forma, pode-se concluir que a redução do diacetilo é mais lenta na cerveja Sagres Preta em relação à Sagres Branca, podendo-se tal dever ao facto do malte utilizado para a cerveja preta possuir melanoidinas que são tóxicas para a levedura, interferindo com o processo de *uptake* e conseqüente redução do diacetilo por este ser

vivo, aumentando o tempo total de fermentação necessário, assim como o tempo de *Ruh* destas fermentações (Coghe *et al.*, 2005). Se isto for de facto verdade, os altos valores de diacetilo apresentados devem-se apenas ao metabolismo da levedura e não à conversão do α -acetolactato a diacetilo, pelo que é interessante estudar uma possível redução da temperatura de *Ruh* para valores mais baixos, que promovam uma menor formação de *off-flavours* como consequência da produção de álcoois superiores e ésteres ou pela autólise da levedura.

5.1.6 Relação entre o diacetilo e o tempo de permanência da levedura

O processo de redução do diacetilo pela levedura é iniciado após a conversão do α -acetolactato neste composto. Desta forma, a existência de uma grande superfície de contacto com a levedura favorece um rápido transporte e metabolização deste composto pela levedura, tornando a reação de descarboxilação do α -acetolactato o fator limitante para a redução do teor de diacetilo. Sabe-se que as leveduras *Lager*, como é o caso, realizam a sua fermentação a temperaturas mais baixas e tendem a flocular e sedimentar com facilidade, pelo que se reduz mais rapidamente a quantidade de leveduras em suspensão disponíveis para reduzir o diacetilo (Verstrepen *et al.*, 2003). Apesar de muitas das leveduras mortas em suspensão terem tendência a sedimentar, a grande maioria das que sedimenta encontra-se viva e disponível para a redução do diacetilo. Desta forma, seria de esperar que a levedura precipitada na base do fermentador tivesse impacto na concentração do diacetilo.

O tempo de permanência da levedura corresponde ao tempo que decorre entre a inoculação da levedura e o momento em que é colhida a levedura que, entretanto, sedimentou na base do fermentador cilindrocónico. A relação entre este tempo e os valores de diacetilo encontra-se representado na Figura 5.7.

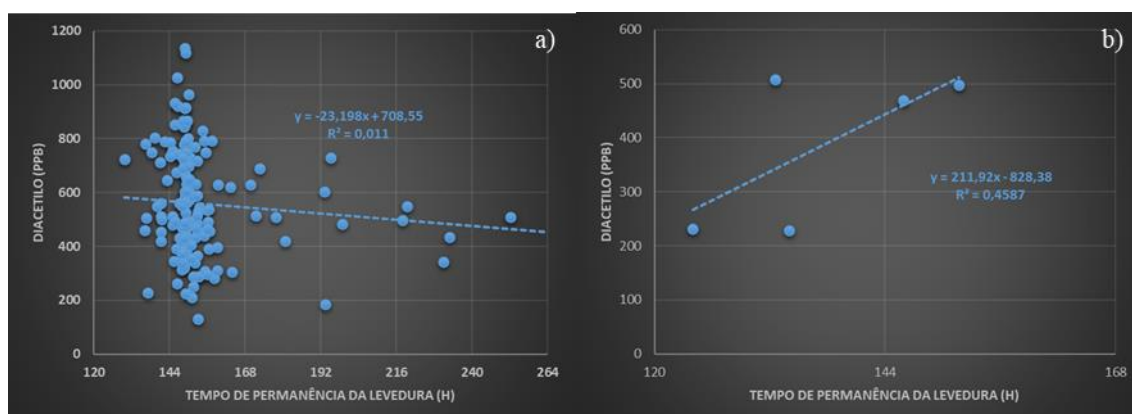


Figura 5.7 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e o tempo de permanência total da levedura (h) para as várias fermentações realizadas em 2019 em: **a)** Sagres Branca ao 7º dia; **b)** Sagres Preta ao 7º dia

A análise da Figura 5.7-a) não estabeleceu qualquer relação entre o tempo de permanência da levedura e as concentrações de diacetilo ao 7º dia, para a Sagres Branca. Observa-se uma grande dispersão de dados, o que não permite tirar grandes conclusões. A regressão linear obtida traduziu-se na reta de equação $y = -23,198x + 708,55$ com um r^2 de 0,011. Apesar do declive ser

negativo, o que faz sentido visto que seria de esperar que quanto maior o tempo de permanência da levedura no fermentador, menor deveria ser o valor de diacetilo ao 7º dia, o coeficiente de determinação é muito baixo, inferior aos 0,07 necessários para considerar a regressão como significativa num intervalo de confiança de 99% (Hahn, 1973), pelo que se considera que não há qualquer correlação entre estas variáveis na cerveja Sagres Branca. O tempo de permanência da levedura médio para Sagres Branca foi de 157:25:35 h:min:s, com um desvio padrão de 23:20:59 h:min:s, que correspondeu a 14,83% da média; a mediana foi de 149:52:00 h:min:s, bastante abaixo da média (Anexo). A grande diferença entre a média e a mediana deveu-se sobretudo a momentos em que o *harvesting moment*, ou seja, o momento da colheita da levedura, coincidiu em épocas de descanso dos trabalhadores, prolongando o tempo em que a levedura esteve em contacto com o meio e aumentando a média.

A Figura 5.7-b), à primeira vista, parece estabelecer alguma correlação entre o tempo de permanência da levedura e as concentrações de diacetilo ao 7º dia para Sagres Preta, o que vai contra as conclusões obtidas pela análise da Figura 5.7-a). Obteve-se uma reta com a equação $y = 211,92x - 828,38$ que apresenta um r^2 de 0,4587. O facto de apenas serem consideradas 5 amostras para esta relação leva a que esta não seja considerada como significativa para um intervalo de confiança de 90%, pois deveria ser superior a 0,65. Para além disto, há que observar o declive da reta. O declive positivo sugere que quanto maior o tempo de permanência da levedura no fermentador, maiores serão os valores de diacetilo ao 7º dia. Ora isto não faz qualquer sentido, pois seria de esperar exatamente o contrário, ou seja, que uma maior permanência da levedura no fermentador desse origem a menores concentrações de diacetilo. Desta forma, considera-se esta regressão como não significativa e a aparente relação entre variáveis, à primeira vista, como fruto de um baixo número de amostras analisadas. O tempo de permanência médio da levedura para Sagres Preta foi de 145:17:10 h:min:s, com um desvio padrão de 19:20:12 h:min:s, que correspondeu a 13,31% da média; a mediana foi de 139:58:00 h:min:s, abaixo da média (Anexo).

Em suma, o tempo de permanência da levedura no fermentador não teve qualquer relação com os valores de diacetilo ao 7º dia tanto para Sagres Branca, como Sagres Preta, apesar do que seria de esperar pela literatura, visto que as leveduras sedimentadas ainda possuem capacidade de redução do diacetilo. Isto pode-se também dever à baixa conversão do α -acetolactato a diacetilo pela reação espontânea de descarboxilação, sendo que as leveduras em suspensão serão suficientes para reduzir o diacetilo, formando acetoína. Não havendo relação entre o tempo de permanência da levedura no fermentador e a concentração de diacetilo, pode-se sugerir uma redução no número de horas a que a levedura é deixada no fermentador de forma a que se colham leveduras com uma maior percentagem de viabilidade para inoculação noutros fermentadores, evitando também a autólise da levedura quando sujeita a temperaturas de *Ruh* durante largos períodos de tempo.

5.1.7 Relação entre o diacetilo e a taxa de arejamento do mosto

A presença de O₂ (oxigénio) no mosto é essencial para o crescimento da levedura, pois permite que esta produza os lípidos necessários para a sua membrana, nomeadamente esteróis e ácidos gordos insaturados. A concentração deste composto deve ser controlada. Por um lado, uma baixa concentração de O₂ limita o crescimento da levedura e leva a uma fermentação incompleta e lenta. Por outro lado, uma aeração em excesso leva a uma deterioração do produto (Brányik *et al.*, 2008).

A Figura 5.8 tentou relacionar a concentração de diacetilo ao 7º dia na cerveja Sagres Branca, em ppb, com a taxa de arejamento, ou seja, com a concentração de oxigénio, em ppm, que foi dissolvido no mosto.

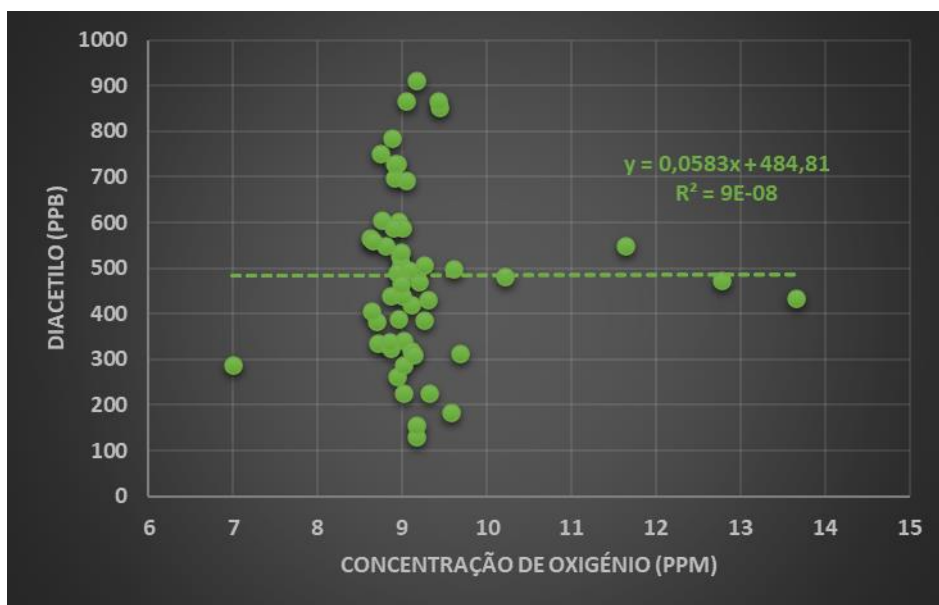


Figura 5.8 - Relação entre a concentração de diacetilo ao 7º dia (ppb) e a taxa de oxigenação do mosto (ppm) para as fermentações realizadas entre 2 de setembro e 1 de dezembro de 2019 em Sagres Branca

Tal como é possível observar na figura, não se encontrou qualquer correlação lógica entre a concentração destas duas moléculas no mosto. A regressão linear obtida apresentou um coeficiente de determinação extremamente baixo, perto de 0, o que permite inferir que a relação não é significativa. As fermentações de Sagres Branca apresentadas na Figura 5.8 tiveram um arejamento médio de 9,20 ppm de O₂, com um desvio padrão de 0,90 ppm de O₂, o que representou 9,75% da média. Já a mediana foi de 9,00 ppm de O₂, ligeiramente abaixo da média.

Apesar dos dados apresentados na Figura 5.8 apenas se referirem a um período de 3 meses e apenas à cerveja Sagres Branca, parece correto concluir que a taxa de oxigenação não possui uma clara influência na concentração de diacetilo ao 7º dia de fermentação. De acordo com a literatura, o oxigénio em si não tem uma influência direta na produção de diacetilo. No entanto, concentrações mais altas deste composto levam a uma maior proliferação celular, com uma rápida e grande multiplicação da levedura, que leva a um esgotamento da valina do meio e a uma reforçada síntese de α -acetolactato pela célula. Desta forma, obter-se-ia uma alta concentração de

α -acetolactato no mosto, assim como uma elevada densidade celular (Portno, 1966; Brányik *et al.*, 2008). Seria assim de esperar que existisse uma relação entre as variáveis em estudo, ou seja, que quanto maior o arejamento, maior fosse a concentração de diacetilo ao 7º dia.

Apesar disto, é sugerido que a elevada concentração celular formada pela alta oxigenação também tem influência no diacetilo, levando a que existam mais células em suspensão para reduzir o diacetilo do mosto (Dzialo *et al.*, 2017). Se se considerar como fator limitante da redução do diacetilo a conversão do α -acetolactato a diacetilo, esta última afirmação não faz sentido, pois tanto a altas como a baixas concentrações celulares a remoção do diacetilo acontece se a levedura se encontrar em boas condições. No entanto, o facto de não se observar uma correlação entre a oxigenação e o diacetilo ao 7º dia pode sugerir que, apesar de numa fase inicial se formar um pico mais alto de diacetilo, a maior proliferação celular ajuda a uma redução mais rápida do diacetilo, não sendo claro o seu efeito ao fim de 7 dias de fermentação; seria necessário então estudar a curva do diacetilo ao longo de toda a fermentação. Os investigadores Kucharczyk e Tuszyński (2017), apesar de observarem um maior crescimento celular em mostos com maior arejamento e maior formação de ésteres e álcoois superiores, não observaram diferenças significativas entre os valores de diacetilo no fim de 18 dias em fermentação, sugerindo que o efeito de um potencial maior pico de diacetilo desaparece com o tempo. Outra hipótese é que a variação entre as taxas de oxigenação aplicadas é de uma amplitude tão baixa que não é claro haver qualquer efeito entre a oxigenação e a concentração de diacetilo ao 7º dia.

5.1.8 Relação entre o diacetilo e a taxa de multiplicação da levedura

A taxa de multiplicação da levedura consiste na razão entre a quantidade total levedura recolhida do fermentador e a quantidade de levedura inoculada. Desta forma, uma taxa de multiplicação de 2,00 significa que se recolheu o dobro do número de células inoculadas, durante a fermentação. Na Figura 5.9 foi representada a relação entre as concentrações de diacetilo ao 7º dia com a taxa de multiplicação da levedura em várias fermentações.

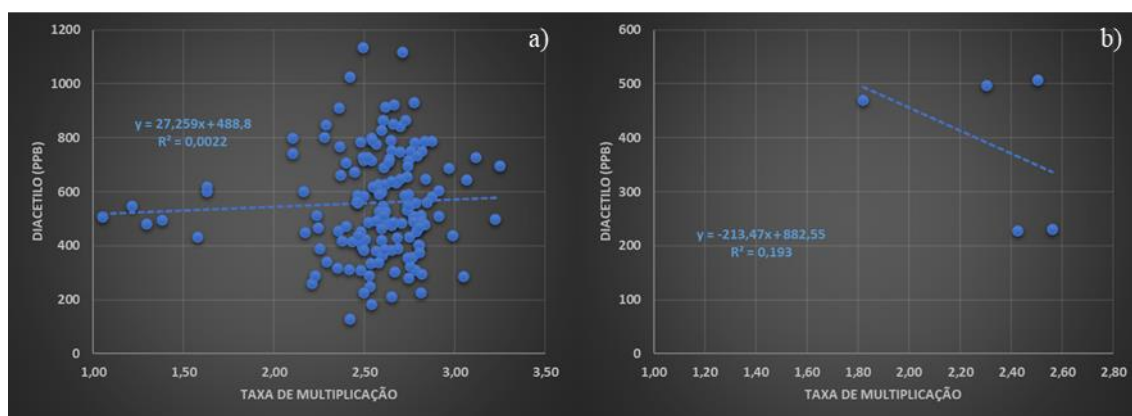


Figura 5.9 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e a taxa de multiplicação da levedura para as várias fermentações realizadas em 2019 em: **a)** Sagres Branca ao 7º dia; **b)** Sagres Preta ao 7º dia

Na Figura 5.9-a) não foi possível estabelecer uma relação entre a taxa de multiplicação observada com as concentrações de diacetilo ao 7º dia em fermentações de Sagres Branca. É notória uma dispersão de dados, existindo um grande número de amostras com uma taxa de multiplicação entre os 2,00 e 3,40, havendo outro *cluster* de amostras com uma taxa de multiplicação entre os 1,00 e 1,70. Este último conjunto de dados é referente a leveduras de geração 0, ou seja, leveduras jovens provenientes de um propagador de levedura e que são inseridas num fermentador com o mosto pela primeira vez; este tipo de levedura tem tendência a ter baixas taxas de multiplicação na primeira fermentação. A regressão linear apresentada para descrever a relação entre as variáveis apresentou um r^2 de 0,022, extremamente baixo, que permite afirmar que a correlação em estudo não é significativa, sugerindo que estas variáveis não têm ligação. A taxa de multiplicação média da levedura em Sagres Branca foi de 2,52, com um desvio padrão de 0,39 que representou 15,27% da média; já a mediana foi de 2,59, ligeiramente acima da média (Anexo).

A Figura 5.9-b) à primeira vista pareceu estabelecer uma correlação entre a taxa de multiplicação da levedura em Sagres Preta e os valores de diacetilo ao 7º dia. Obteve-se uma regressão linear com um coeficiente de determinação de 0,193. No entanto, para um tão baixo número de amostras (apenas 5), o r^2 deveria ser superior a 0,65 para ser considerado como significativo num intervalo de confiança de 90% (Hahn, 1973). A média da taxa de multiplicação da levedura em Sagres Preta foi de 2,31 com um desvio padrão de 0,24, que representou 10,61% da média; a mediana foi de 2,36, ligeiramente acima da média (Anexo). É de notar que a média e mediana da taxa de multiplicação da levedura são superiores na Sagres Branca em relação à Sagres Preta, o que comprova que o mosto desta última tem efeitos negativos na vitalidade e metabolismo da levedura.

A taxa de multiplicação da levedura é um parâmetro com um efeito semelhante ao da oxigenação. Como explicado anteriormente uma maior oxigenação celular levaria, conseqüentemente, a uma maior e mais rápida multiplicação celular. Assim, tal como no estudo do parâmetro anterior, uma maior multiplicação celular teria, por um lado, o efeito de ser produzido mais diacetilo durante a fermentação por se esgotar a valina do meio e, por outro, resultaria numa maior concentração de células em suspensão que poderiam reduzir o diacetilo mais rapidamente (Portno, 1966). No entanto, tal como para a oxigenação, não se observa qualquer correlação entre a taxa de multiplicação e a concentração de diacetilo. Contudo, isto não quer dizer que não haja de facto uma alteração na produção de diacetilo. Tal como sugerido para a oxigenação, uma maior taxa de multiplicação pode levar a um maior pico de diacetilo, que é depois também reduzido mais rapidamente e cujos valores ao 7º dia já serão semelhantes aos de outras fermentações; deve assim, ser estudada a curva do diacetilo em toda a fermentação. Outro fator prende-se no facto da taxa de multiplicação da levedura ser calculada com base na quantidade de levedura recolhida no *harvesting moment*, ou seja, com base na quantidade de

levedura que precipitou na base do fermentador ao fim de um determinado período. A floculação e precipitação da levedura pode ser causada por vários fatores, como a temperatura da fermentação ou as condições de armazenamento da levedura antes do *pitching*, pelo que podem ocorrer fermentações em que se colhem menores quantidades de levedura, mas que possuem uma densidade celular em suspensão muito superior a outras fermentações onde se colheram maiores quantidades de levedura, pelo que a taxa de multiplicação calculada desta forma não é totalmente fiável (Verstrepen *et al.*, 2003).

É também de notar a diferença entre a média da taxa de multiplicação da levedura nas cervejas Sagres Branca e Sagres Preta. Nesta última, a taxa de multiplicação foi inferior, o que pode comprovar que o uso de maltes com teores de melanoidinas mais altos pode, de facto, ter influência no crescimento da levedura, pelos seus efeitos tóxicos para com esta (Coghe *et al.*, 2005).

5.1.9 Relação entre o diacetilo e a viabilidade da levedura

A viabilidade da levedura consiste na percentagem de células vivas de uma determinada população em relação ao total de células dessa mesma população. Uma boa levedura para inoculação deve ter uma alta viabilidade, de preferência acima de 95%, pois tem influência no crescimento da levedura, e baixas viabilidades podem levar à formação de maiores concentrações de SO₂ (Kucharczyk & Tuszyński, 2017). A Figura 5.10 procurou relacionar a viabilidade da levedura inoculada com a quantidade de diacetilo ao 7º dia formado no fermentador onde se encontra essa mesma levedura.

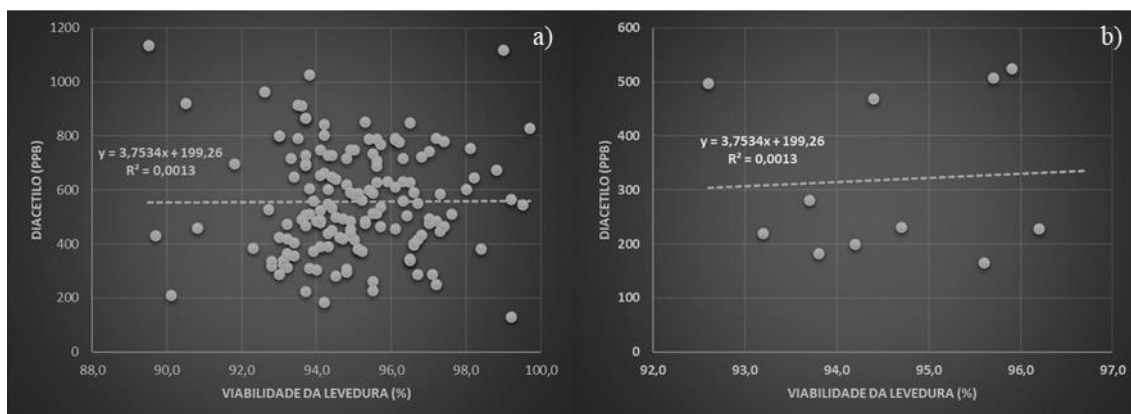


Figura 5.10 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e a viabilidade da levedura inoculada (%) para as várias fermentações realizadas em 2019 em: **a)** Sagres Branca ao 7º dia; **b)** Sagres Preta ao 7º dia

A Figura 5.10-a) procurou relacionar a concentração de diacetilo ao 7º dia com a viabilidade da levedura utilizada, em percentagem, no fermentador de Sagres Branca. Numa primeira análise, observou-se uma grande dispersão de dados, não sendo de notar uma relação entre as variáveis. A regressão linear apresentada possuiu um coeficiente de determinação de 0,0013 o que sugere que a regressão não foi significativa e que a equação não traduziu o comportamento destas variáveis, pelo que se pode afirmar que não houve correlação entre estas.

A média da viabilidade da levedura utilizada nas fermentações de Sagres Branca, e o desvio padrão associado, foi de $94,68 \pm 2,73\%$, em que o desvio representou 2,89% da média; a mediana foi de 94,80%, ligeiramente acima da média (Anexo).

Na Figura 5.10-b) procurou-se estudar a relação entre estas mesmas variáveis na cerveja Sagres Preta. Também não se observou qualquer correlação lógica entre as variáveis, o que foi reforçado pelo baixo r^2 da regressão linear obtida, de 0,0013, que sugere que não houve uma relação significativa entre a quantidade de diacetilo ao 7º dia e a viabilidade da levedura inoculada. A média e o desvio padrão associado da viabilidade da levedura inoculada nas fermentações de Sagres Preta foi de $94,78 \pm 1,20\%$, em que o desvio correspondeu a 1,27% da média; a mediana foi de 94,70%, ligeiramente abaixo da média (Anexo).

Em suma, para ambos os tipos de cerveja, não foi observado qualquer relação entre a quantidade de diacetilo ao 7º dia e a viabilidade da levedura inoculada nesse mesmo fermentador. Seria de esperar que, quanto menor a viabilidade da levedura, maior fosse a formação de diacetilo, uma vez que será necessária uma maior proliferação celular. Por outro lado, as leveduras em piores condições fisiológicas, que se traduzem numa menor viabilidade, têm tendência para uma maior produção de diacetilo. No entanto, isto não se observa. A não observação de uma correlação não impede que a viabilidade tenha efeito na formação de diacetilo; uma levedura com menor viabilidade pode levar um pico de diacetilo superior, mas, que por outro fator, não tenha expressão na quantidade de diacetilo observado ao 7º dia.

5.1.10 Relação entre o diacetilo e o fermentador

Tal como explicado em 3.2.3.2, as dimensões de um fermentador, como a razão entre a base a altura, e o tipo de fermentador têm influência no processo fermentativo. Esta influência é dada principalmente pela ação dos movimentos de circulação criados pela libertação de CO_2 durante a fermentação, que suspendem a levedura e permitem uma melhor mistura dos elementos do mosto (Boulton & Quain, 2001; Kissmeyer & Oliver, 2020).

No contexto industrial, mesmo dentro do mesmo tipo de fermentador, existem diferenças que podem ter impacto na fermentação. Uma grande diferença consiste nas dimensões do fermentador em que vai ser efetuada a fermentação. Outra diferença prende-se pela distância que o mosto inoculado percorre entre o local de inoculação e o fermentador em questão, visto que existem alguns fermentadores mais próximos e outros mais distantes deste local, que pode ter influência no *stress* provocado na levedura. A idade dos fermentadores também varia, pelo que os sistemas de refrigeração e os sensores de temperatura podem não ser tão eficientes nuns, em relação a outros, ou o próprio interior pode estar degradado e ser alvo de oxidação pelos baixos pH fermentativos. A CIP pode também não ser tão bem efetuada nalgum fermentador, levando ao aparecimento de mais contaminações. Estas pequenas diferenças levaram a que fosse

interessante que se realizasse o estudo do impacto do fermentador na formação do diacetilo e na taxa de multiplicação da levedura, identificando potenciais fermentadores defeituosos.

5.1.10.1 Diacetilo por fermentador

A Figura 5.11 relacionou as concentrações de diacetilo ao 7º dia de cerveja Sagres Branca com os respetivos fermentadores onde se realizaram as fermentações em questão. As médias e desvios padrão do diacetilo ao 7º dia para cada um dos fermentadores analisados encontram-se compilados na Tabela 5.2, para este tipo de cerveja.

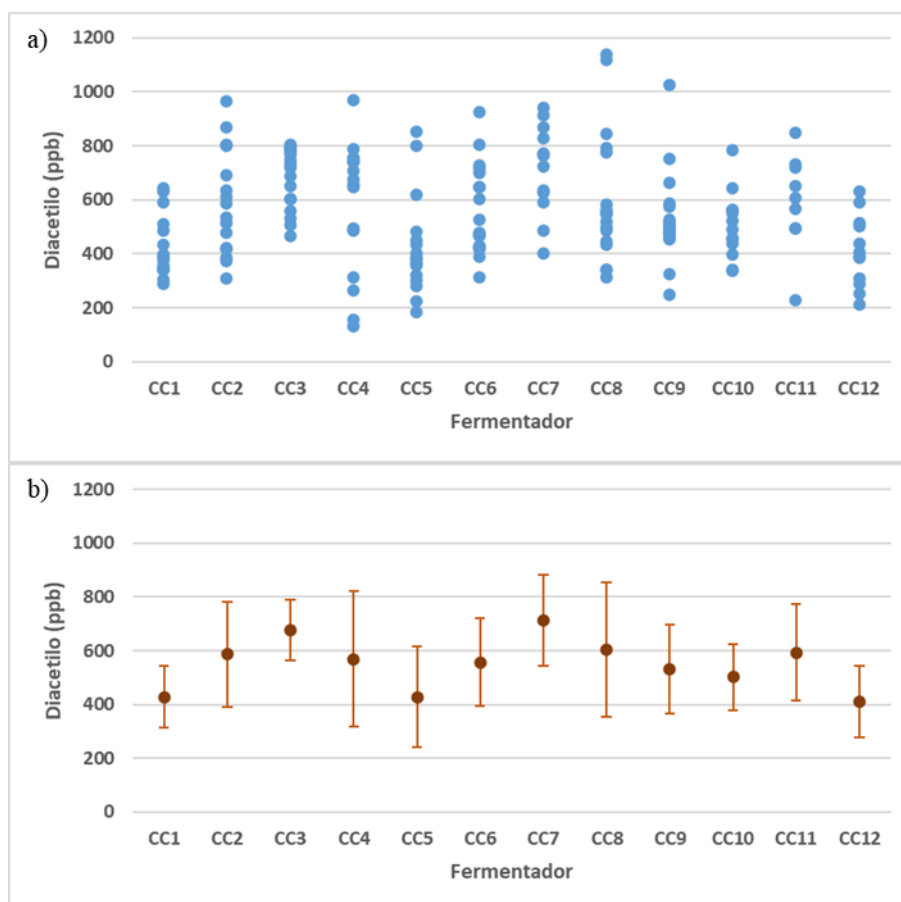


Figura 5.11 - Relação entre a concentração de diacetilo ao 7º dia (ppb) e o fermentador (CC1 a CC12) onde foi realizada a fermentação para as várias fermentações de Sagres Branca realizadas em 2019: **a)** Valores absolutos de diacetilo; **b)** Valores médios de diacetilo e respetivos desvios padrão

A Figura 5.11-a) permitiu explorar a distribuição das concentrações de diacetilo ao 7º dia que ocorreram em cada um dos fermentadores cilindrocónicos em estudo. Em fermentadores como a CC1, CC3, CC10 e CC12 os valores de diacetilo foram precisos. Em fermentadores como CC4 e CC8 os dados foram menos precisos, distribuindo-se por uma maior amplitude de valores.

A Figura 5.11-b) apresentou os valores médios de diacetilo ao 7º dia para cada um dos fermentadores, e os desvios padrão associados. As médias, os desvios padrão, o desvio padrão em percentagem e o número de fermentações realizadas em cada fermentador estão compilados na Tabela 5.2. A análise desta figura e da tabela permite tirar algumas conclusões. Os fermentadores que apresentaram um diacetilo médio ao 7º dia mais baixo foram a CC12 (410,1 ppb), a CC5

(427,7 ppb) e a CC1 (428,1 ppb). Por outro lado, os que apresentaram maiores valores foram a CC7 (712,5 ppb), CC3 (677,5 ppb) e a CC8 (604,9 ppb). Os valores mais elevados para o desvio padrão pertenceram à CC4 (251,2 ppb), à CC8 (249,0 ppb) e à CC2 (194,6 ppb); já os menores foram referentes à CC3 (112,5 ppb), CC1 (116,1 ppb) e CC10 (122,5 ppb).

Comparando os vários fermentadores, há alguns dados a salientar. O fermentador CC3 tem tendência a obter maiores concentrações de diacetilo; tal é confirmado pela alta média associada a um pequeno desvio padrão. O CC7 parece estar também associado a altos valores de diacetilo, apesar de ter um maior desvio padrão. No lado oposto, encontramos o CC1 e o CC12 que possuem um baixo valor médio de diacetilo, assim como um pequeno desvio padrão. De facto, se se somar o desvio padrão à média do diacetilo para os fermentadores CC1 e CC12, o valor obtido é inferior à subtração do desvio padrão aos valores médios de diacetilo nos CC3 e CC7, o que confirma que há uma diferença notável entre estes fermentadores.

A análise da Figura 5.11-b) também permite observar outra particularidade. Após a inoculação, o mosto pode ser redirecionado para um fermentador por duas vias: seguindo um circuito no sentido CC1 → CC12 ou no sentido CC12 → CC1. Geralmente, os fermentadores CC1 a CC6 são enchidos no sentido CC1 → CC12 e os fermentadores CC7 a CC12 são enchidos no sentido CC12 → CC1. Desta forma os mostos nas CC1 e CC12 costumam percorrer uma distância menor entre o local de inoculação e o fermentador que os mostos que entrarão nos fermentadores CC6 e CC7 (que são os que percorrem uma maior distância). A figura mostra que nos fermentadores CC1 a CC6 os valores médios de diacetilo vão aumentando de CC1 a CC3, havendo depois uma diminuição até CC5 e um novo aumento em CC6. Já no sentido contrário de CC12 a CC8 (ignorando a CC11) os valores médios de diacetilo vão aumentando gradualmente. Desta forma, parece haver uma correlação entre a distância que o mosto inoculado percorre e a quantidade de diacetilo no fermentador ao 7º dia, sendo que quanto maior a distância percorrida,

Tabela 5.2– Valores médios de diacetilo ao 7º dia para as fermentações de Sagres Branca realizadas em cada um dos fermentadores (cónicas) e respetivos desvios padrão, desvio em percentagem e número de fermentações (n) realizadas

Cónica	Média	Desvio Padrão	Desvio (%)	n
CC1	428,1	116,1	27,1	15
CC2	586,9	194,6	33,2	16
CC3	677,5	112,5	16,6	17
CC4	568,3	251,2	44,2	15
CC5	427,7	186,7	43,7	16
CC6	556,7	162,7	29,2	19
CC7	712,5	168,2	23,6	12
CC8	604,9	249,0	41,2	17
CC9	530,3	165,2	31,2	18
CC10	502,6	122,5	24,4	13
CC11	592,7	179,7	30,3	9
CC12	410,1	132,1	32,2	12

maior o valor de diacetilo. Isto pode dever-se a um maior *stress* fisiológico que é aplicado à levedura, que pode ter influência na sua floculação e capacidade para transportar e reduzir o diacetilo do meio (Boulton & Quain, 2001).

A Figura 5.12 relacionou as concentrações de diacetilo ao 7º dia de cerveja Sagres Preta com os respetivos fermentadores onde se realizaram as fermentações. As médias e desvios padrão do diacetilo ao 7º dia para cada um dos fermentadores analisados para este tipo de cerveja encontram-se compilados na Tabela 5.3.

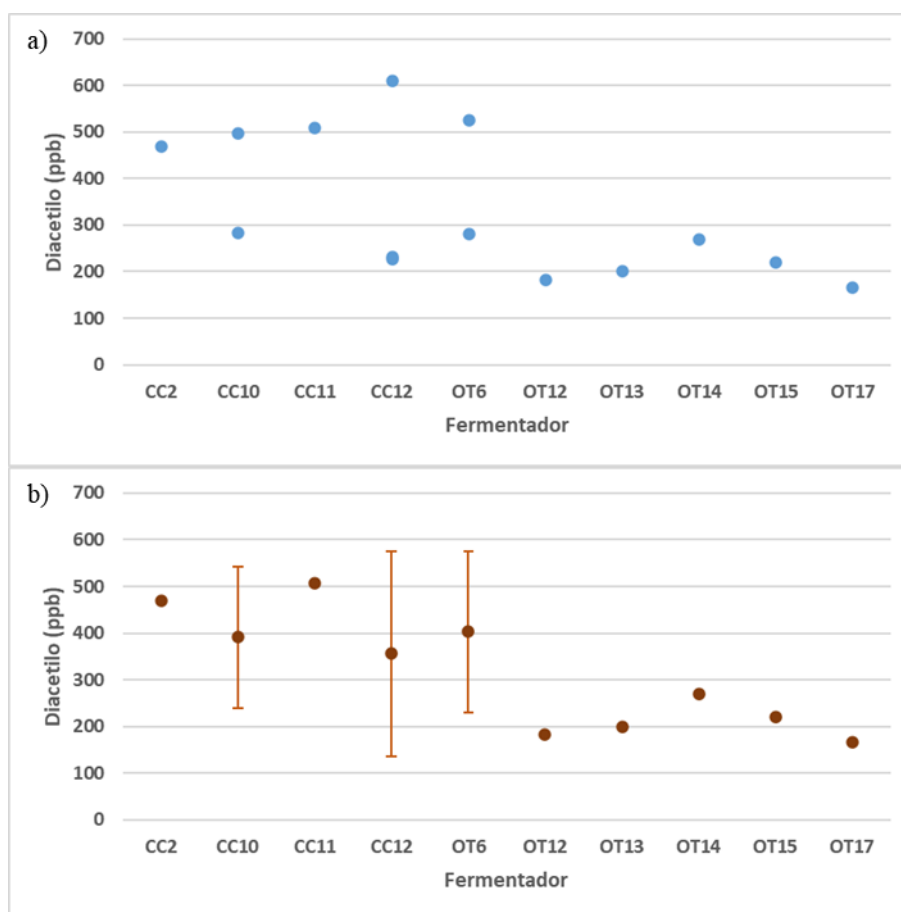


Figura 5.12 - Relação entre a concentração de diacetilo ao 7º dia (ppb) e o fermentador onde foi realizada a fermentação para as várias fermentações de Sagres Preta realizadas em 2019: **a)** Valores absolutos de diacetilo; **b)** Valores médios de diacetilo e respetivos desvios padrão

Como a produção de Sagres Preta é menor e mais esporádica, os dados disponíveis para o estudo da influência do fermentador na concentração do diacetilo não permitem conclusões tão importantes quanto as da Sagres Branca. Os dados da Figura 5.12, assim como as médias apresentadas na Tabela 5.3, não permitem que se possa afirmar que a distância do circuito até ao fermentador tenha influência na concentração de diacetilo ao 7º dia, pois, nas cilindrocónicas (CC), não se observa uma aumento do diacetilo no sentido CC12 para CC10. Desta forma, a principal comparação que se pode fazer é entre a concentração de diacetilo nos fermentadores cilindrocónicos em comparação com os fermentadores *Asahi* (OT). Com exceção de uma fermentação na OT6, as fermentações realizadas em fermentadores *Asahi* permitiram obter

Tabela 5.3 - Valores médios de diacetilo ao 7º dia para as fermentações de Sagres Preta realizadas em cada um dos fermentadores e respetivos desvios padrão, desvio em percentagem e número de fermentações (n) realizadas

Fermentador	Média	Desvio Padrão	Desvio (%)	n
CC2	470,0	-	-	1
CC10	391,0	151,3	38,7	2
CC11	508,0	-	-	1
CC12	356,0	219,1	61,5	2
OT6	403,0	172,5	42,8	2
OT12	183,0	-	-	1
OT13	200,0	-	-	1
OT14	269,0	-	-	1
OT15	220,0	-	-	1
OT17	166,0	-	-	1

menores concentrações de diacetilo em comparação com as realizadas em fermentadores cilíndricos. Isto vai de encontro com o observado pelos operários, em que, por norma, as concentrações de diacetilo são mais baixas em OTs em comparação com as CCs, sendo possível de terminar as fermentações mais cedo nas primeiras. Nas cilíndricas ocorre maior agitação e um maior crescimento da levedura, podendo ter o efeito de aumentar a concentração de diacetilo, uma vez que o passo limitante para a redução do teor deste composto na cerveja tem sido reportado como sendo a reação espontânea de descarboxilação do α -acetolactato a diacetilo (Guido *et al.*, 2004). Por outro lado, nos fermentadores *Asahi* a levedura que se deposita na base do fermentador só é retirada no fim da fermentação e a sua área de contacto com o mosto é maior, o que poderá favorecer uma remoção mais rápida do diacetilo neste tipo de fermentador.

5.1.10.2 Taxa de multiplicação da levedura por fermentador

Apesar de em 5.1.8 não se ter encontrado uma correlação significativa entre a taxa de multiplicação da levedura e a concentração de diacetilo ao 7º dia nos fermentadores, não deixa de ser interessante do ponto de vista industrial o estudo da taxa média de multiplicação em cada um dos fermentadores. Desta forma, é possível identificar se algum dos fermentadores apresenta um desvio muito grande deste parâmetro em relação aos outros fermentadores, identificando possíveis defeitos no fermentador. Permite também pesquisar se a distância entre o local da inoculação e fermentador tem implicação na multiplicação da levedura, tal como foi reportado para os valores de diacetilo em 5.1.10.1.

Na Figura 5.13 podem-se observar as taxas de multiplicação da levedura para cada um dos fermentadores em estudo. Na Tabela 5.4 encontram-se apresentados os valores médios da taxa de multiplicação da levedura para cada um dos fermentadores em estudo, tal como o desvio padrão, o desvio padrão em percentagem e o número de fermentações realizadas em cada um destes fermentadores, para os quais existem dados.

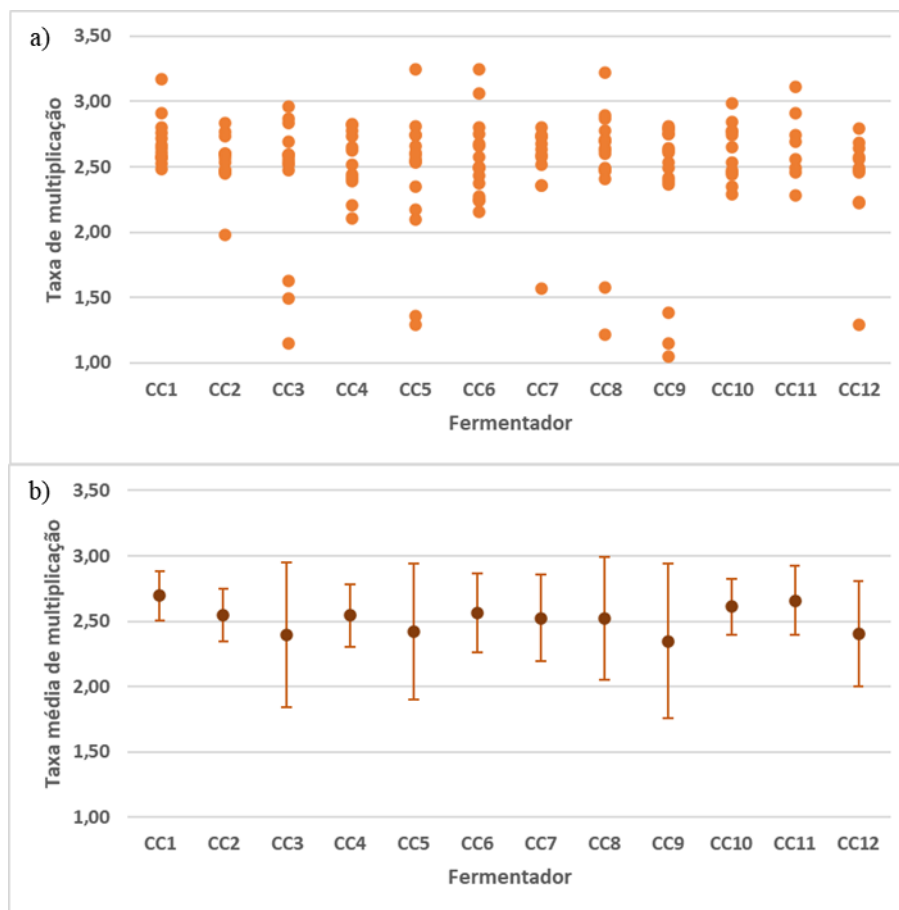


Figura 5.13 - Relação entre a taxa de multiplicação da levedura e o fermentador onde foi realizada a fermentação para as várias fermentações de Sagres Branca realizadas em 2019: **a)** Valores absolutos da taxa de multiplicação da levedura; **b)** Valores médios da taxa de multiplicação da levedura e respetivos desvios padrão

Tabela 5.4 - Valores médios da taxa de multiplicação da levedura para as fermentações de Sagres Branca realizadas em cada um dos fermentadores e respetivos desvios padrão, desvio em percentagem e número de fermentações (n) realizadas

Cônica	Média	Desvio Padrão	Desvio (%)	n
CC1	2,69	0,19	6,93	13
CC2	2,55	0,20	7,89	14
CC3	2,39	0,55	23,12	14
CC4	2,54	0,24	9,36	12
CC5	2,42	0,52	21,47	15
CC6	2,56	0,30	11,67	16
CC7	2,52	0,33	13,21	12
CC8	2,52	0,47	18,74	17
CC9	2,35	0,59	25,29	16
CC10	2,61	0,22	8,26	12
CC11	2,66	0,27	9,98	8
CC12	2,40	0,41	16,90	11

Na Figura 5.13-a) foi possível observar que a maioria das fermentações em todos os fermentadores possui uma taxa de multiplicação dentro do intervalo de 2,0 a 3,0. No entanto existem algumas exceções. Seis das fermentações (em 5 fermentadores diferentes) possuíram uma

taxa de multiplicação superior a 3,0. Por outro lado, 12 fermentações (em 6 fermentadores diferentes) possuíram uma taxa de multiplicação inferior a 1,7; estas fermentações podem ter origem em leveduras de geração 0, que se multiplicam menos, tal como explicado em 5.1.8.

Na Figura 5.13-b), fundamentada com os dados da Tabela 5.4, pôde-se observar que em todos os fermentadores a taxa média de multiplicação da levedura foi muito próxima (entre 2,35 na CC9 e 2,69 na CC1), o que permite afirmar que não há desvios significativos na taxa de multiplicação entre os fermentadores. Os desvios padrão foram superiores nos fermentadores onde foram realizadas fermentações com leveduras de geração 0, tal como expectável, não se devendo estes a uma grande dispersão dos valores, mas sim a esses inóculos. A CC1 destaca-se pelo seu baixo desvio padrão e alta média; este dado não deixa de ser interessante quando se compara este fermentador com os dados da Figura 5.11-b), uma vez que os menores valores de diacetilo e desvio padrão foram identificados neste mesmo fermentador, levantando de novo a dúvida se de facto a taxa de multiplicação não tem implicação no diacetilo. Se esta afirmação fosse verdadeira, uma maior taxa de multiplicação daria origem a uma menor concentração de diacetilo ao 7º dia.

5.1.11 Relação entre o diacetilo e a geração da levedura

Tal como explicado em 3.3.4.5, é de esperar que o diacetilo seja fortemente influenciado pela idade da levedura e pela sua geração. Desta forma, procurou-se estudar as variações no diacetilo em cada geração, assim como o tempo de fermentação, a viabilidade inicial da levedura e a capacidade de redução do diacetilo.

5.1.11.1 Diacetilo por geração

Na Figura 5.14 encontram-se representados os valores de diacetilo ao 7º e 8º dias de Sagres Branca para cada uma das gerações. Na Tabela 5.5 apresentam-se as médias, desvios padrão, desvio em percentagem e número de fermentações realizadas que continham uma levedura de determinada geração.

Na Figura 5.14-a) encontram-se representadas as concentrações de diacetilo ao 7º dia de fermentações de Sagres Branca realizadas com leveduras de várias gerações. A cada ponto corresponde uma fermentação realizada com uma levedura da geração em questão. É possível observar que há fermentações de determinadas gerações de leveduras cujas concentrações se encontraram numa grande amplitude de valores, como as gerações 3, 4 e 5.

Na Figura 5.14-b) estão representados os valores médios de diacetilo ao 7º dia de fermentações de Sagres Branca para cada geração, e os desvios padrão associados. É possível fazer algumas observações quanto a estes dados. Em primeiro lugar, é de salientar que as gerações 0, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 apresentaram valores médios de diacetilo bastante próximos (514,2 a 577,5 ppb). Em segundo lugar, é de destacar que a média da geração 0 é semelhante à das outras gerações. Por fim, a geração 1 e a 7 apresentaram concentrações média superiores às restantes gerações, sendo maior na geração 1. A Tabela 5.5 revelou que os maiores desvios padrão em

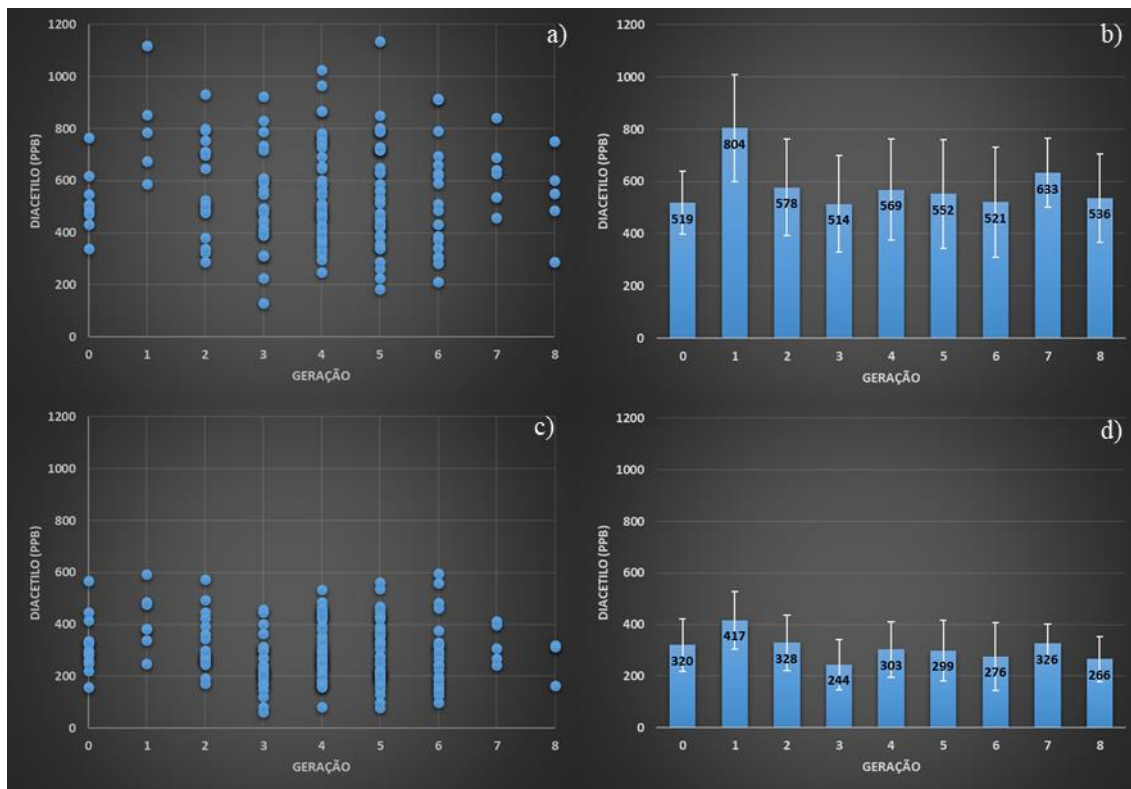


Figura 5.14 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e a geração da levedura inoculada para as várias fermentações de Sagres Branca realizadas em 2019: **a)** valores absolutos ao 7º dia; **b)** valores médios e respetivo desvio padrão ao 7º dia; **c)** valores absolutos ao 8º dia; **d)** valores médios e respetivo desvio padrão ao 8º dia

Tabela 5.5 - Valores médios da concentração de diacetilo (ppb), ao 7º e 8º dias, para cada geração de levedura utilizada e respetivos desvios padrão, desvio em percentagem e número de fermentações (n) realizadas de Sagres Branca

Geração	Diacetilo ao 7º dia				Diacetilo ao 8º dia			
	n	Média	Desvio Padrão	Desvio (%)	n	Média	Desvio Padrão	Desvio (%)
0	9	518,6	120,1	23,2	14	319,9	102,2	32,0
1	5	804,2	203,9	25,4	7	416,7	112,1	26,9
2	18	577,5	185,6	32,1	18	328,5	107,8	32,8
3	26	514,2	184,7	35,9	26	243,8	96,2	39,4
4	39	568,6	193,4	34,0	43	302,8	107,0	35,3
5	36	552,1	207,2	37,5	38	298,6	117,4	39,3
6	19	520,8	209,9	40,3	24	275,9	131,3	47,6
7	6	633,0	131,6	20,8	6	317,8	71,2	22,4
8	5	536,2	169,4	31,6	3	233,3	97,5	41,8
Soma	163				179			

percentagem foram observados para as gerações 6 e 5, enquanto que os menores foram observados nas 0 e 7.

A Figura 5.14-c) representa as concentrações de diacetilo ao 8º dia das fermentações de Sagres Branca realizadas com leveduras das várias gerações em estudo. Já na Figura 5.14-d) estão representados os valores médios de diacetilo ao 8º dia de fermentações de Sagres Branca para cada geração, e os desvios padrão associados. Cruzando estes dados com a Tabela 5.5, foi possível fazer algumas observações. A concentração média de diacetilo ao 8º dia foi próxima entre as gerações 0, 2, 4, 5 e 6 (de 275,9 a 319,9 ppb); por outro lado, as gerações 3 (243,8 ppb) e 8 (233,3 ppb) apresentaram uma média mais baixa, mas tiveram um aumento do desvio padrão associado em percentagem em comparação com os valores médios de diacetilo ao 7º dia, o que sugere uma maior dispersão dos dados. Tal como nos dados para o diacetilo ao 7º dia, a geração 1 foi a que apresentou maior média. Os desvios padrão absolutos diminuíram do 7º para o 8º dia; no entanto, o desvio padrão em percentagem é superior nos dados do 8º dia referentes às gerações 0 e 6 (para além das 3 e 8 já referidas), o que revela um aumento da dispersão de dados em algumas gerações à medida que os dias vão passando.

O facto de muitas das gerações apresentarem valores médios de diacetilo muito próximos é muito importante. Os dados da literatura davam conta que, quanto mais antiga e quantas mais divisões a levedura fizer, maior será a concentração de diacetilo formado por esta devido ao *stress* fisiológico a que é sujeita e às alterações na sua membrana que levam a uma maior floculação (Carpentier *et al.*, 1991; Verstrepen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2019). Os dados obtidos vêm refutar este dogma, pois de facto, não existiram diferenças relevantes entre as concentrações médias de diacetilo na maioria das gerações, assim como não se observou um aumento destas médias com o aumento da geração, não havendo uma aparente relação entre estas variáveis em Sagres Branca. Algumas sugestões podem ser dadas para que isto ocorra. Por um lado, em cada geração formam-se leveduras novas, pelo que a percentagem de levedura mãe vai sendo cada vez menor e conseqüentemente terá menos influência na produção de diacetilo. Por outro lado, é quantificada a viabilidade da levedura recolhida antes da sua inoculação no fermentador, só sendo selecionados lotes de leveduras com elevada viabilidade, sendo de esperar que apresentem baixas concentrações médias de diacetilo ao 7º dia. É possível que também haja uma alteração no pico do diacetilo que não seja observável ao fim de 7 dias, pelo que seria necessário o estudo da curva completa do diacetilo.

Outro dado relevante é o facto da concentração média de diacetilo na geração 0 ser semelhante ao das outras gerações. Em 5.1.8 já se tinha frisado que as leveduras da geração 0 dão origem a taxas de multiplicação inferiores, ou seja, que não se multiplicam tanto na sua primeira fermentação. Este dado comprova que, apesar de não haver uma grande multiplicação, as leveduras de geração 0 dão origem a produtos com teores de diacetilo semelhantes aos de outras gerações, não tendo a baixa taxa de multiplicação efeito no diacetilo e no produto.

Na Figura 5.15 encontram-se representados os valores de diacetilo ao 7º e 8º dias de Sagres Preta para cada uma das gerações.

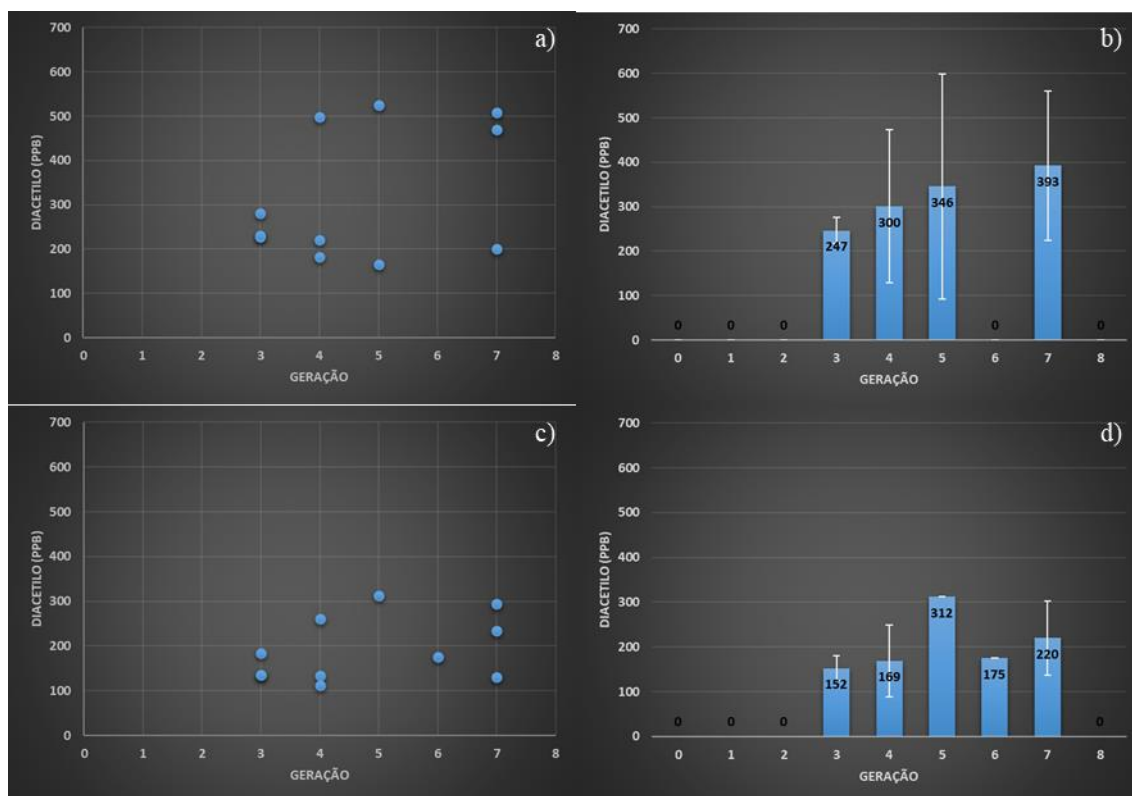


Figura 5.15 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e a geração da levedura inoculada para as várias fermentações de Sagres Preta realizadas em 2019: **a)** valores absolutos ao 7º dia; **b)** valores médios e respetivo desvio padrão ao 7º dia; **c)** valores absolutos ao 8º dia; **d)** valores médios e respetivo desvio padrão ao 8º dia

A análise da Figura 5.15 é menos clara que a da Figura 5.14 devido ao baixo número de dados disponíveis. Enquanto de na Sagres Branca não houve diferenças relevantes entre os valores médios de diacetilo das várias gerações, aparentemente para Sagres Preta isto não é o caso. Na Figura 5.15-b) observou-se um ligeiro aumento da concentração de diacetilo ao 7º dia com o aumento da geração; no entanto, os altos desvios padrão associados não permitem que se possa afirmar com segurança que esta relação exista de facto. Tal confirmou-se na Figura 5.15-d) em que as concentrações médias de diacetilo ao 8º dia não apresentaram qualquer relação lógica com a geração. Desta forma, não se pode afirmar que haja relação entre a concentração de diacetilo e a geração da levedura, em Sagres Preta.

5.1.11.2 Viabilidade por geração

Apesar da idade da levedura não ter uma aparente relação com a concentração de diacetilo formada, é importante que se observe se esta idade não tem influência noutros parâmetros da fermentação que possam ter efeito na qualidade do produto. Desta forma, na Figura 5.16 encontram-se representadas as viabilidades médias das leveduras inoculadas e desvio padrão para cada uma das gerações em estudo.

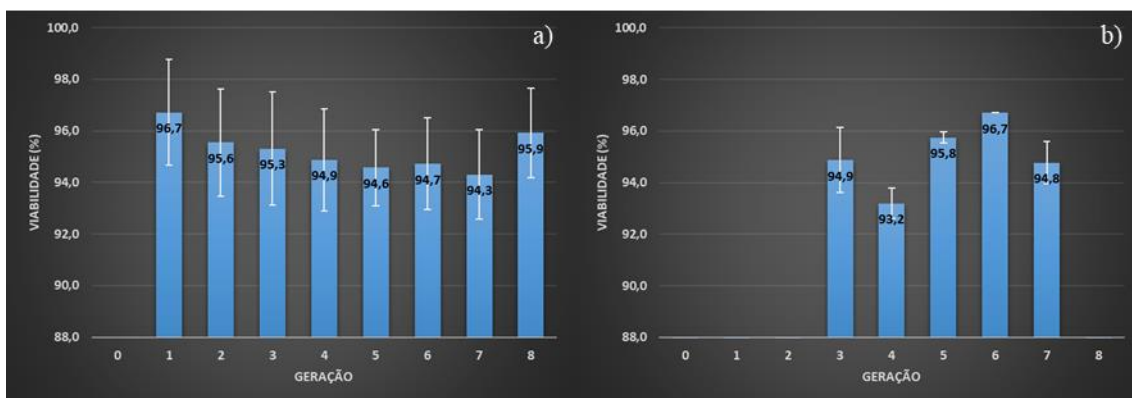


Figura 5.16 - Relação entre a viabilidade média (e desvios padrão) da levedura inoculada (%) e a geração da levedura inoculada para as várias fermentações realizadas em 2019 em: **a)** Sagres Branca; **b)** Sagres Preta

Na Figura 5.16-a) que representa a viabilidade média das várias fermentações de Sagres Branca para cada geração, a viabilidade média da levedura vai diminuindo com a geração entre a geração 1 (96,7%) e a geração 5 (94,6%), havendo depois uma subida na viabilidade média na geração 8. No entanto, quando se tem em conta o desvio padrão, torna-se menos clara a existência de um padrão de decréscimo ao longo das gerações. O maior desvio padrão é apresentado na geração 3 (2,19%) e o menor na geração 5 (1,47%). Já na Figura 5.16-b), que representa estes mesmos parâmetros, mas para cerveja Sagres Preta, o baixo número de dados não permite obter conclusões relevantes quanto à viabilidade em cada geração. A geração 4 apresentou a média de viabilidade mais baixa (93,2%) e a 6 a viabilidade mais alta (96,7%). No entanto, como a levedura utilizada em Sagres Preta é a mesma que a utilizada em Sagres Branca, sendo inclusive proveniente de fermentadores de Sagres Branca, os dados podem ser juntados aos da Figura 5.16-a). As viabilidades médias das leveduras utilizadas em Sagres Preta situaram-se entre 93,2% e 96,7%, enquanto que as viabilidades médias das leveduras inoculadas em Sagres Branca se situaram entre 94,3% e 96,7%.

A diminuição da viabilidade da levedura entre a geração 1 e a 5 vai de encontro com a literatura. O investigador Wang e os seus colaboradores, em 2019, reportaram que, com a sucessiva reinoculação da levedura e multiplicação em fermentações em série, vão surgindo alterações fisiológicas na levedura, como o enrugamento da superfície da célula ou o aumento da formação de espécies reativas de oxigénio, que levam a uma queda na viabilidade da levedura. No entanto, o aumento na viabilidade média que se observa na geração 8 vai contra este pressuposto. Uma possibilidade para que isto aconteça prende-se com o facto da viabilidade da levedura ser analisada antes da inoculação; desta forma as leveduras com viabilidades mais baixas são rejeitadas e só são inoculadas as mais saudáveis.

5.1.11.3 Tempo de fermentação por geração

O estudo do tempo de fermentação em cada uma das gerações de levedura também é interessante para observar se a idade da levedura tem influência no tempo total que a fermentação demora desde a inoculação da levedura até ao momento em que se atingem os 120 ppb de diacetilo. A Figura 5.17 relaciona os tempos de fermentação médios com a geração da levedura utilizada para essa mesma fermentação.

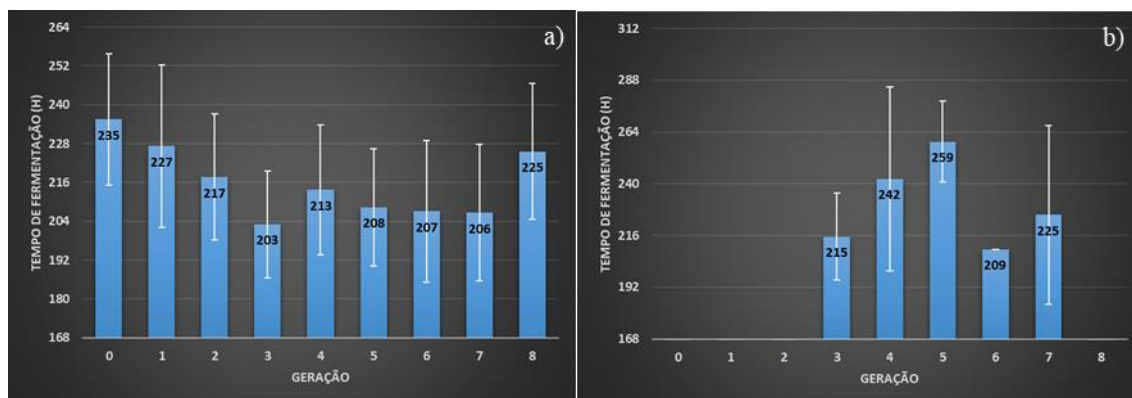


Figura 5.17 - Relação entre o tempo de fermentação médio (e desvios padrão) total (h) e a geração da levedura inoculada para as várias fermentações realizadas em 2019 em: **a)** Sagres Branca; **b)** Sagres Preta

Na Figura 5.17-a) estão representados os tempos de fermentação médios das várias fermentações de Sagres Branca para cada geração de levedura em estudo. Apesar dos grandes desvios padrão, o tempo médio de fermentação vai diminuindo da geração 0 (235 h) até à geração 3 (203 h); nas gerações 5, 6 e 7 o tempo médio de fermentação é muito próximo do da geração 3, enquanto que na geração 8 (225 h) volta a subir. Na Figura 5.17-b), que representa os mesmos parâmetros em Sagres Preta, observa-se um aumento do tempo médio de fermentação da geração 3 (215 h) à 5 (259 h), havendo uma descida para a geração 6 e 7; é de notar os grandes desvios padrão que tornam menos correta a comparação.

Uma observação relevante é o facto de haver uma redução no tempo médio de fermentação da geração 0 até à geração 3, mantendo-se perto dos tempos de fermentação da geração 3 até à geração 7. Isto vai contra o referido na literatura. Tal como referido anteriormente, com a multiplicação e envelhecimento da levedura a superfície celular vai enrugando e a célula vai produzindo mais espécies reativas de oxigénio, o que interfere nos processos fisiológicos da levedura e tendo influência no *uptake* do diacetilo pela célula; as células mais envelhecidas também têm dificuldade em reter os compostos no meio intracelular, pelo que excretam maior quantidade de diacetilo (Wang *et al.*, 2019). Por outro lado, com o aumento da geração, a levedura tenderia a ganhar floculência e a sedimentar mais rápido, estando menos tempo em contacto com o mosto para a redução do diacetilo (Verstrepen *et al.*, 2003). Aparentemente, após um maior número de ciclos de fermentação a levedura torna-se mais eficiente, ou por produzir diacetilo em menor quantidade, ou por o conseguir reduzir mais rapidamente, talvez pela célula se encontrar mais adaptada ao meio. Investigadores como Guido e os seus colaboradores (2004) não

encontraram correlação entre a condição fisiológica da levedura e a sua capacidade de remoção do diacetilo, sugerindo que o desaparecimento do diacetilo depende apenas da velocidade de descarboxilação do α -acetolactato.

É também de notar que comparando a Sagres Branca com a Sagres Preta, os tempos de fermentação médios foram superiores na Sagres Preta quando comparadas as mesmas gerações.

5.1.11.4 Percentagem de redução do diacetilo por geração

Para analisar se a geração da levedura tem influência na velocidade de remoção do diacetilo pela mesma, foi interessante explorar a percentagem de redução do diacetilo do 7º para o 8º dia em cada uma das gerações estudadas. A Figura 5.18 apresenta estes dados.

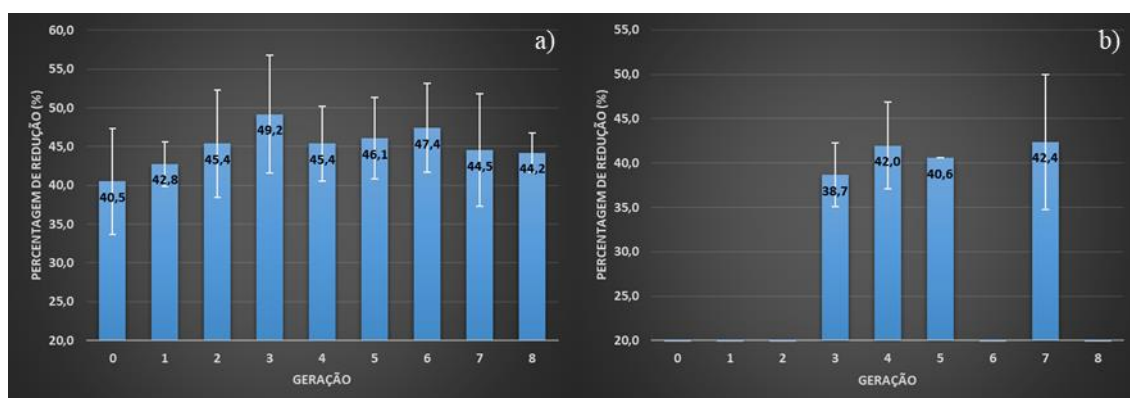


Figura 5.18 - Relação entre a percentagem média (e desvios padrão) de redução do diacetilo entre o 7º e 8º dias (%) e a geração da levedura inoculada para as várias fermentações realizadas em 2019 em: **a)** Sagres Branca; **b)** Sagres Preta

Na Figura 5.18-a), que apresenta as percentagens médias de redução do diacetilo entre o 7º e 8º dias na Sagres Branca, todas as percentagens médias se situaram entre os 40,5% e os 49,2%, o que sugere uma grande redução do diacetilo entre estes dois dias. A redução vai aumentando entre a geração 0 (40,5%) e a 3 (49,2%), mantendo-se depois ligeiramente abaixo deste valor, mas estável nas gerações 4 a 8. Os maiores desvios padrão foram observados na geração 3 (7,6%) e na 7 (7,3%). Na Figura 5.18-b) os mesmos parâmetros foram analisados para a Sagres Preta; as percentagens médias de redução mantiveram-se entre os 38,7% e 42,4%, não apresentando um comportamento de aumento ou redução.

Mais uma vez, a maioria dos dados da literatura sugeriam que, com o aumento da geração da levedura, a excreção do diacetilo pela levedura fosse aumentando, assim como a floculação da célula, o que teria influência na redução do diacetilo (Boulton & Quain, 2001; Verstrepn *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2019). Isto não se observa, visto que entre a geração 0 e 3 há uma tendência para o aumento da redução do diacetilo e nas gerações seguintes não se observa uma diminuição significativa com o aumento da geração. Isto pode-se dever ao facto de serem sempre seleccionadas as leveduras com maior viabilidade para ser inoculadas nos fermentadores, estando estas com excelente capacidade de redução do diacetilo na cerveja. Os dados vão assim de encontro com os

reportados por Guido e os seus colaboradores (2004), que não encontraram correlação entre o estado fisiológico da levedura e a sua capacidade de remoção do diacetilo.

Outro dado a salientar é o facto de a redução do diacetilo em Sagres Branca ser maior que em Sagres Preta dentro da mesma geração. Isto sugere que há de facto uma interferência neste tipo de cerveja que diminui a capacidade de redução do diacetilo, que podem ser as melanoidinas presentes nos maltes torrados e tóxicas para as células (Coghe *et al.*, 2005).

5.1.12 Estimativa das percentagens médias de redução do diacetilo

As observações empíricas demonstraram que, ao longo da fermentação, a velocidade de redução do diacetilo não é constante, mas vai sendo cada vez mais lenta, o que prolonga o tempo necessário para que se atinjam as concentrações máximas de diacetilo pretendidas. O desconhecimento do comportamento da redução do diacetilo ao longo do tempo é um entrave à previsão de uma curva do diacetilo. Com base nos valores de diacetilo medidos diariamente, procurou-se determinar as percentagens de redução de diacetilo a cada 24 h, estudando-se se estas percentagens seguem um comportamento previsível. Os dados que relacionam as percentagens de redução do diacetilo com o tempo encontram-se na Tabela 5.6, permitindo construir os gráficos representados na Figura 5.19.

Tabela 5.6 – Percentagens médias, desvios padrão e desvios em percentagem de redução do diacetilo entre cada dia para as cervejas Sagres Branca e Sagres Preta

Dia	Sagres "Branca"			Sagres Preta		
	Percentagem média de redução	Desvio Padrão	Desvio (%)	Percentagem média de redução	Desvio Padrão	Desvio (%)
7 para 8	46,34	6,10	13,16	40,20	4,77	11,86
8 para 9	42,79	7,52	17,57	29,06	6,95	23,93
9 para 10	38,66	6,49	16,78	28,12	7,81	27,77
10 para 11	36,70	13,84	37,71	19,24*		
11 para 12	30,07	0,43	1,43	7,43	7,17	96,39
12 para 13				10,46	5,99	57,22

*percentagem média de redução calculada com base na equação da reta apresentada na Figura 5.19-b)

A análise dos dados da Tabela 5.6 e da Figura 5.19 permitiu retirar várias conclusões. Quanto à Sagres Branca, a percentagem de redução do diacetilo é máxima entre o 7º e 8º dias, atingindo uma redução média de diacetilo e um desvio padrão associado, de $46,34 \pm 6,10\%$. A percentagem de redução é mínima entre o 11º e 12º dias, de apenas $30,07 \pm 0,43\%$.

Os dados da Figura 5.19-a) demonstraram que a percentagem de redução do diacetilo vai sendo cada vez mais baixa com o tempo, seguindo um comportamento linear. Obteve-se uma regressão linear traduzida na equação $y = -3,8631x + 50,5$, em que y é a percentagem de redução

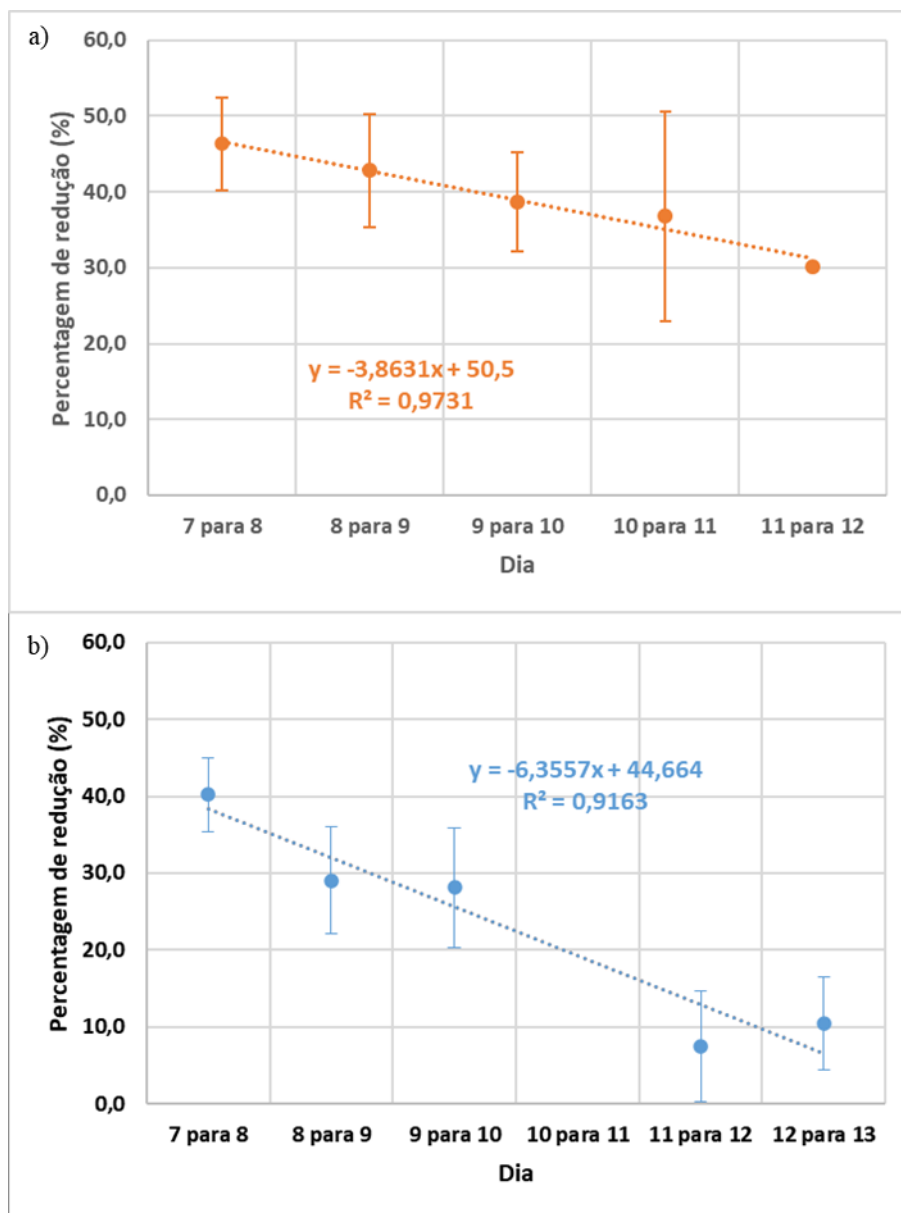


Figura 5.19 – Relação entre a percentagem média (e desvio padrão) de redução do diacetilo (%) em cada dia para as várias fermentações realizadas em 2019 de: **a)** Sagres “Branca; **b)** Sagres Preta

de diacetilo e x refere-se à transição de dia (considera-se como 1 a transição entre o 7º e 8º dia). O coeficiente de determinação foi de 0,9731, um valor excelente que comprovou que existe uma correlação entre o tempo e a percentagem de redução do diacetilo, assim como que a equação apresentada traduz corretamente esta correlação.

Quanto à Sagres Preta, observou-se que a percentagem de redução do diacetilo também foi máxima entre o 7º e 8º dias, com uma redução média de $40,20 \pm 4,77\%$. A percentagem de redução foi sendo mais baixa com o tempo. No entanto, são de salientar dois aspetos: a percentagem de redução foi mais alta entre os 12º e 13º dias ($10,46 \pm 5,99\%$) em comparação com entre os 11º e 12º dias ($7,43 \pm 7,17\%$), estando estes últimos associados a um desvio em percentagem elevadíssimo, provavelmente devido ao baixo número de resultados que não

permitiram determinar tão corretamente este parâmetro; não existiram dados para a percentagem de redução entre os 10º e 11º dias, tendo sido calculada uma hipotética percentagem de redução.

Na Figura 5.19-b) demonstrou-se que, tal como na Sagres Branca, as percentagens de redução do diacetilo vão sendo cada vez mais baixas com o tempo, seguindo um comportamento linear. A regressão linear obtida foi traduzida pela equação $y = -6,3557x + 44,664$ e apresentou um coeficiente de determinação de 0,9163, um valor muito bom que demonstrou que existe uma correlação entre a percentagem de redução do diacetilo com o tempo, sendo esta menor quanto mais tempo decorra, e que a equação apresentada traduz corretamente este comportamento. Desta forma, foi possível utilizar a equação para estimar a percentagem de redução do diacetilo entre os 10º e 11º dias, para os quais não havia dados, que foi projetada como de 19,24%.

Em suma, foi possível afirmar que a percentagem de redução do diacetilo, tanto em Sagres Branca como em Sagres Preta, vai diminuindo ao longo do tempo, sendo que esta diminuição tem um caráter linear, possível de prever, com base nas equações obtidas, nos intervalos analisados. Esta diminuição vai de encontro com os dados da literatura. De facto, a capacidade de remoção do diacetilo do mosto vai sendo cada vez mais baixa ao longo da fermentação e é dependente da própria concentração de diacetilo no meio, sendo sugerido que isto aconteça por alterações no transporte deste composto na membrana celular ou por inibição dos diacetilo redutases com o aumento da percentagem de álcool no mosto (Tolls *et al.*, 1970; Boulton & Box, 2008).

Um aspeto que deve ser realçado é o declive das retas que preveem a diminuição da percentagem de redução do diacetilo. Enquanto que na Sagres Branca o declive é de -3,8631, na Sagres Preta o declive é de -6,3557, o que indica que nesta cerveja preta a levedura vai perdendo mais rapidamente a capacidade de metabolizar o diacetilo do meio, o que leva a maiores tempos de fermentação, tal como observado noutros pontos deste trabalho. Esta diminuição mais lenta pode-se dever às melanoidinas presentes no mosto que têm um efeito tóxico na levedura e que, ao longo do tempo, vão interferindo cada vez mais na sua capacidade de metabolizar tal subproduto da fermentação (Coghe *et al.*, 2005).

5.1.12.1 Previsão da curva de diacetilo

Um dos principais objetivos deste trabalho foi o de conseguir encontrar um sistema que permitisse prever o momento em que a concentração de diacetilo atinge os valores máximos admitidos (120 ppb em Sagres Branca e 90 ppb em Sagres Preta). A previsão deste momento permite não só poupar um grande número de amostras a ser analisadas no laboratório, como prever o tempo de utilização de determinado fermentador, dado este de muita importância aquando do desenho do plano semanal de produção. Com base neste tempo, pode-se prever quando o fermentador pode ser reutilizado, quando serão realizadas as CIP, quando será necessária levedura para inoculação, entre outros.

Com base nas médias da concentração de diacetilo das fermentações de Sagres Branca e Sagres Preta ao 7º dia (553,22 ppb e 333,71 ppb, respetivamente), aplicaram-se as percentagens médias de redução do diacetilo. Desta forma, foi possível obter as concentrações de diacetilo esperadas para os 8º, 9º e 10º dias, em cada cerveja. Estes dados encontram-se na Tabela 5.7. Foi assim possível traçar as curvas de redução de diacetilo para a Sagres Branca (Figura 5.20-a)) e Sagres Preta (Figura 5.20-b)), obtendo-se equações de terceiro grau que explicam perfeitamente ($r^2=1$) o comportamento do diacetilo nestas fermentações.

Tabela 5.7 – Valores médios de diacetilo previstos (ppb) em cada dia para Sagres Branca e Sagres Preta

Dia	Valor médio previsto de diacetilo Sagres Branca (ppb)	Valor médio previsto de diacetilo em Sagres Preta (ppb)
7	553,22	333,71
8	296,88	199,56
9	169,85	141,57
10	104,18	101,76

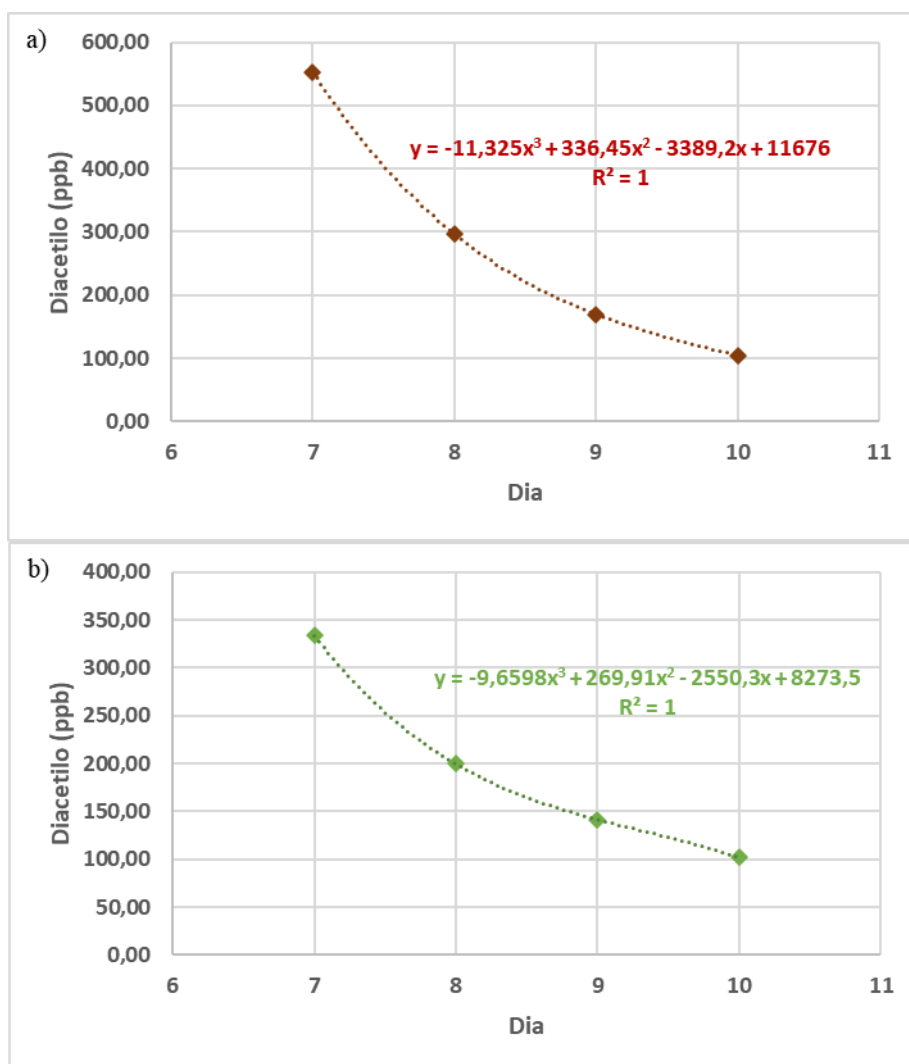


Figura 5.20 – Curvas previstas de redução do diacetilo e respetivas curvas de regressão e coeficientes de determinação com base nos valores médios de diacetilo ao 7º dia das fermentações realizadas em 2019 de: **a)** Sagres Branca; **b)** Sagres Preta

Apesar de se terem obtido equações que explicam o comportamento da concentração do diacetilo, na prática estas não nos são muito úteis. Isto, pois, a concentração de diacetilo ao 7º dia é sempre diferente para cada fermentação, o que daria origem a uma equação diferente em cada caso. Desta forma, continua a ser necessário o desenvolvimento de uma método que permita prever as concentrações de diacetilo e que seja viável de utilizar no dia a dia da empresa.

Algo muito interessante de realizar, do ponto de vista académico, seria a construção de um modelo matemático que permitisse, com base nas condições iniciais dos mosto e da levedura, prever o comportamento da curva do diacetilo, assim como de outros parâmetro, possibilitando a antecipação do momento em que se atinge o limite máximo de diacetilo. Este estudo já foi realizado por outros investigadores. O investigador García e os seus colaboradores (1994), através das equações diferenciais de formação e degradação do diacetilo e observando a influência do pH e da temperatura neste composto, conseguiram criar um modelo, calcular os coeficientes para o diacetilo com base nos parâmetros estudados, validar o modelo e prever, com sucesso, o comportamento do diacetilo numa fermentação industrial. Mais tarde, Krogerus e os seus colaboradores (2015) conseguiram criar outro modelo com base na temperatura, pH, mas também no FAN, e obter as equações diferenciais e coeficientes que lhes permitiram prever o comportamento da formação de etanol, a evolução da massa de levedura, o comportamento do pH e a curva do diacetilo; este modelo foi validado e ajustado com base numa fermentação realizada em laboratório. A complexidade de realizar um modelo matemático tornou inviável a sua elaboração para este estudo. O facto de condições tão semelhantes entre os vários fabricos darem origem a tão grandes variações nos resultados do diacetilo ao 7º dia também sugere que o modelo criado poderia ser inválido na maioria das fermentações, não conseguindo prever o comportamento do diacetilo. Desta forma, optou-se por não o realizar.

A solução encontrada para este problema consistiu no cruzamento da concentração de diacetilo medida ao 7º dia (que, por procedimento padrão, é quantificada em todas as fermentações) com os valores médios de percentagem de redução do diacetilo ao longo do tempo. Um exemplo desta previsão está apresentado na Tabela 5.8 e representado na Figura 5.21, para uma fermentação hipotética cuja concentração de diacetilo ao 7º dia tenha sido de 900 ppb.

Tabela 5.8 – Previsão dos valores de diacetilo (ppb) esperados entre os 8º e 12º dias, para Sagres Branca, com base na concentração de diacetilo ao 7º dia, assim como o dia previsto em que se atinge o limite máximo de diacetilo admitido; exemplo para concentração de 900 ppb ao 7º dia; a **amarelo** encontra-se a caixa na qual deve ser inserida a concentração de diacetilo

	Pertentagem média de redução	Inserir valor aqui (ppb)	Dia em que atingirá o limite (120 ppb)
Valor do diacetilo no 7º dia		900	11º
Valor esperado no 8º dia	46,34	482,98	
Valor esperado no 9º dia	42,79	276,32	
Valor esperado no 10º dia	38,66	169,48	
Valor esperado no 11º dia	36,70	107,29	
Valor esperado no 12º dia	30,07	75,03	

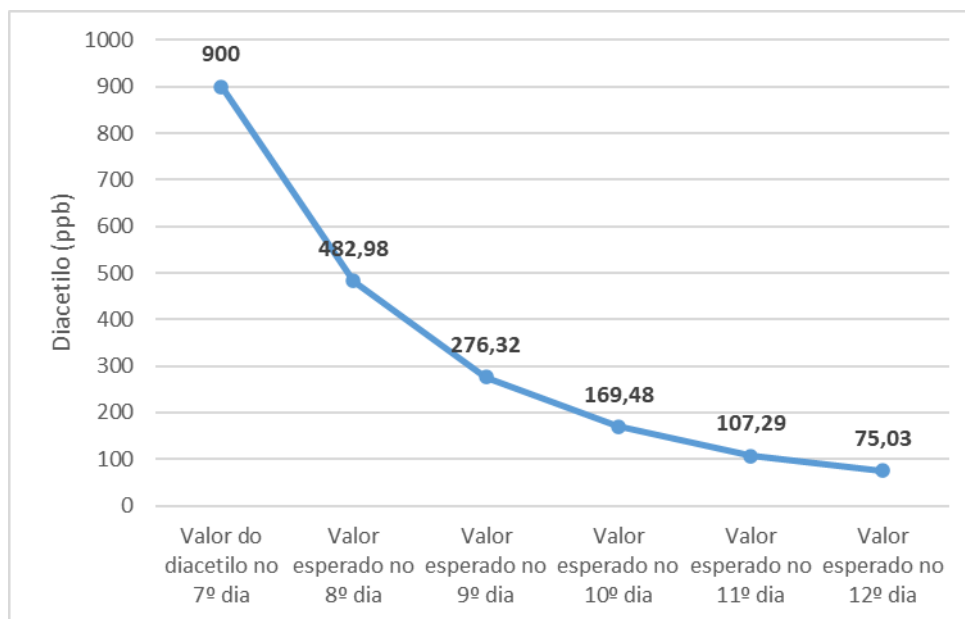


Figura 5.21 - Previsão da curva de diacetilo e dos valores de diacetilo (ppb) esperados entre os 8º e 12º dias, em Sagres Branca, com base na concentração de diacetilo ao 7º dia; exemplo para concentração de 900 ppb ao 7º dia

Os dados da Tabela 5.8 e da Figura 5.21 permitiram prever que, para uma concentração de diacetilo ao 7º dia de 900 ppb, um valor inferior ao limite máximo de diacetilo vai ser obtido no 11º dia, pelo que não será necessário realizar as análises ao diacetilo no 8º, 9º e 10º dias, assim como se pode aplicar o golpe de frio, em princípio neste dia. Substituindo-se o valor de y à equação obtida na Figura 5.4-a), obtém-se que, uma fermentação com este valor de diacetilo ao 7º dia demorará 274 h até ser aplicado o golpe de frio, ou seja, mais de 11 dias, confirmando este resultado.

Um exemplo de uma previsão realizada para Sagres Preta está apresentado na Tabela 5.9 e representado na Figura 5.22, para uma fermentação hipotética cuja concentração de diacetilo ao 7º dia tenha sido de 400 ppb.

Tabela 5.9 - Previsão dos valores de diacetilo (ppb) esperados entre os 8º e 12º dias, para Sagres Preta, com base na concentração de diacetilo ao 7º dia, assim como o dia previsto em que se atinge o limite máximo de diacetilo admitido; exemplo para concentração de 400 ppb ao 7º dia; a **amarelo** encontra-se a caixa na qual deve ser inserida a concentração de diacetilo

	Percentagem média de redução	Inserir valor aqui (ppb)	Dia em que atingirá o limite (90 ppb)
Valor do diacetilo no 7º dia		400	13º
Valor esperado no 8º dia	40,20	239,20	
Valor esperado no 9º dia	29,06	169,69	
Valor esperado no 10º dia	28,12	121,97	
Valor esperado no 11º dia	19,24	98,50	
Valor esperado no 12º dia	7,43	91,18	
Valor esperado no 13º dia	10,46	81,64	



Figura 5.22 - Previsão da curva de diacetilo e dos valores de diacetilo (ppb) esperados entre os 8º e 12º dias, em Sagres Preta, com base na concentração de diacetilo ao 7º dia; exemplo para concentração de 400 ppb ao 7º dia

Os dados da Tabela 5.9 e da Figura 5.22 permitiram prever que, para uma concentração de diacetilo ao 7º dia, em Sagres Preta, de 400 ppb, o limite máximo de diacetilo vai ser ultrapassado no 13º dia, pelo que não será necessário realizar as análises ao diacetilo entre o 8º e 12º dias, assim como se pode aplicar o golpe de frio, em princípio neste dia. Substituindo-se o valor de y à equação obtida na Figura 5.4-b), obtém-se que, uma fermentação com este valor de diacetilo ao 7º dia demorará 255 h até ser aplicado o golpe de frio, ou seja, mais de 10 dias. Este resultado não vai de acordo com a curva prevista por uma razão: a regressão linear obtida tem em conta tempos de fermentação incorretos, pois muitas das fermentações de Sagres Preta são terminadas antes de se atingir os 90 ppb, pelo facto de serem muito demoradas. As percentagens médias de redução para este tipo de cerveja também foram calculadas com poucos dados e apresentaram grandes desvios padrão, não sendo esta previsão provavelmente muito realista.

5.1.13 Análise dos parâmetros de fabrico do mosto

Apesar do diacetilo ser formado pela levedura durante a fermentação, a produção deste composto não depende apenas das condições definidas durante a fermentação, tais como as que foram analisadas nos subcapítulos anteriores. A produção do diacetilo é também altamente influenciada pela composição do mosto. Alguns componentes do mosto têm maior influência na produção do diacetilo, sendo que uma ligeira alteração nestes pode dar origem a uma grande alteração no comportamento da curva do diacetilo. Desta forma, procurou-se estudar os dados dos parâmetros de fabrico de mosto, de forma a detetar-se eventuais anomalias que explicassem os problemas dos altos valores de diacetilo nas fermentações e produto final.

O processo de fabricação do mosto possui um plano de amostragem que permite controlar certos parâmetros, assegurar a qualidade do mosto e monitorizar a eficiência das operações unitárias que decorrem. Com base nas análises realizadas pelo laboratório nos meses anteriores ao início deste estudo, foi possível encontrar parâmetros que possuíam desvios em relação aos valores ideais e identificá-los como possíveis causas para os altos valores de diacetilo. Os valores obtidos para estes parâmetros estão apresentados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 – Valores médios de extrato (°P), pH, atenuação limite aparente (%) e FAN (mg/L) e respetivos limites inferior e superior, desvios padrão, número de fabricos analisados e data de colheita de várias amostras de mosto de Sagres Branca e Sagres Preta. A sombreado **vermelho** encontram-se as médias com valores superiores ou muito próximos dos limites definidos.

		Limite inferior	Limite superior	Média	Desvio padrão	Nº fabricos	Período
Sagres Branca	Extrato (°P)	15,40	16,00	15,63	0,18	71	2/9 a 20/11/19
	pH	5,10	5,50	5,49	0,03	71	2/9 a 20/11/19
	Atenuação limite aparente (%)	82,00	88,00	87,39	0,82	14	2/9 a 18/11/19
	FAN (mg/L)	150,00	190,00	153,40	10,11	12	2/9 a 18/11/19
Sagres Preta	Extrato (°P)	13,00	13,60	13,72	0,25	48	16/1 a 18/12/19
	pH	4,80	5,20	5,22	0,05	48	16/1 a 18/12/19
	Atenuação limite aparente (%)	72,00	78,00	76,44	1,49	15	16/1 a 4/12/19
	FAN (mg/L)						

A Tabela 5.10 compilou os dados obtidos pelo laboratório para o mosto utilizado para o fabrico das cervejas Sagres Branca e Sagres Preta. O plano de amostragem para a Sagres Branca contempla uma análise frequente do extrato primitivo e do pH do mosto fabricado, assim como uma análise mais esporádica da atenuação limite aparente e do FAN deste mesmo mosto. Já a Sagres Preta é analisada frequentemente quanto ao seu extrato e pH; menos frequentemente é estudada a sua atenuação limite aparente e não é de todo analisado o seu FAN.

O mosto da Sagres Branca, de acordo com as especificações da empresa, deve apresentar um extrato primitivo compreendido entre 15,40° P e 16,00° P. Nos 71 fabricos analisados entre as datas de 2 de setembro e 20 de novembro de 2019, a média e o desvio padrão associado situou-se nos 15,63±0,18° P, o que demonstra que o extrato primitivo se encontrava dentro dos parâmetros de qualidade preestabelecidos e não representará uma potencial causa para o problema.

Já quanto ao pH da Sagres Branca, foram também analisados 71 fabricos entre 2 de setembro e 20 de novembro de 2019, sendo que a média e o desvio padrão associado se situou nos 5,49±0,03. Tendo em conta que o pH do mosto se deve situar entre 5,10 e 5,50, a média do pH encontra-se muito perto do limite superior, ultrapassando-o quando se tem em conta o desvio padrão. De facto, vários dos fabricos apresentaram um pH superior a 5,50 e a grande maioria apresentou um pH muito próximo deste valor, o que pode representar um problema. Ao analisarmos a literatura, podemos perceber que um maior pH do mosto tem várias consequências negativas que podem levar a uma maior presença de diacetilo no produto final. Em primeiro lugar, o pH tem efeitos na produção de diacetilo. Sabe-se que pH's mais baixos levam a uma maior

produção de transportadores de valina, o que pode levar a um maior *uptake* de valina pela célula e a uma menor produção de diacetilo (Schoondermark-Stolk *et al.*, 2005; Krogerus & Gibson, 2013a); um alto pH leva então a uma redução do *uptake* deste aminoácido e maior formação de diacetilo. Em segundo lugar, o pH tem influência na velocidade da reação espontânea de formação do diacetilo. Um pH mais baixo leva a um aumento da velocidade de descarboxilação do α -acetolactato a diacetilo (Branen & Keenan, 1972; Haukeli & Lie, 1978; Krogerus & Gibson, 2013a; Ferreira & Guido, 2018), o que leva a que este esteja disponível mais rapidamente para ser removido pela levedura; a um pH mais elevado, como é o caso, o α -acetolactato sofre efeitos mesoméricos no seu grupo carboxilato, tornando-se mais estável e menos sujeito a descarboxilar (Inoue & Yamamoto, 1970; Rondags *et al.*, 1996). Em terceiro lugar, o pH tem influência no diacetilo redutase, enzima que converte o diacetilo a acetoína, que possui uma menor velocidade de reação a um pH mais elevado, levando a uma redução mais lenta deste composto no mosto (Bamforth & Kanauchi, 2004). Desta forma, os altos valores de pH observados podem ser uma causa para o problema em estudo.

A atenuação limite aparente da Sagres Branca, em percentagem, foi calculada para 14 fabricos entre 2 de setembro e 18 de novembro de 2019. A média e o desvio padrão associado situou-se nos $87,39 \pm 0,82\%$, média esta muito próxima do limite superior de $88,00\%$, ultrapassando-a quando se tem em conta o desvio padrão. A atenuação limite aparente de um mosto permite prever a quantidade de substâncias solúveis presentes neste que podem ser fermentadas e utilizadas pela levedura. A atenuação limite aparente é utilizada para comprovar a eficácia da empastagem, permitindo confirmar que, em fermentações que obtiveram baixos rendimentos, o problema surgiu na fermentação e não no fabrico do mosto. Uma alta atenuação limite aparente dá, assim, origem a mostos com alto rendimento e potencial de produção de álcool (Palmer, 2017). Apesar de não ter uma influência direta na concentração de diacetilo, este parâmetro permite comprovar que as fermentações realizadas não apresentaram problemas de fabrico que pudessem ter influências no diacetilo. Uma atenuação limite aparente superior ao limite estabelecido pode sugerir uma atividade enzimática muito alta durante a empastagem.

O FAN da Sagres Branca foi calculado para 12 fabricos entre 2 de setembro e 18 de novembro de 2019. O limite inferior para este parâmetro situa-se nos 150 mg/L e o limite superior situa-se nos 180 mg/L . Acima de concentrações perto do limite superior, a alta concentração de aminoácidos vai ter influências negativas no diacetilo. A grande disponibilidade de aminoácidos do Grupo A, que são mais rapidamente importados pela levedura, leva a que este organismo só comece a realizar o *uptake* dos aminoácidos do Grupo B, onde se encontra a valina, mais tarde; a levedura tem, assim, de produzir a valina durante um grande período, o que leva a um aumento da *pool* de α -acetolactato e conseqüentemente de diacetilo (Boulton & Quain, 2001; Sampaio, 2004; Krogerus *et al.*, 2015). Pode-se observar, no entanto, que a média e o desvio padrão associado do FAN dos fabricos analisados foi de $153,40 \pm 10,11 \text{ mg/L}$, valor este que se situa muito

próximo do limite inferior e que o atinge quando se tem em conta o desvio padrão. Ora, sabe-se que um baixo valor de FAN leva a uma fraca disponibilidade de aminoácidos no meio para serem utilizados pela levedura. Desta forma, é de esperar a ocorrência de dois picos de diacetilo, sendo o segundo muito elevado. Isto acontece, pois inicialmente, a levedura produz valina enquanto os aminoácidos de Grupo A estão a ser transportados para a levedura, o que leva a um aumento do α -acetolactato no meio, formando um pico de diacetilo. A valina passa depois a ser transportada, após o esgotamento dos aminoácidos do Grupo A, durante o qual há uma queda ligeira dos valores de diacetilo. No entanto, a valina esgota-se por não existir em quantidades suficientes para o metabolismo da levedura; a célula tem então de produzir valina, o que leva a um grande aumento do α -acetolactato e conseqüentemente de diacetilo, criando-se um segundo pico, mais elevado e mais tardio (Boulton & Quain, 2001; Petersen *et al.*, 2004). Deste modo, um baixo valor de FAN como o observado pode ser uma potencial causa para o problema.

Quando se analisa o mosto da Sagres Preta, este deve possuir um extrato primitivo entre 13,00° P e 13,60° P. Tendo em conta os 48 fabricos analisados entre 16 de janeiro e 18 de dezembro de 2019, a média e o desvio padrão associado situou-se nos 13,72±0,25° P, acima do limite superior para este parâmetro. O extrato primitivo permite prever a concentração de substâncias solúveis num mosto. Um alto extrato primitivo significa que o processo de empastagem teve um alto rendimento, com grande produção de açúcares e proteínas solúveis. No entanto, fermentações realizadas com extratos primitivos muito elevados podem estar associadas a baixas velocidades de fermentação, alta concentração de açúcares residuais, leveduras com baixo potencial fermentativo, entre outros (Gibson, 2011). Assim, o alto extrato primitivo observado pode ter um potencial efeito negativo na fermentação, influenciando indiretamente a produção de diacetilo.

O pH do mosto da Sagres Preta deve manter-se entre 4,80 e 5,20 de acordo com as especificações da empresa. No entanto, entre 16 de janeiro e 18 de dezembro de 2019, os 48 fabricos analisados possuíram um pH médio e o desvio padrão associado de 5,22±0,05, o que se encontra acima do limite superior definido. O alto pH pode ter grande influência no diacetilo, tal como explicado na análise realizada ao pH do mosto da Sagres Branca. O facto de tanto o mosto da Sagres Branca como o da Sagres Preta possuírem valores de pH superiores ao limite imposto, associado ao facto de ambas apresentarem um histórico recente de altos valores de diacetilo, permite inferir com maior probabilidade que o alto pH pode ser um potencial causador deste problema.

A análise da atenuação limite aparente em 15 fabricos de Sagres Preta entre 16 de janeiro e 4 de dezembro de 2019 permitiu obter a média e o desvio padrão associado de 76,44±1,49%, o que se situa dentro dos limites estabelecidos para este parâmetro (72,00 a 78,00%). É também importante frisar que o FAN não é analisado neste mosto, o que não permite obter conclusões quanto a este parâmetro na Sagres Preta.

5.1.14 Relação entre o diacetilo e o pH em guarda e no produto final

O pH do mosto já tinha sido identificado em 3.3.4.3 como tendo bastante influência na concentração de diacetilo, sendo que pH's mais baixos favoreciam uma formação menor de α -acetolactato, uma descarboxilação mais rápida do α -acetolactato e uma redução mais rápida do diacetilo pela levedura.

Em 5.1.13 identificou-se que o pH do mosto estava muito próximo do limite superior admitido para esse parâmetro, algo que acontecia em todos os fabricos e tanto em Sagres Branca como em Sagres Preta. Desta forma, colocou-se a hipótese deste ser uma das causas do problema em estudo. Assim, procurou-se estudar a distribuição do pH em guarda de Sagres Branca e em produto acabado, tanto para Sagres Branca, como para Sagres Preta. Estes dados encontram-se apresentados na Figura 5.23.

Na Figura 5.23-a) observou-se a distribuição dos valores de pH das várias amostras de guardas de Sagres Branca, analisadas em 2019. A grande maioria das amostras apresentou um pH situado entre 4,14 e 4,54, existindo apenas 3 amostras que apresentaram pH superior, sendo que a mais alta teve um pH inferior a 4,88; apesar destes 3 valores mais altos, a distribuição do pH assemelhou-se a uma distribuição normal. A média e o desvio padrão associado foi de $4,34\pm 0,07$. No período de 3 de outubro a 21 de novembro de 2019 foram analisados os pH's de 50 amostras de guarda (dados não apresentados); a média e o desvio padrão associado foi de $4,38\pm 0,06$. Tendo em conta que foi estabelecido pela empresa que o pH em guarda de deve situar entre 4,00 e 4,40, a média está muito próxima do limite superior, atingindo-o quando se tem em conta o desvio padrão. Comparando a média do pH neste período (4,38) com a média de todo o ano (4,34), observa-se que houve um aumento do pH em guarda mais recentemente. Por outro lado, ambas as médias, tendo em conta o desvio padrão, atingem o limite superior admitido, o que comprova que os altos valores de pH mantêm-se durante e após a fermentação, podendo explicar o problema dos altos valores de diacetilo observados na fermentação e guarda.

Na Figura 5.23-b) observou-se a distribuição do pH em produto acabado de várias amostras de Sagres Branca, analisadas em 2019. A maioria das amostras apresentou um pH entre 4,13 e 4,51, observando-se apenas 3 amostras com pH distante deste intervalo, uma com pH acima de 3,96 e as outras duas abaixo de 4,96. A Portaria 1/96 de 3 de janeiro definiu que o pH da cerveja se deve situar entre 3,5 e 5,0, pelo que todas as amostras analisadas se situaram dentro do intervalo legal para este parâmetro. A média e o desvio padrão associado foi de $4,32\pm 0,07$. Tal como na guarda, foi estabelecido pela empresa que o pH de produto acabado de Sagres Branca se deve situar entre 4,00 e 4,40. A média está assim bastante próxima do limite máximo, sendo que várias das amostras atingiram e ultrapassaram este valor. Isto mais uma vez comprova que os altos valores de pH se mantêm no produto acabado Sagres Branca e que podem explicar os altos valores de diacetilo que este produto tem apresentado.

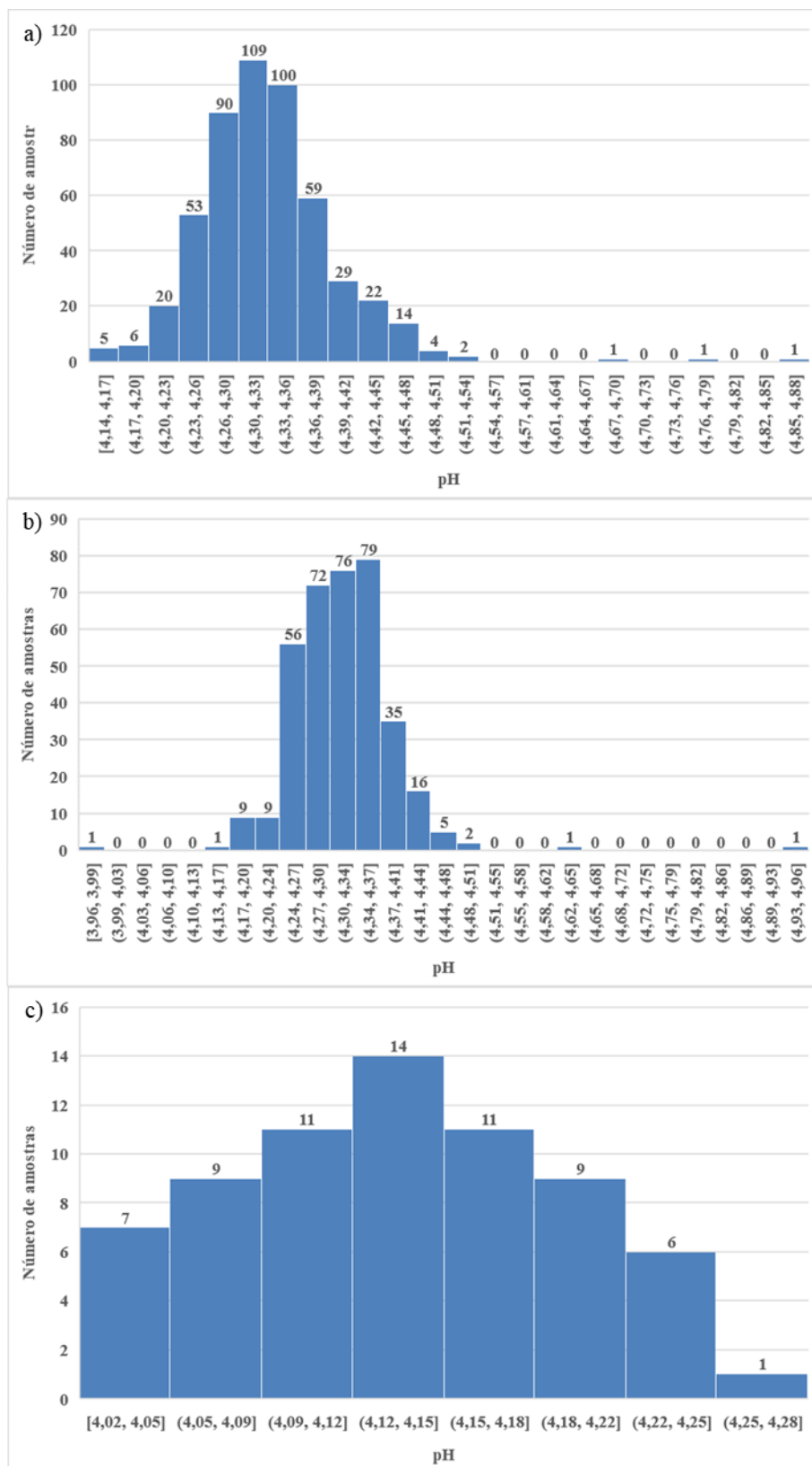


Figura 5.23 - Distribuição do pH das amostras analisadas no laboratório em 2019 de: **a)** guarda Sagres Branca; **b)** produto acabado Sagres Branca; **c)** produto acabado Sagres Preta

Na Figura 5.23-c) apresentou-se a distribuição do pH em produto acabado das várias amostras de Sagres Preta que foram analisadas em 2019. Todas as amostras apresentaram um pH entre 4,02 e 4,28, um intervalo de menor amplitude que os da Sagres Branca, e sem existirem

valores discrepantes. O pH de todas estas amostras situou-se dentro dos limites estabelecidos pela Portaria 1/96 de 3 de janeiro. A média e o desvio padrão associado foi de $4,13 \pm 0,06$. A empresa estabeleceu que o pH deste tipo de cerveja se deve situar entre 3,90 e 4,30; desta forma, o pH médio encontra-se dentro destes limites, ao contrário do observado em Sagres Branca. Assim, em Sagres Preta, o pH não apresenta valores altos e fora da especificação, o que pode não explicar os altos valores de diacetilo observados no produto final.

Sabendo-se a distribuição dos pH's das guarda e produtos finais, procurou-se então cruzar estes dados com os do diacetilo. O objetivo foi de observar se existia alguma correlação entre os altos pH's e os altos valores de diacetilo. A Figura 5.24 apresenta estas relações.

Na Figura 5.24-a) foram relacionadas as concentrações de diacetilo (ppb) das amostras de guarda de Sagres Branca com os respetivos valores de pH. Pode-se observar que existe uma relação entre as variáveis, em que quanto maior o pH observado, maior foi a concentração de diacetilo quantificada. Obteve-se uma regressão linear cujo comportamento é descrito pela equação $y = 91,018x - 337,35$, em que y representou a concentração de diacetilo (ppb) e x o pH da amostra, que apresentou um coeficiente de determinação de 0,1188. Apesar do baixo coeficiente de determinação, o grande número de amostras utilizadas para o cálculo da regressão leva a que se considere que o r^2 é estatisticamente significativo para um intervalo de confiança de 99% ($r^2 > 0,07$) (Hahn, 1973). Desta forma, comprova-se que há uma relação significativa entre a concentração de diacetilo e o pH da cerveja em guarda, havendo uma proporcionalidade direta.

Na Figura 5.24-b) relacionou-se as concentrações de diacetilo com o pH de várias amostras de produto acabado de Sagres Branca. Observou-se uma relação entre as variáveis, tal como na guarda, em que quanto maior o pH reportado, maior foi a concentração de diacetilo da amostra. A regressão linear obtida foi traduzida na equação $y = 45,68x - 174,7$, com um coeficiente de determinação de 0,1014. Como o número de amostras utilizadas foi de 60, este r^2 não é suficientemente alto para se poder afirmar, num intervalo de confiança de 99%, que a esta regressão é estatisticamente significativa ($r^2 < 0,13$). No entanto, para um intervalo de confiança de 95% já se pode afirmar que há significância estatística ($r^2 > 0,08$). Desta forma, pode-se afirmar que há uma correlação significativa entre o pH e o diacetilo no produto final de Sagres Branca.

Na Figura 5.24-c) apresentou-se a concentração de diacetilo em função do pH das amostras de produto acabado de Sagres Preta. Observa-se também nesta cerveja uma relação entre as variáveis. Obteve-se uma regressão linear para esta relação que se traduziu na equação $y = 280,93x - 1112,6$, com um r^2 de 0,2341. Este coeficiente de determinação, para o número de amostras analisadas (41), foi alto o suficiente para se poder afirmar, num intervalo de confiança de 99%, que a relação entre as variáveis é estatisticamente significativa ($r^2 > 0,16$). Assim, também no produto acabado de Sagres Preta se pode afirmar que há uma relação estatisticamente significativa entre o pH da cerveja e a concentração do diacetilo.

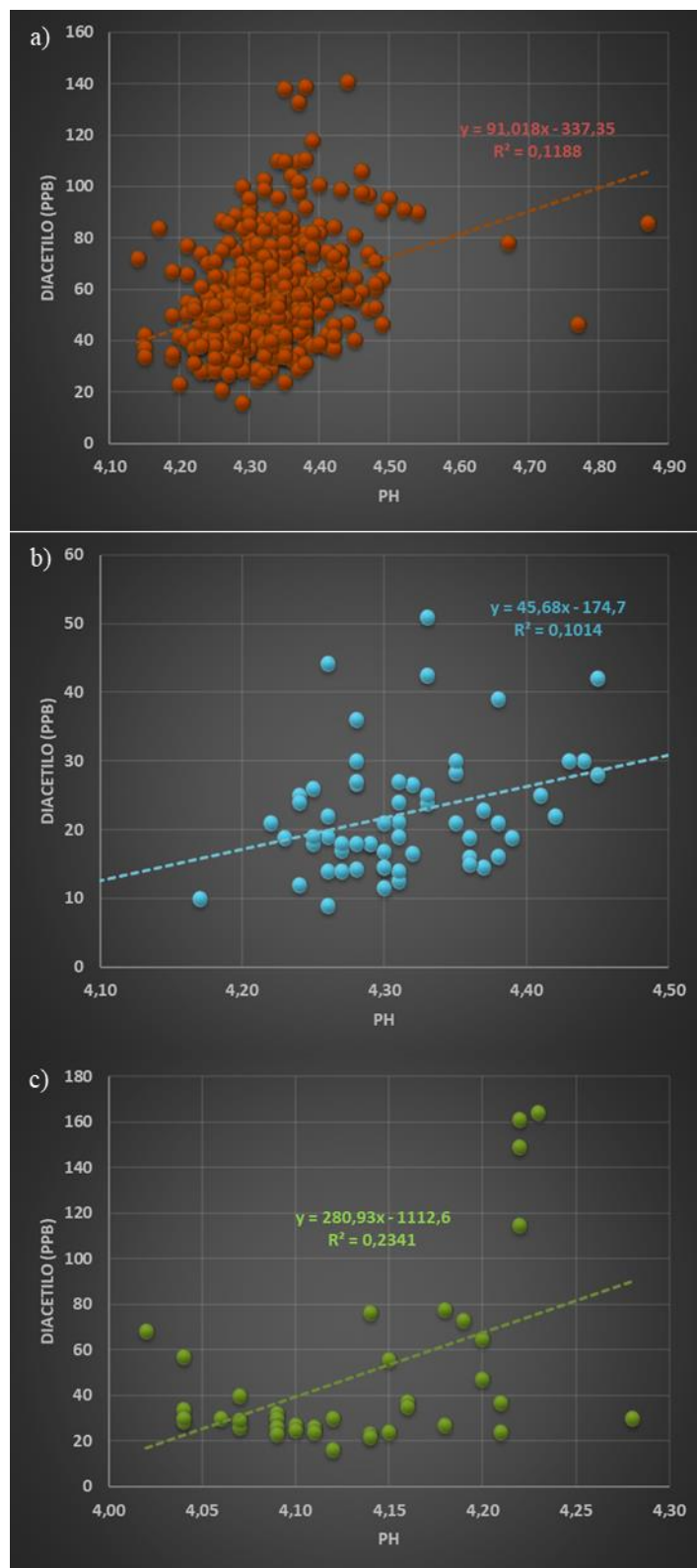


Figura 5.24 - Relação entre a concentração de diacetilo (ppb) e o pH das amostras analisadas em 2019 em: **a)** guarda de Sagres Branca; **b)** produto acabado de Sagres Branca; **c)** produto acabado de Sagres Preta

O efeito do pH na produção de diacetilo na cerveja já foi explicado noutros pontos desta dissertação, nomeadamente em 3.3.4.3 e em 5.1.13. Desta forma, já se compreendeu que mostos com pH mais baixos limitam a produção do diacetilo e levam a que haja um decréscimo mais

rápido deste composto no mosto. Uma vez ultrapassando o passo da fermentação, é mais complicado de remover o diacetilo do produto. Na guarda ainda existe uma quantidade residual de levedura no mosto; esta levedura pode ainda reduzir o diacetilo. No entanto os altos pH's não só não são favoráveis à redução do diacetilo a acetoína (Bamforth & Kanauchi, 2004), como também estabilizam o α -acetolactato, impedindo-o de descarboxilar a diacetilo (Inoue & Yamamoto, 1970; Rondags *et al.*, 1996). As altas concentrações de diacetilo que foram detetadas em guardas com alto pH podem ter várias origens. Por um lado, podem ser o resultado de cervejas que, aquando da sua transferência para guarda, possuíam uma elevada concentração de α -acetolactato. Este composto, devido à sua estabilidade em altos pH's acumulou-se na cerveja em fermentação, sofrendo alguma descarboxilação a diacetilo durante a guarda, e criando uma *pool* de diacetilo devido à ausência de levedura. Por outro lado, o diacetilo livre formado durante a guarda ou presente na cerveja desde a fermentação dificilmente foi reduzido a acetoína pois, não só a quantidade de levedura é muito reduzida em guarda, como o alto pH não favorece a atuação dos enzimas responsáveis por esta reação. Pode também ser consequência de contaminações bacterianas. No produto final de Sagres Branca e Preta é natural que esta relação se mantenha. Por um lado, as baixas temperaturas de guarda e o alto pH podem levar a uma manutenção de altas concentrações de α -acetolactato durante a guarda, que é depois convertido a diacetilo durante o armazenamento, quando a temperatura é superior. Por outro, pode ser resultado da acumulação de diacetilo durante a guarda devido à ineficiência dos enzimas responsáveis pela conversão do diacetilo a acetoína a altos pH's.

5.2 Propostas para melhoria do problema

Após o estudo dos vários parâmetros que podem ter influência na concentração do diacetilo surgiram duas novas questões neste estudo: será possível, alterando certos parâmetros ou realizando modificações no processo industrial, reduzir a concentração de diacetilo e, conseqüentemente, diminuir o tempo de fermentação de cada lote de cerveja? E: se sim, quais as alterações que podem ser feitas, tendo em conta que se pretende o menor custo associado e a obtenção de um produto o mais semelhante possível do ponto de vista sensorial? Desta forma, neste subcapítulo, serão abordadas as várias alterações que podem ser realizadas, justificando a sua realização ou refutando-as.

Em primeiro lugar, pode ser sugerida a engenharia genética da levedura. A redução na quantidade de diacetilo produzido pode ser obtida pela redução da expressão do enzima acetohidroxiácido sintase, pelo aumento da velocidade da via *downstream* à síntese acetohidroxiácida, e pela engenharia de uma levedura com capacidade de produção de α -acetolactato descarboxilase. Para a redução na expressão do acetohidroxiácido sintase recorre-se a uma mutação no gene *ILV2*, responsável pela transcrição deste enzima, reduzindo-se a conversão de piruvato a α -acetolactato; assim, elimina-se a via de síntese da valina, pelo que a

levedura procurará outros aminoácidos para produzir este aminoácido por transaminação (Dzialo *et al.*, 2017; Gibson *et al.*, 2018). O aumento do fluxo da via até à valina é outra estratégia; para tal, recorre-se a um aumento da expressão do acetohidroxiácido redutoisomerase (ILV4), que acelera a velocidade de conversão do α -acetolactato aos metabolitos seguintes da via. Assim, diminui-se o tempo de vida do α -acetolactato na célula e conseqüentemente, diminui-se a formação de diacetilo no mosto (Villanueva *et al.*, 1990; Dzialo *et al.*, 2017). Por último, a levedura poderia ser modificada para produzir α -acetolactato descarboxilase através do isolamento do gene responsável por este enzima, proveniente de enterobactérias que o produzem naturalmente, e usando o PGK1 como promotor e o CUP1 como marcador seletivo. Proceder-se-ia então à transformação da estirpe de levedura, que já produziria este enzima; na presença de α -acetolactato a levedura reduziria-o imediatamente a acetoína, antes da formação do diacetilo (Taylor, 2018b). No entanto, a engenharia genética envolve grandes recursos financeiros, uma alteração da levedura utilizada, assim como pode ter influência na produção proteica. A engenharia genética não é aceite pelo consumidor, assim como não está prevista legalmente a utilização de leveduras geneticamente modificadas para a produção de cerveja. Assim, esta não é uma solução viável de aplicar no contexto deste estudo.

Outra modificação que se poderia realizar seria a adição de α -acetolactato descarboxilase bacteriano. Este enzima encontra-se disponível no mercado, sendo utilizado por algumas cervejarias. O doseamento deste enzima deve ser feito após o arrefecimento do mosto e antes da inoculação da levedura. Desta forma, qualquer α -acetolactato formado durante a proliferação celular é imediatamente convertido a acetoína, podendo a fermentação ser encurtada em cerca de um terço, devido ao facto de não ser necessário de realizar o descanso do diacetilo. Assim, não só se poupa energia, como o equipamento fica disponível para ser utilizado para outras fermentações mais rapidamente (Hughes & Baxter, 2001; Choi *et al.*, 2015). No entanto, o custo associado à compra e utilização de enzimas no contexto industrial é elevado e apenas se justificaria a utilização deste enzima em períodos de alta de demanda e urgente aumento da capacidade de produção, como no verão.

A suplementação do mosto com valina surge como outra opção. A valina é o aminoácido responsável pela formação do diacetilo. A baixa concentração ou *uptake* da valina leva a que a célula necessite de sintetizar a valina, levando à formação de α -acetolactato como subproduto (Romkes & Lewis, 1971; Pires & Brányik, 2015). A valina tem um efeito inibidor da atividade do acetohidroxiácido sintase; em altas concentrações, este enzima deixa de converter o piruvato a α -acetolactato, pelo que cessa na célula a formação do precursor do diacetilo (Inoue *et al.*, 1973; Petersen *et al.*, 2004; Brányik *et al.*, 2008). A suplementação do mosto com valina já foi estudada, com resultados muito promissores, demonstrando-se que esta pode inibir fortemente a produção de diacetilo (Krogerus & Gibson, 2013b). No entanto, as concentrações de valina utilizadas no estudo não são economicamente viáveis para a utilização da suplementação num contexto

industrial, sendo o seu custo provavelmente superior ao custo de prolongar a fermentação e podendo levar à formação de álcoois superiores. Desta forma, só se justifica a suplementação com valina caso se comprove que concentrações mais baixas de valina também têm influência positiva no diacetilo, ou caso se encontre uma fonte de valina de baixo custo e acessível.

Modificações no teor de FAN também estão comprovadas como tendo influência na produção de diacetilo. Sabe-se que concentrações de FAN muito baixos levam a que se formem dois picos de diacetilo, o segundo deles bastante pronunciado e mais tardio na fermentação, o que atrasará a remoção deste composto do mosto (Boulton & Quain, 2001; Petersen *et al.*, 2004). Por outro lado, altos teores de FAN estão também associados a picos maiores e mais prolongados de diacetilo, traduzindo-se em maiores concentrações de diacetilo (Krogerus *et al.*, 2015). Desta forma, deve ser encontrada uma concentração que permita o crescimento pretendido para a levedura, formando-se apenas um pico de diacetilo, o mais baixo possível. Observou-se anteriormente que o mosto de Sagres Branca estava a apresentar uma concentração de FAN perto do seu limite inferior. É assim possível que a quantidade de FAN neste tipo de cerveja não seja suficiente para que se formem baixas quantidades de α -acetolactato, criando um duplo pico que está a atrasar as fermentações estudadas. Para alterar este parâmetro seria necessário realizar alterações significativas na receita, nomeadamente nas matérias primas, quer pela adição de menor quantidade de adjuntos ou pela utilização de maltes com maior germinação e consequente teor de FAN; outra solução seria o prolongamento, durante a empastagem, da pausa proteolítica, favorecendo a degradação proteica e formando-se maior FAN. No entanto, a alteração de matérias primas é algo complexo, levando não só a um aumento dos gastos, como também dá origem a várias alterações em praticamente todos os parâmetros, como o extrato, viscosidade, pH, que levariam a alterações organoléticas no produto. A percentagem de adjuntos utilizados tem grande influência na concentração de FAN, devendo esta ser alterada caso se pretenda um maior teor destes compostos (Layfield & Sheppard, 2015). A alteração do tempo de pausa proteolítica seria mais simples, não sendo no entanto realizada por prolongar o tempo da empastagem, assim como pelo facto de não se ter a certeza absoluta que o aumento do teor de FAN vá ter uma influência positiva na curva de diacetilo.

A alteração de alguns parâmetros foi sugerida como tendo influência na diacetilo. Foi sugerido um aumento na oxigenação que teria como consequência uma diminuição do diacetilo mais rápida, pois ocorreria uma maior proliferação celular e consequentemente uma maior redução por haver maior densidade celular (Portno, 1966). Esta hipótese foi refutada em 5.1.7, em que não se observou qualquer relação entre a taxa de arejamento e a concentração de diacetilo ao 7º dia, eliminando assim a hipótese de aumentar o arejamento do mosto. O aumento do tempo de *Ruh*, como de esperar e como observado em 5.1.5, também promove a diminuição do diacetilo, pois haverá maior conversão do α -acetolactato em diacetilo e seguidamente a redução deste (Bamforth & Kanauchi, 2004); no entanto o que se pretende neste estudo é exatamente reduzir o

tempo de *Ruh* necessário e conseqüentemente o tempo de fermentação. O aumento da concentração dos açúcares ($^{\circ}\text{P}$) também foi demonstrado como tendo efeito na diminuição da formação de diacetilo, podendo, no entanto, criar outros problemas como dificuldades na filtração ou o não aproveitamento correto do extrato, obtendo-se uma baixa atenuação (Saerens *et al.*, 2008).

O estudo das temperaturas utilizadas na fermentação também é algo interessante a ter em conta. A utilização de uma temperatura de fermentação superior leva a uma maior e mais rápida proliferação da levedura e conseqüente maior rapidez na redução do diacetilo (Taylor, 2018b). No entanto, uma fermentação mais rápida, favorecida pela alta temperatura, leva a um consumo mais rápido dos aminoácidos do meio, assim como a um aumento do *stress* da levedura, traduzindo-se numa maior produção de α -acetolactato (Boulton & Box, 2008; Krogerus & Gibson, 2013a). Este aumento da temperatura de fermentação pode, assim, ter um efeito benéfico, caso se observe de facto uma redução célere do diacetilo, ou prejudicial, devido à grande formação do precursor deste composto e maior formação ésteres e álcoois superiores não pretendidos. Desta forma, optou-se por não realizar um ensaio em que a temperatura de fermentação fosse aumentada.

Por outro lado, a diminuição da temperatura de fermentação pareceu mais sensata. A temperaturas mais baixas a fermentação ocorre de forma mais lenta, provocando menor *stress* na levedura e, conseqüentemente, levando a uma menor produção de α -acetolactato. Por outro lado, como se realiza o descanso do diacetilo, a conversão do α -acetolactato fica garantida (de Medeiros, 2010; de Medeiros *et al.*, 2017). As temperaturas de fermentação das leveduras *Lager* são, também, tradicionalmente mais baixas, pelo que se espera uma menor formação de *off-flavours*. Optou-se então por estudar a redução da temperatura de fermentação em 1°C .

Um estudo interessante pode-se realizar na fase do descanso do diacetilo, em que a fermentação e conseqüente formação de *flavours* já é residual. Pode-se aumentar, então, a temperatura do *Ruh*, visando o aumento da descarboxilação espontânea do α -acetolactato a diacetilo, que é favorecido pela temperatura, e uma mais rápida redução deste a acetoina pela levedura em suspensão (de Medeiros, 2010; de Medeiros *et al.*, 2017). No entanto, este ensaio não foi realizado por se temer a alteração do perfil organolético da cerveja pela maior produção de ésteres e álcoois superiores com o aumento da temperatura.

Um maior crescimento da levedura está também associado a uma maior formação de α -acetolactato e, conseqüentemente, de diacetilo. Como tal, o aumento da taxa de inoculação permitiria a manutenção da mesma quantidade de células disponíveis para a redução do diacetilo. Diminuir-se-ia, no entanto, a sua reprodução e, conseqüentemente, a necessidade de se formar α -acetolactato, ao se manter a taxa de oxigenação inalterada (Wainwright, 1973; Saerens *et al.*, 2008; de Medeiros, 2010; de Medeiros *et al.*, 2017). No entanto, o aumento da taxa de inoculação da levedura pode levar a efeitos negativos no processo industrial. Por um lado, seria necessária

uma maior quantidade de levedura para inoculação, podendo esta não estar disponível em qualquer altura para as fermentações. Por outro lado, isto poder-se-ia traduzir numa maior concentração de células em suspensão no fim da fermentação, dando origem a problemas na centrifugação, que teria de ser mais longa. Não se optou assim por seguir este caminho.

Por fim, o efeito do pH no diacetilo foi demonstrado várias vezes ao longo deste trabalho. Um pH mais baixo do mosto é benéfico em vários sentidos, tanto na produção de α -acetolactato pela levedura, na descarboxilação deste a diacetilo e na própria redução do diacetilo pela levedura (Krogerus & Gibson, 2013a). Desta forma, propôs-se adicionar uma certa quantidade de ácido sulfúrico durante a fervura do mosto, de forma a se obter um mosto arrefecido com um pH inferior em 0,2 ao pH que tipicamente o mosto estava a ser fabricado.

Outro processo utilizado com influência na concentração do diacetilo é a acidificação da levedura por lavagem ácida. Este é um procedimento padrão em algumas unidades industriais que consiste na adição de ácido às leveduras recolhidas, baixando bastante o pH do meio e levando à morte de potenciais bactérias contaminantes. Foi sugerido que esta lavagem ácida também tem influência na concentração de diacetilo, uma vez que reduz a viscosidade da levedura e evita uma floculação prematura da mesma na fermentação (de Medeiros, 2010; de Medeiros *et al.*, 2017). Apesar desta lavagem ácida dar origem a uma menor floculação e conseqüentemente as leveduras estarem mais tempo em contacto com o mosto para reduzirem o diacetilo do meio, este processo não foi estudado. Isto porque a lavagem ácida já tinha sido realizada na SCC anteriormente e os custos associados à mesma eram muito elevados, pelo que se exclui a realização deste processo, uma vez que se garantiu a segurança microbiológica por outras formas.

Entre outras modificações ao processo industrial a realizar poder-se-ia incluir o aquecimento da cerveja “verde”, de forma a se converter todo o α -acetolactato a diacetilo, seguido de um arrefecimento, passando-se a cerveja de seguida por uma matriz com células de levedura imobilizadas ou encapsuladas que removeriam rapidamente todo o diacetilo (Yamauchi *et al.*, 1995; Verbelen *et al.*, 2006; Taylor, 2018b). No entanto, a aplicação deste método a nível industrial requer um grande investimento financeiro e tecnológico, não estando assim contemplado neste estudo.

5.3 Análise dos ensaios realizados

Após a análise detalhada do histórico da empresa e um estudo intensivo da literatura quanto a este assunto, foi possível a identificação de parâmetros com influência na formação do diacetilo. Com base neste estudo, foram elaboradas várias propostas para melhoria do problema. No entanto, se o estudo aqui terminasse, apesar do seu valor académico, teria apenas ligeira importância para a empresa. Assim, propôs-se a complementação deste estudo com uma realização de vários ensaios, de forma a se encontrar uma solução ou melhoria para o problema observado.

Para a melhoria do problema foram propostos dois ensaios. O primeiro ensaio consistiu na redução de 1° C à temperatura de fermentação, ou seja, à temperatura a que a levedura é sujeita entre a inoculação do mosto e a passagem para *Ruh*, altura em que a temperatura é aumentada. O segundo ensaio consistiu na adição de ácido sulfúrico no mosto durante a fervura, de forma a se obter uma redução de 0,2 no pH do mosto. Os ensaios foram realizados apenas em Sagres Branca de forma a serem encaixados mais facilmente no plano de produção da empresa.

Para cada ensaio foi analisado o conteúdo de vários fermentadores diferentes, cujo conteúdo foi sujeito às condições previamente anunciadas. Estas fermentações foram comparadas com outras tantas fermentações de controlo, ou seja, fermentações “normais” cujos diagramas de brassagem e de fermentação não foram alterados. Para o primeiro ensaio foram analisadas três fermentações controlo e três fermentações de ensaio; para o segundo ensaio, duas fermentações de cada foram analisadas.

Os controlos estudados foram diferentes para cada ensaio. Os controlos utilizados para comparação com o primeiro ensaio (redução de temperatura de fermentação) foram analisados em primeiro lugar, o que permitiu estudar a situação da altura quanto aos parâmetros estudados e prever a evolução da fermentação. De seguida, foram feitas as alterações do primeiro ensaio e estudou-se a evolução da fermentação nos vários parâmetros. Como decorreu um grande intervalo de tempo entre a realização do primeiro ensaio e a retoma do estudo, intervalo esse em que foram realizadas alterações no fabrico, optou-se por, durante o estudo do segundo ensaio (redução do pH do mosto), se seguir também a evolução de duas fermentações padrão, sendo estas utilizadas como controlo do ensaio.

Para o estudo da evolução do diacetilo foram analisados vários parâmetros. Quanto ao mosto de cada fermentador, foi analisado o seu pH, extrato primitivo, teor de FAN e a sua atenuação limite aparente. Desta forma, foi possível observar que o fabrico do mosto foi realizado corretamente, não se observando diferenças significativas entre os mostos do controlo e dos ensaios (exceto ao nível do pH no segundo ensaio) que sejam justificativas de potenciais diferenças nas curvas do diacetilo e de fermentação. Quanto ao mosto em fermentação, foi seguido o comportamento do teor de FAN, pH, álcool, extrato aparente, número de células totais em suspensão, número de células viáveis em suspensão, número de células mortas em suspensão, viabilidade, diacetilo e seus precursores, 2,3-pentanodiona e seus precursores, ao longo do tempo.

A comparação dos ensaios com os controlos permitiu analisar a evolução das fermentações, atribuindo as diferenças relevantes que se pudessem observar à alteração realizada no ensaio. Já o estudo dos vários parâmetros permitiu observar se as alterações realizadas nos ensaios não tiveram consequências nefastas noutros parâmetros, ou se até os melhoram.

Numa fase final, o produto dos ensaios teve de ser validado com recurso a testes sensoriais e à aplicação do ensaio a nível industrial, com o intuito de perceber se os resultados foram reprodutíveis e se não houve impacto nas características organolépticas do produto.

5.3.1 Primeiro ensaio - Redução da temperatura de fermentação

Como explicado anteriormente, espera-se que a redução da temperatura de fermentação leve a uma fermentação menos efusiva do mosto, sujeitando a levedura a menos *stress* e levando à formação de um pico mais suave do diacetilo; a manutenção da subida da temperatura de *Ruh* garantiria assim, que a conversão do α -acetolactato continuaria a dar-se. Desta forma, procedeu-se à diminuição de 1° C na temperatura de fermentação, de γ ° C para $(\gamma-1)$ ° C, e procurou-se estudar o seu efeito na fermentação, quando comparada com o controlo. Para este ensaio, optou-se por se reunir os dados das três fermentações controlo (Controlo 1, 2 e 3) num só gráfico, sendo estes comparados com os dados das três fermentações do ensaio (Ensaio 1, 2 e 3), também elas reunidas num só gráfico. Nos vários gráficos foram apresentadas linhas verticais, uma que determina o início do *Ruh* (amarela) e outra o momento em que se recolhe a levedura do fermentador (verde). Estes tempos foram calculados com base na média das três fermentações. A linha verde-escura apresentada nos gráficos une os vários valores obtidos em cada parâmetro, de forma a que seja feita uma comparação mais eficiente, do ponto de vista visual, entre os controlos e os ensaios.

5.3.1.1 Evolução do extrato aparente

O extrato aparente permite seguir a evolução do consumo dos açúcares do mosto e a consequente formação de álcool. Na Figura 5.25 encontra-se representada a evolução do extrato aparente ao longo do tempo no controlo e no ensaio:

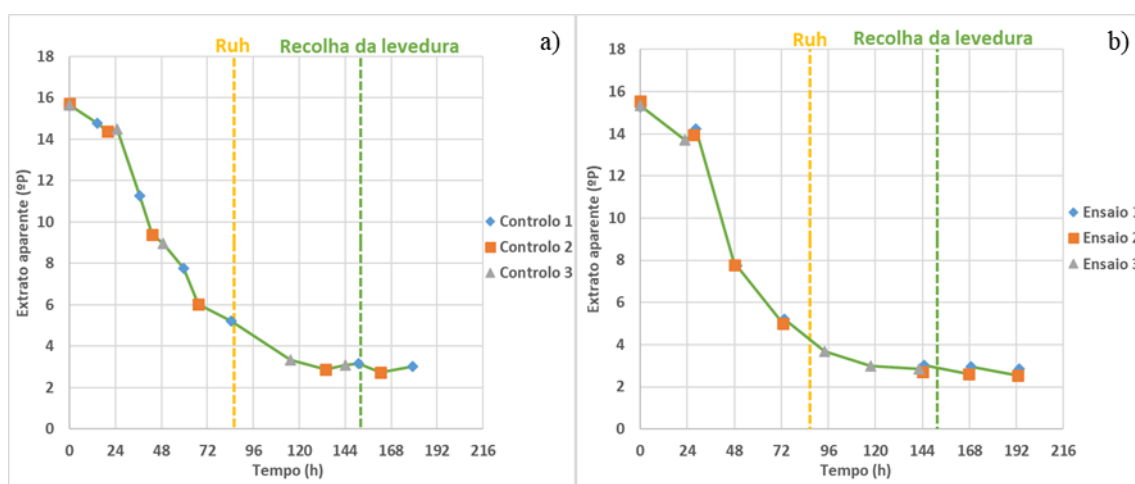


Figura 5.25 – Evolução do comportamento do extrato aparente (°P) ao longo do tempo nas fermentações dos: a) controlos; b) ensaios

Na Figura 5.25-a) observa-se a evolução do extrato aparente ao longo do tempo nas fermentações dos controlos. A média e o desvio padrão associado dos extratos primitivos do mosto foi de $15,68 \pm 0,05$ ° P. Nas primeiras 24 h, observou-se uma ligeira diminuição do extrato para valores acima dos 14° P. Após 48 h de fermentação, observou-se uma queda abrupta do extrato para cerca de 9° P. A concentração de açúcares continuou depois a descer para 6° P ao fim

de 72 h e a velocidades cada vez mais lentas ao longo dos dias, estabilizando ao fim de 120 h, perto dos 3° P, a partir dos quais se deixou de verificar a redução no extrato aparente.

Na Figura 5.25-b) é observada a mesma evolução, mas para as fermentações do ensaio. A média e o desvio padrão associado dos extratos primitivos do mosto foi de $15,38 \pm 0,15^\circ \text{P}$, ligeiramente abaixo dos extratos do controlo. Nas primeiras 24 h também se observou uma redução lenta no extrato aparente para 14°P , ligeiramente abaixo dos controlos. Após 48 h, o extrato caiu para 8°P , o que sugere que a fermentação do ensaio ocorreu a um ritmo mais elevado que a do controlo. Ao fim de 72 h, o extrato aparente atingiu cerca de 5°P , sendo a velocidade de diminuição do extrato cada vez mais lenta, até estabilizar por volta das 120 h abaixo dos 3°P . A partir daqui o extrato não sofreu grandes alterações, apesar de ter atingido valores ligeiramente inferiores aos da fermentação controlo.

Nas primeiras 24 h, considera-se que a levedura está em fase *lag*. Este é um período de adaptação da levedura, em que esta apenas consome o FAN e o oxigénio do meio, de forma a produzir os enzimas e compostos necessários para a sua proliferação. Assim, não é de esperar que se observe uma grande redução no extrato aparente no controlo e no ensaio (Volpe, 1997; Boulton & Quain, 2001). Após a fase *lag*, principia-se a fase *log*, em que se inicia a multiplicação da levedura. Nesta fase a taxa de fermentação vai aumentando cada vez mais e os açúcares do mosto vão sendo consumidos rapidamente de forma a se produzir etanol. No entanto, a taxa de decréscimo do extrato vai sendo cada vez mais lenta com o aumento da concentração de etanol, o que pode ser explicado pela redução da concentração dos açúcares do mosto e pela toxicidade do etanol que afetará a levedura. Depois das 100 h, atinge-se então o extrato aparente mais baixo, cessando a fermentação alcoólica (Boulton & Quain, 2001). É importante frisar que, tanto nos ensaios como nos controlos, o extrato aparente continuou em queda após o início de *Ruh*.

Quando comparados os controlos com os ensaios, aparentemente, observa-se uma diminuição mais rápida do extrato no ensaio em relação ao controlo. De acordo com a literatura, isto não seria de esperar, uma vez que, com a redução da temperatura de fermentação, seria normal que a redução no extrato aparente fosse mais lenta. A levedura a baixas temperaturas tem tendência a ter uma fermentação mais arrastada e menos intensa, com um *uptake* mais lento dos açúcares e formação mais vagarosa do álcool (Kaneda *et al.*, 1991; Kucharczyk & Tuszyński, 2018). Uma hipótese para isto acontecer pode-se prender no facto das leveduras *Lager* terem preferência por temperaturas mais baixas para exercer a sua atividade metabólica; pode-se ter dado o caso que a temperatura pré-definida para a fermentação fosse demasiado elevada para esta estirpe, pelo que, com a redução da temperatura, se atingiu um valor mais próximo da temperatura ótima de fermentação da levedura. Outra explicação pode-se prender com o facto de ter passado um mês entre o estudo do controlo e do ensaio; durante esse período de tempo pode ter havido ligeiras alterações nas matérias primas ou a própria levedura utilizada no ensaio, ao ser de gerações diferentes da do controlo, se encontrar mais ativa, ou ter sido armazenada em

melhores condições. Apesar de o extrato continuar em queda após o início do *Ruh*, não se observou um aumento da velocidade de consumo do extrato com o aumento da temperatura, o que poderá retirar alguma importância a este parâmetro.

É ainda importante de referir que a atenuação limite aparente dos mostos do controlo teve uma média e um desvio padrão associado de $85,53 \pm 0,23\%$, que ficou dentro dos intervalos definidos para este parâmetro em Sagres Branca, confirmando que o fabrico do mosto foi efetuado de forma correta e que uma possível alteração nas curvas de fermentação não se dará como consequência de um erro de fabrico. Por lapso, não foi analisado este parâmetro nas fermentações do ensaio, pelo que não se pode proceder à comparação das mesmas.

5.3.1.2 Evolução da percentagem de álcool

O aumento da percentagem de álcool também permite seguir a evolução do consumo dos açúcares do mosto, uma vez que é a consequência da mesma. Na Figura 5.26 encontra-se representada a evolução da percentagem de álcool ao longo do tempo no controlo e no ensaio:

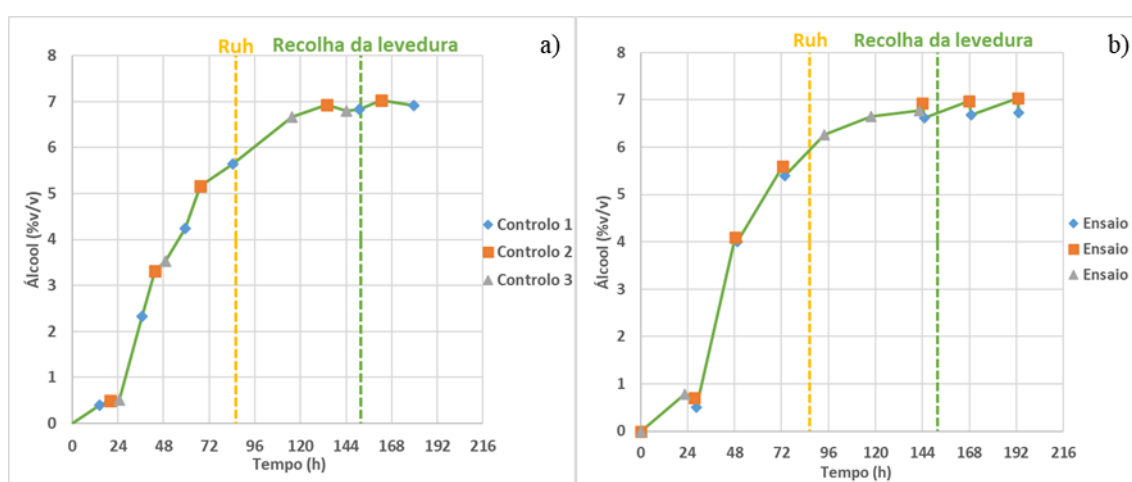


Figura 5.26 – Evolução do comportamento da percentagem de álcool (%v/v) ao longo do tempo nas fermentações dos: **a)** controlos; **b)** ensaios

Na Figura 5.26-a) encontra-se representada a evolução da percentagem de etanol ao longo do tempo nas fermentações dos controlos. A concentração de álcool no mosto é nula e tem uma pequena subida, até cerca de 0,5% v/v, nas primeiras 24 h. A formação de álcool aumenta drasticamente nas horas seguintes, atingindo 3,5% v/v ao fim de 48 h. A percentagem de álcool fica acima de 5% v/v após 72 h, altura em que a formação deste composto vai sendo cada vez mais lenta, até estabilizar ligeiramente abaixo dos 7% v/v, ao fim de 120 h.

Na Figura 5.26-b) encontra-se representada a mesma evolução, mas para as fermentações do ensaio. Partindo da ausência de álcool, a percentagem deste composto atinge valores acima de 0,5% v/v ao fim de 24 h. Nas 24 h seguintes, a produção de álcool aumenta imenso, atingindo os 4% v/v. A formação de álcool vai sendo depois progressivamente mais lenta, atingindo os 5,5% v/v ao fim de 72 h e estabilizando ao fim de 120 h ligeiramente abaixo dos 7% v/v. É também de

salientar que, após o início do *Ruh*, tanto nos ensaios como nos controlos, ainda continuou a haver formação de etanol.

É importante frisar que a formação de etanol foi inversamente proporcional ao decréscimo no extrato aparente, sendo atingido o máximo no teor de álcool quando se atinge o mínimo no extrato aparente. Tal é claro quando se compara a Figura 5.25 com a Figura 5.26. Desta forma, a aumento no teor de álcool tem o comportamento inverso ao do extrato aparente: na fase *lag* o aumento é pequeno, seguindo-se a fase *log* em que a taxa de formação do etanol é elevada. A taxa vai depois sendo cada vez mais reduzida, até ser nula e a concentração de etanol ficar estável. A concentração máxima de etanol depende da quantidade de açúcares disponíveis, da tolerância da estirpe ao etanol, mas também da composição do mosto; mostos com baixa oxigenação dão origem a cervejas que atingem menores concentrações de etanol por interferirem na fluidez da membrana, reduzindo a tolerância ao etanol (Boulton & Quain, 2001).

Quando comparados os controlos com os ensaios, mais uma vez estes não coincidem com a literatura. Foi observado que, para as mesmas condições de FAN e pH, seria de esperar que o aumento da percentagem de álcool fosse mais lento a temperaturas mais baixas, apesar de se atingirem valores finais próximos (Krogerus *et al.*, 2015). No entanto, observou-se o contrário, visto que às 48 e 72 h a percentagem de álcool foi superior no ensaio em relação ao controlo. Tal pode ter acontecido, pois a temperatura de fermentação atingida após a redução em 1° C poderá ser mais próxima da temperatura ideal de fermentação da levedura, visto as leveduras *Lager* têm tendência a proliferar melhor a temperaturas mais baixas; tal depende da estirpe em estudo. Surge também a hipótese de, no tempo decorrido entre o controlo e o ensaio, terem ocorrido alterações na matéria prima, nas condições de fermentação que tivessem provocado uma aceleração da fermentação, ou ainda que a própria levedura utilizada no ensaio se encontrasse em melhores condições fisiológicas e mais ativa.

5.3.1.3 Evolução do FAN

A redução no teor de FAN permite monitorizar o crescimento da levedura ao longo da fermentação. Na Figura 5.27 encontra-se representada a evolução do teor de FAN ao longo da fermentação para os controlos e os ensaios.

Na Figura 5.27-a) observa-se o comportamento do teor de FAN ao longo da fermentação nas fermentações do controlo. Inicialmente o teor médio de FAN do mosto e o desvio padrão associado foi de $148,24 \pm 9,14$ mg/L. Nas primeiras 24 h, o teor de FAN baixou, mas pouco, para valores próximos de 130 mg/L. Nas 24 h seguintes o teor de FAN baixou bastante, para cerca de

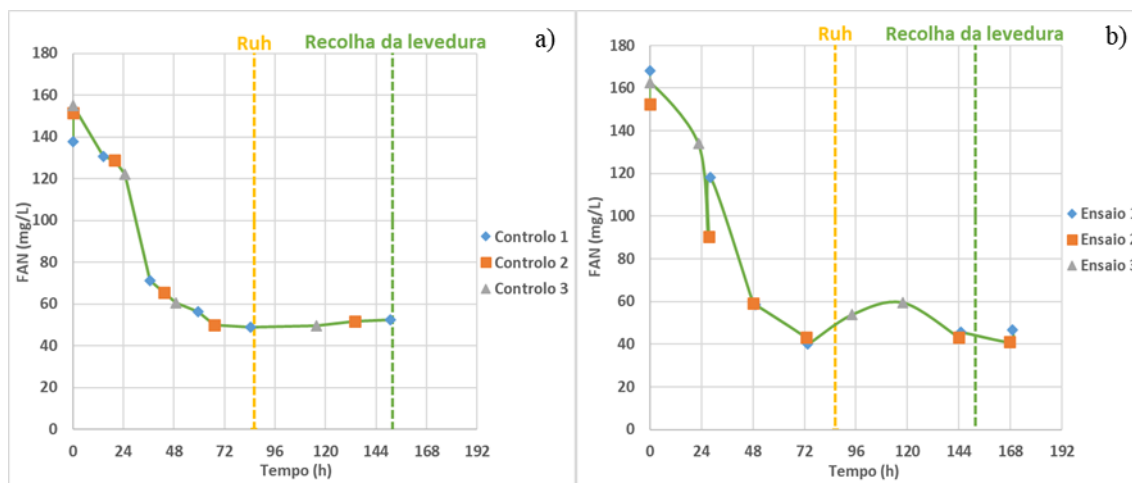


Figura 5.27 – Evolução do comportamento do teor de FAN (mg/L) ao longo do tempo nas fermentações dos: **a)** controlos; **b)** ensaios

60 mg/L, a partir do qual a redução deste parâmetro foi bastante mais lenta. Ao fim de 72 h de fermentação, antes do início do *Ruh*, o FAN estabilizou por volta dos 50 mg/L, valor este que só teve uma ligeira subida após 144 h de fermentação.

Na Figura 5.27-b) é possível controlar o mesmo parâmetro ao longo do tempo nas fermentações do ensaio. No mosto, o teor médio de FAN e o desvio padrão associado foi de $161,04 \pm 7,86$ mg/L. Nas primeiras 24 h, os teores de FAN desceram bastante, para cerca de 110 mg/L. Nas 24 h seguintes, o decréscimo foi ainda maior, atingindo-se valores abaixo dos 60 mg/L, tendo depois um decréscimo mais lento para cerca de 40 mg/L ao fim de 72 h de fermentação, antes do início do *Ruh*. O FAN tem depois um aumento no ensaio 3, enquanto que fica relativamente estável nos outros ensaios, até se terminar a fermentação.

Nas primeiras 24 h, considera-se que a levedura se encontra em fase *lag*; nesta fase a levedura está em adaptação ao meio e tem pouca multiplicação celular. No entanto, durante esta fase há uma *uptake* de FAN que leva a uma queda do pH (Boulton & Quain, 2001). Na fase *lag* e enquanto a concentração de etanol é baixa, a levedura procede ao rápido *uptake* de grande parte dos aminoácidos do mosto, armazenando-os no seu vacúolo para posterior uso na sua atividade metabólica, dando-lhe vantagem competitiva em relação a outros microrganismos que possam estar presentes (Hill & Stewart, 2019). Assim, durante a fase *lag* e a fase *log* é de esperar um rápido decréscimo do teor de FAN no mosto, que é usado pela levedura para a produção de enzimas, proteínas e outros aminoácidos que auxiliem a proliferação da célula, até cerca de 80 h após inoculação (Boulton & Quain, 2001; Stewart *et al.*, 2013). O *uptake* dos aminoácido acaba então por cessar devido às grandes concentrações de etanol que inibem fortemente as permeases do meio, ou por esgotamento dos aminoácidos (Hill & Stewart, 2019).

Comparando os ensaios com o controlo, a remoção do FAN do mosto no ensaio não só é mais rápida, como também é maior, uma vez que se partiu de valores de FAN mais altos em comparação com o controlo e se obtiveram concentrações menores de FAN em relação ao

controlo. Isto não vai de acordo com a literatura, pois seria de esperar que, a uma temperatura mais baixa, a remoção dos aminoácidos pelo mosto fosse também mais lenta, assim como a multiplicação seria menos efusiva (Boulton & Quain, 2001). Tal pode, mais uma vez, acontecer por se ter atingido uma temperatura ótima de fermentação, a que o crescimento da levedura se dará mais rapidamente em relação ao controlo. Pode também ocorrer por alterações na matéria prima, fermentação ou estado fisiológico da levedura que tenham sido favoráveis a uma fermentação mais rápida. Note-se que a concentração inicial de FAN no ensaio foi também mais alta; isto poderá ter impacto no crescimento da levedura, uma vez que terá acesso a uma maior quantidade de aminoácidos essenciais ao seu crescimento e poderá apresentar uma melhor fermentação. É também importante de frisar que o aumento na concentração de FAN no final da fermentação se pode dever à autólise da levedura, que liberta estes compostos no mosto após a sua morte; deve-se assim promover a utilização de leveduras com alta viabilidade e remover a levedura antes que ela comece a autolisar (Layfield & Sheppard, 2015).

5.3.1.4 Evolução do pH

O estudo do comportamento do pH não só permite avaliar a taxa de absorção do FAN, como também monitorizar a ocorrência de reações de transaminação, a formação de ácidos orgânicos e a excreção de prótons pela levedura (Taylor, 2018a). Na Figura 5.28 encontra-se representado o comportamento e evolução do pH ao longo das fermentações do controlo e do ensaio:

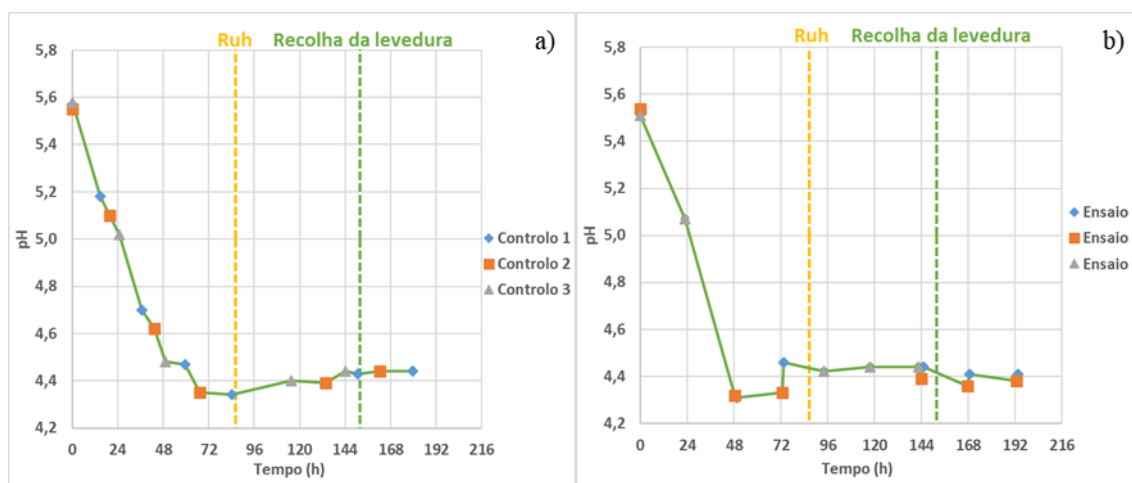


Figura 5.28 – Evolução do comportamento do pH ao longo do tempo nas fermentações dos: **a)** controlos; **b)** ensaios

Na Figura 5.28-a) está representada a evolução do pH ao longo das fermentações do controlo. Partindo-se de um pH médio e de um desvio padrão associado de $5,57 \pm 0,02$, o pH dos controlos seguiu uma queda acentuada e linear nas primeiras 48 h de fermentação, atingindo um pH ligeiramente abaixo 4,5. A diminuição foi depois mais lenta até às 72 h, altura em que se estabilizou ligeiramente acima do pH de 4,3. Após o início do *Ruh* este voltou a subir muito ligeiramente ao longo do tempo, sendo que às 168 h se situou por volta de um pH de 4,45.

Na Figura 5.28-b) foi representada a evolução deste mesmo parâmetro, mas para as fermentações do ensaio. O pH médio do mosto inicial e o desvio padrão associado foi de $5,52 \pm 0,02$. Nas primeiras 24 h, o pH baixou rapidamente para cerca de 5,1, baixando depois a uma velocidade ainda mais rápida até aos 4,3, após o total de 48 h de fermentação. A partir deste momento, o ensaio 1 teve um grande aumento do pH, seguido de uma diminuição leve, enquanto que os outros ensaios têm apenas um ligeiro aumento do pH até ao final do controlo das fermentações.

A diminuição do pH do mosto é rápida desde a fase *lag* da levedura. Isto acontece porque, mesmo em adaptação ao meio, ocorre uma combinação do *uptake* de diferentes iões, com secreção protónica e de ácidos orgânicos, assim como formação de CO_2 , o que acidifica o meio (Torija *et al.*, 2003). No entanto, o fator mais importante para este decréscimo do pH decorre do facto da célula realizar o *uptake* dos aminoácidos do mosto. O FAN exerce uma espécie de efeito tampão sobre o mosto; desta forma, ao ser removido, o pH diminui proporcionalmente (Boulton & Quain, 2001; Hill & Stewart, 2019). Este efeito foi também observado no vinho (Torija *et al.*, 2003). Após atingir o valor mínimo do pH, o pH vai sofrendo um ligeiro aumento. Este aumento do pH que se observa no final da fermentação deve-se à autólise das células da levedura, que libertam o seu conteúdo intracelular e que tornam o mosto ligeiramente mais básico (Krogerus *et al.*, 2015; Layfield & Sheppard, 2015).

Comparando as fermentações do controlo com o ensaio, podemos observar que, no ensaio, apesar da queda inicial do pH ter sido mais lenta que no controlo, atingiram-se valores mais baixos e mais rapidamente. O facto de se atingirem valores de pH mais baixos no ensaio pode estar relacionado com o maior consumo de FAN, observado na Figura 5.27-b). Segundo a literatura, seria de esperar que a queda no pH fosse mais lenta ao se utilizarem temperaturas mais baixas, como é o caso do ensaio (Krogerus *et al.*, 2015), assim como seria de esperar obter-se menores pH's finais. No entanto, mais uma vez, isto não se verifica, pois o pH no ensaio atinge o seu mínimo após 48 h, enquanto que no controlo foi apenas após 72 h. Isto pode-se dever ao facto de se ter atingido uma temperatura de fermentação favorável para a estirpe, o que acelerou o metabolismo da levedura e consequentemente a redução do pH. Pode também ser consequência de alterações na matéria prima ou na fermentação que aumentem a velocidade de fermentação, ou ainda a utilização de uma levedura mais ativa e em melhores condições fisiológicas no ensaio.

5.3.1.5 Evolução da população e viabilidade da levedura

A análise da população total de células em suspensão ao longo da fermentação permite observar a multiplicação e sedimentação das células ao longo da fermentação. Por outro lado, a comparação entre a população viável e não viável permite observar se o ensaio não tem um efeito negativo que provoque a morte das células, o que não é pretendido. Na Figura 5.29 estão

representadas as populações totais de levedura em suspensão e as populações viáveis e não viáveis em suspensão para os controlos e ensaios.

Na Figura 5.29-a) encontra-se representada a população total de células em suspensão (células/mL) ao longo das fermentações do controlo. Após 24 h de fermentação, observou-se que estava a ocorrer um aumento da concentração de células em suspensão, ou seja, que a fase *lag* já teria terminado, estando a concentração perto dos $15,0 \times 10^6$ células/mL. O pico máximo de células

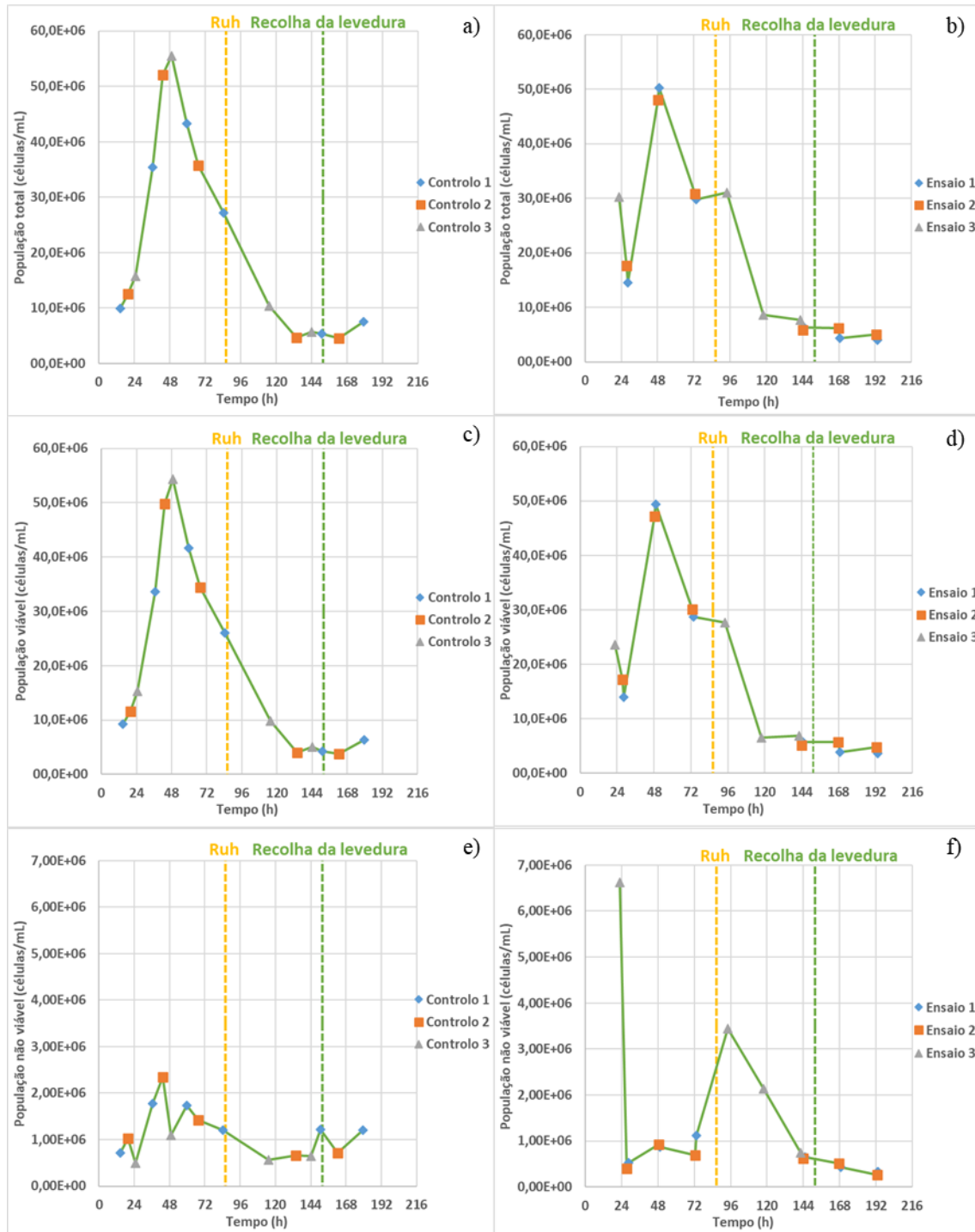


Figura 5.29 - Evolução ao longo da fermentação da população em suspensão de células (células/mL): **a)** totais nos controlos; **b)** totais nos ensaios; **c)** viáveis nos controlos; **d)** viáveis nos ensaios; **e)** não viáveis nos controlos; **f)** não viáveis nos ensaios

em suspensão ocorreu às 48 h de fermentação, tendo-se atingido as $55,0 \times 10^6$ células/mL; observou-se depois um decréscimo gradual das células totais em suspensão ao longo da fermentação, ficando a concentração constante ao fim de cerca de 130 h, com uma concentração de cerca de $5,0 \times 10^6$ células/mL.

Na Figura 5.29-c) está representada a população de células vivas (viáveis) em suspensão (células/mL) ao longo das fermentações controlo. O comportamento da curva é muito semelhante ao descrito para a população total de células em suspensão, pelo que não será descrito; a população viável é apenas ligeiramente inferior à população total, ao longo de toda a fermentação.

Na Figura 5.29-e) representou-se a população de células mortas (não viáveis) em suspensão (células/mL) ao longo das fermentações controlo. Observou-se que nas primeiras 24 h a população de células não viáveis em suspensão foi baixa e apresentou uma grande variação entre os vários controlos. Entre as 36h e as 48 h de fermentação atingiu-se o pico de células mortas em suspensão. Esta concentração foi depois diminuindo até às 120 h, altura em que estabilizou em cada um dos ensaios apresentados.

Na Figura 5.29-b) representou-se a população total de células em suspensão (células/mL) ao longo das fermentações do ensaio. Após 24 h de fermentação os três ensaios apresentaram uma grande dispersão na quantidade de células totais em suspensão, pelo que não foi possível fazer uma correta comparação. Depois de 48 h de fermentação, atingiu-se o pico de células totais em suspensão, com uma concentração de cerca de $50,0 \times 10^6$ células/mL. O número de células totais em suspensão começou depois a diminuir até estabilizar por volta das 120 h, com uma concentração ligeiramente acima de $5,0 \times 10^6$ células/mL, estabilizando até ao fim da medição deste parâmetro.

Na Figura 5.29-d) está representada a população de células vivas (viáveis) em suspensão (células/mL) ao longo das fermentações do ensaio. A evolução da curva é muito semelhante ao descrito para a população total de células em suspensão, pelo que não será, mais uma vez, descrito; a população viável é ligeiramente inferior à população total ao longo de toda a fermentação, destacando-se apenas a população do ensaio 3 ao fim de 24 h, que é bastante inferior às células totais em suspensão.

Na Figura 5.29-f) foi representada a população de células mortas (não viáveis) em suspensão (células/mL) ao longo das fermentações do ensaio. O ensaio 1 e o ensaio 2 apresentaram um comportamento semelhante; a concentração de células mortas após 24 h foi de cerca de $0,5 \times 10^6$ células/mL, aumentando para as $1,0 \times 10^6$ células/mL ao fim de 48 h de fermentação e diminuindo depois lentamente até ao fim da fermentação para concentrações de células não viáveis em suspensão abaixo de $0,5 \times 10^6$ células/mL. O ensaio 3 destacou-se pela negativa. Após uma alta concentração de células não viáveis em suspensão (cerca de $6,5 \times 10^6$ células/mL) ao fim de 24 h de fermentação, quando se voltou a obter resultados para este ensaio (após início de *Ruh*) a concentração já se encontrava em queda, apesar de elevada. Ao fim de 144

h, a população de células não viáveis em suspensão no ensaio 3 já foi semelhante às dos outros ensaios.

O comportamento da levedura não é igual ao longo de toda a fermentação. Após a inoculação do mosto com a levedura, esta entra em fase *lag*, uma fase em que a levedura tem baixa multiplicação pois encontra-se principalmente a sintetizar esteróis e ácidos gordos saturados, devido à presença de oxigénio, assim como a realizar o *uptake* dos aminoácidos do mosto, aumentando o seu volume celular. A célula passa depois para a fase *log*, uma altura em que a sua biomassa se multiplica rapidamente, aumentando também a sua população em suspensão, enquanto fermenta os açúcares do mosto (Boulton & Quain, 2001; Kucharczyk & Tuszynski, 2017; Kucharczyk & Tuszynski, 2018). Com o esgotamento do FAN e dos açúcares, é promovida a expressão dos genes *FLO*, produzindo floculinas (Verstrepen *et al.*, 2003). As células começam então a flocular e sedimentar, dando-se uma grande diminuição da concentração destas em suspensão no mosto. Assim, tanto a população total como a das células viáveis descreve naturalmente uma curva em que a concentração vai aumentando ao longo da fermentação, atingindo um pico máximo de células em suspensão. De seguida, as células em suspensão vão diminuindo até ao fim da fermentação. Quanto às células mortas, o seu número vai aumentando ao longo da fermentação. Desta forma, é de esperar que também atinja um pico destas células quando a quantidade de células em suspensão é máxima. O efeito do etanol, dióxido de carbono e outros fatores de *stress* promovem a morte celular pelo que, se se quiser reutilizar a levedura, se deve remover esta quando já não ocorrer a fermentação primária e a maioria da levedura estiver sedimentada (Boulton & Quain, 2001; Kucharczyk & Tuszynski, 2017; Kucharczyk & Tuszynski, 2018).

Ao se comparar os controlos com os ensaios, observou-se que, apesar da concentração de células totais inicial ter sido mais elevada nos ensaios, o pico é mais alto no controlo ($55,0 \times 10^6$ células/mL no controlo e $50,0 \times 10^6$ células/mL no ensaio). De acordo com a literatura, uma temperatura mais alta, como é o caso do controlo, leva a que ocorra uma maior proliferação celular e conseqüente biomassa, assim como leva a uma maior quantidade de células em suspensão (Krogerus *et al.*, 2015; Kucharczyk & Tuszynski, 2018); é também de esperar que a percentagem de células mortas seja ligeiramente maior a temperaturas mais altas. Desta forma, os dados parecem estar de acordo com a literatura. Observa-se de facto um maior pico de células em suspensão no controlo, onde a temperatura é mais alta, assim como se observa uma maior concentração de células mortas em suspensão durante esse pico e ao longo de toda a fermentação. É também importante referir que a viabilidade da levedura inoculada no ensaio 3 foi muito baixa, o que explica a alta concentração de células mortas que se observam para este ensaio; no entanto, esta concentração vai diminuindo ao longo da fermentação, o que sugere que, com o tempo, as células mortas têm tendência a sedimentar, tal como as outras células. Um dado importante é também o facto de em todas as fermentações se observar uma estabilização no número de células

em suspensão após cerca de 144 h; esta estabilização ocorreu sempre antes da remoção da levedura, o que permitiu, por um lado, recolher a maior quantidade possível de levedura para inocular noutras fermentações e, por outro, evitar que a levedura vá perdendo a sua viabilidade e que se lise no mosto, diminuindo a qualidade da cerveja.

Uma melhor comparação entre as células viáveis e não viáveis pode ser realizada quando se estuda a viabilidade destas, ou seja, a percentagem de células vivas no total de células em suspensão. A Figura 5.30 representa a viabilidade da levedura observada ao longo do tempo nas fermentações do controlo e do ensaio.

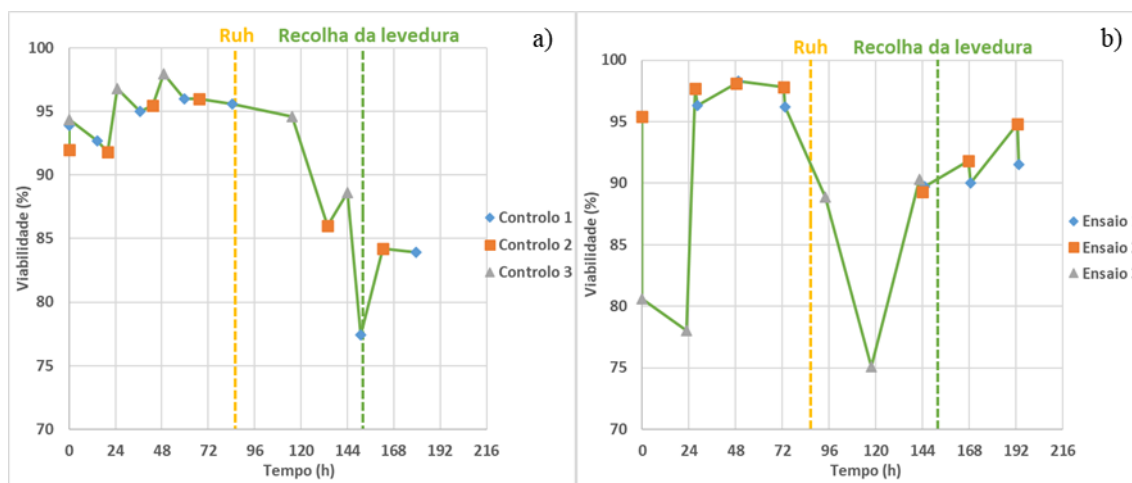


Figura 5.30 – Evolução do comportamento da viabilidade (%) ao longo do tempo nas fermentações dos: **a)** controlos; **b)** ensaios

Na Figura 5.30-a) observa-se a viabilidade (%) das fermentações do controlo ao longo da fermentação. O comportamento dos ensaios foi diferente. Enquanto que no controlo 1 e 2 houve uma ligeira diminuição entre a viabilidade da levedura inoculada e a registada após 24 h, no controlo 3 a viabilidade subiu ao fim de 24 h de fermentação. Observou-se depois um aumento da viabilidade até às 48 h, estabilizando até depois das 72 h de fermentação. Ocorreu de seguida uma queda da viabilidade até ao final da fermentação. No controlo 1 ainda se observou uma nova subida na viabilidade após a remoção da levedura.

Na Figura 5.30-b) está representada a viabilidade (%) das fermentações do ensaio ao longo da fermentação. No ensaio 3 a viabilidade teve uma queda nas primeiras 24 h; depois do *Ruh*, a viabilidade aumentou, sendo seguida de uma grande diminuição e posterior aumento. Já nos outros ensaios, a viabilidade aumentou nas primeiras 48 h, teve uma ligeira redução até às 72 h, seguindo-se depois uma diminuição ligeira até antes da recolha da levedura, seguida de um novo aumento.

Em suma, a viabilidade da levedura vai aumentando com a multiplicação celular até atingir o seu pico quando cessa a multiplicação; é nessa altura que existem em suspensão muitas células vivas. Apesar de começar a haver uma sedimentação após cessar a multiplicação, a viabilidade mantém-se durante algum tempo. No entanto, com o aumento das temperaturas como

consequência do *Ruh*, é de esperar que a viabilidade caia, uma vez que as altas temperaturas levam à autólise da levedura (Boulton & Quain, 2001; Kucharczyk & Tuszynski, 2018). Quando a concentração de células em suspensão já é muito baixa, é de esperar grandes flutuações na quantidade de células detetadas. Quanto ao facto de haver uma queda na viabilidade entre a apresentada na inoculação e após 24 h, isto pode-se dever ao tempo de acondicionamento. A viabilidade da levedura é analisada antes de ser inoculada, de forma a que se avalie o seu estado fisiológico; no entanto é possível que as leveduras do controlo 3 e ensaios 1 e 2 tenham sido imediatamente inoculadas após medição, enquanto que as outras leveduras estiveram armazenadas durante algumas horas perdendo alguma viabilidade (Layfield & Sheppard, 2015). É também de referir que o comportamento atípico da levedura do ensaio 3 pode ter como causa a baixa viabilidade desta, aquando da inoculação; a ausência de resultados (às 48 e 72 h) também não permite retirar grandes conclusões acerca da sua evolução.

Quando se comparou o ensaio com o controlo, observam-se viabilidades mais altas no ensaio que no controlo. Isto está de acordo com o esperado, uma vez que a temperatura utilizada no ensaio foi mais baixa, reduzindo-se o *stress* a que a levedura está sujeita.

Uma última análise do efeito da fermentação sobre a levedura pode ser feita comparando a viabilidade da levedura inoculada com a viabilidade da levedura retirada do fermentador após a referida fermentação. Estes dados encontram-se compilados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 – Viabilidades da levedura inoculada, viabilidades da levedura após fermentação, diferença entre as duas viabilidades e média da diferença para os vários controlos e ensaios analisados (Ensaio de redução da temperatura de fermentação)

Fermentação	Viabilidade da levedura inoculada (%)	Viabilidade da levedura após fermentação (%)	Diferença (%)	Média (%)
Controlo 1	93,9	89,7	-4,2	-2,4
Controlo 2	92,0	91,5	-0,5	
Controlo 3	94,4	-	-	
Ensaio 1	95,4	90,6	-4,8	-0,5
Ensaio 2	95,4	90,7	-4,7	
Ensaio 3	80,6	88,5	7,9	

A Tabela 5.11 demonstra as viabilidades das leveduras inoculadas nos fermentadores dos vários controlos e ensaios, a viabilidade da levedura recolhida dos fermentadores onde decorreram esses mesmos controlos e ensaios, as diferenças entre as viabilidades e ainda a média desta diferença. Apesar de não haver dados para o controlo 3, nos restantes controlos a viabilidade da levedura retirada dos fermentadores foi menor que a viabilidade da levedura inoculada, obtendo-se uma queda média de 2,4% na viabilidade. Já nos ensaios 1 e 2, também se observou uma queda na viabilidade da levedura, na ordem dos 4,8%. No entanto, o ensaio 3 viu a sua

viabilidade aumentar bastante, o que levou a que se obtivesse uma queda média de apenas 0,5% para os ensaios.

Não é, no entanto, possível identificar que o ensaio tenha tido algum efeito significativo na viabilidade da levedura, em comparação com o controlo. Isto porque, no geral, observa-se que as várias leveduras colhidas após fermentação obtiveram todas viabilidades entre os 88,5% e os 91,5%. O ensaio 3, que tinha uma viabilidade muito baixa, foi o único que aumentou. Em contrapartida, os ensaios 1 e 2, que tinham a maior viabilidade, foram os que mais diminuíram. Não é então correto afirmar que há diferenças nas viabilidades causadas pela redução da temperatura de fermentação em um 1° C. Há, no entanto, uma tendência nas fermentações estudadas para que as leveduras com viabilidades altas aquando da inoculação tenham uma maior queda da viabilidade em relação às outras. A ausência de uma queda acentuada da viabilidade no ensaio em relação ao controlo comprova que este não tem um efeito negativo na levedura, pelo que, caso se confirme que se melhoraram os valores de diacetilo, esta será uma proposta a implementar.

5.3.1.6 Evolução do diacetilo e do α -acetolactato

Uma vez analisados os diferentes parâmetros que se podem avaliar ao longo das fermentações, que permitiram comparar a evolução de fermentações controlo com fermentações que tiveram a sua temperatura de fermentação reduzida em 1° C, surgiu então a necessidade de estudar o efeito da alteração deste mesmo parâmetro na formação do diacetilo. Para isso, realizou-se o estudo de dois tipos de amostras que diferiram no seu modo de preparação.

A primeira amostra permitiu analisar a soma do diacetilo com o seu precursor, ou seja, o diacetilo total que se pode formar na solução caso o α -acetolactato seja totalmente convertido; esta é a análise padrão que se costuma realizar para o diacetilo ao 7° dia e seguintes, evitando que se obtenham cervejas que, apesar de apresentarem baixas concentrações de diacetilo, ainda possuam grandes concentrações de α -acetolactato que pode descarboxilar durante a pasteurização e armazenamento da cerveja. Para tal, as amostras foram aquecidas a 80° C durante 20 minutos, convertendo todo o α -acetolactato a diacetilo; a curva da concentração resultante é a que deve ser principalmente estudada.

A literatura sugere que o fator limitante da remoção do diacetilo se prende na velocidade de descarboxilação do α -acetolactato a diacetilo, visto que a redução do diacetilo a acetoína pela levedura é muito rápida (cerca de 10 vezes mais rápida que a produção de diacetilo) (White & Wainwright, 1975; Landaud *et al.*, 1998; Boulton & Box, 2008). De forma a confirmar se isto é verdade, preparou-se uma amostra que não foi aquecida, permitindo analisar a concentração de diacetilo livre que se encontra já convertido em solução. A diferença entre o diacetilo total e o livre daria assim a concentração de α -acetolactato presente no mosto. Se as concentrações de diacetilo livre fossem muito elevadas, o pressuposto da literatura caía, já que a taxa de remoção

do diacetilo não dependeria apenas da velocidade de descarboxilação, mas sim em grande parte da velocidade de redução pela levedura; altos teores de diacetilo livre significariam assim leveduras com baixo poder de redução do composto.

A Figura 5.31 compila as concentrações totais de diacetilo (diacetilo + α -acetolactato), diacetilo livre e α -acetolactato (diacetilo livre subtraído ao diacetilo total) para as várias fermentações controlo e ensaio. Nos controlos (Figura 5.31-a), Figura 5.31-c) e Figura 5.31-e)),

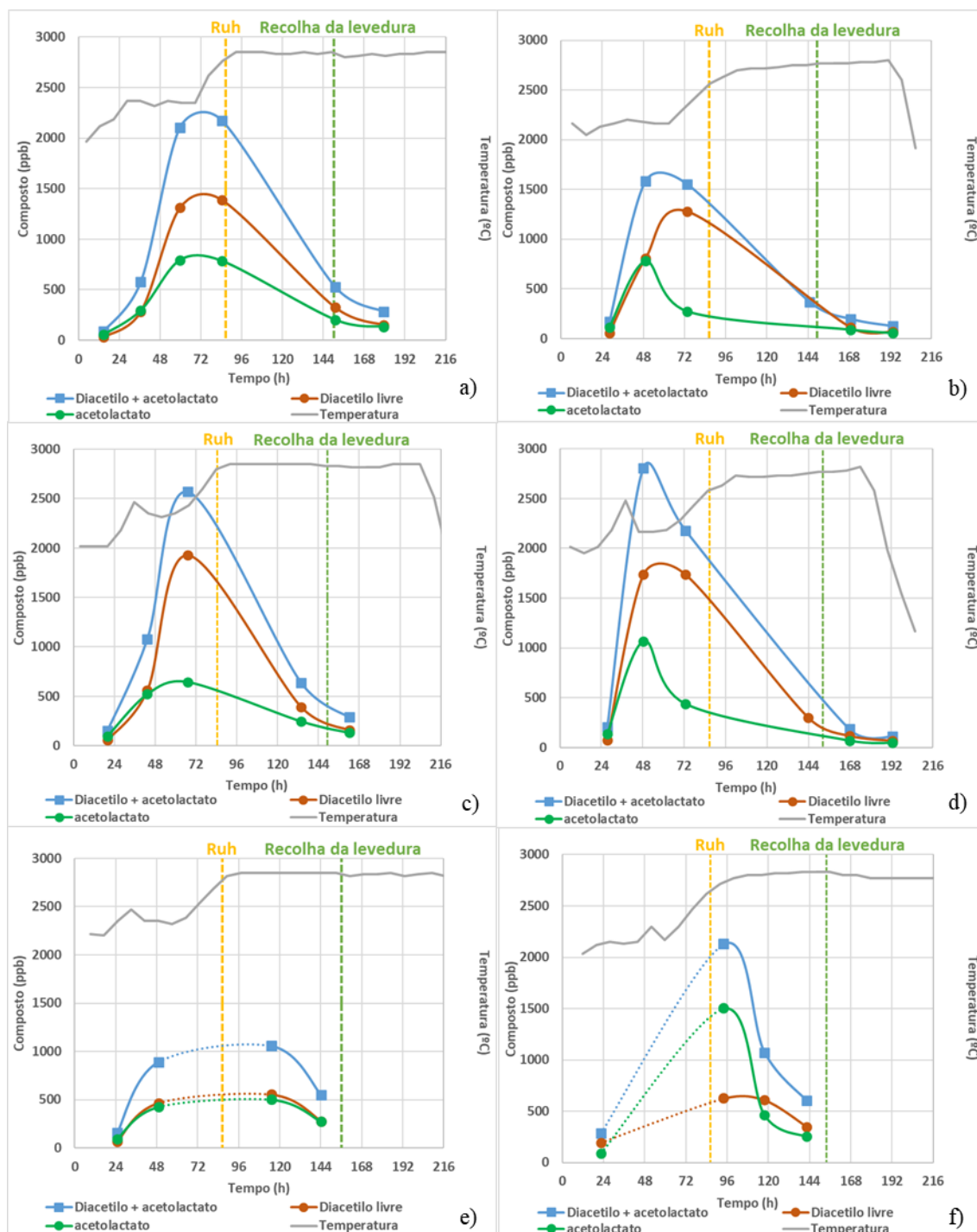


Figura 5.31 – Evolução da concentração (ppb) de diacetilo total (diacetilo + α -acetolactato), diacetilo livre e α -acetolactato ao longo das fermentações do: **a)** controlo 1; **b)** ensaio 1; **c)** controlo 2; **d)** ensaio 2; **e)** controlo 3; **f)** ensaio 3

a concentração de diacetilo total é baixa até às primeiras 24 h. Esta vai depois aumentando rapidamente até atingir o seu pico perto das 72 h; note-se que no controlo 3 não se observou o pico por este ter coincido com o fim de semana, altura em que não se recolheram amostras. A curva do diacetilo total inicia a sua queda mesmo antes de se atingir o *Ruh*, sendo muito rápida até cerca de 120 h de fermentação. A partir desta altura, a redução no diacetilo vai sendo cada vez mais lenta. A curva do diacetilo livre acompanha a progressão do diacetilo total ao longo de toda a fermentação, sendo, no entanto, ligeiramente menor. Já a curva do α -acetolactato é a mais pequena de todas, apresentando um pico muito menor que as do diacetilo livre e total.

Nas primeiras 24 h, é de esperar um grande aumento na concentração de α -acetolactato. A célula encontra-se em fase de adaptação ao meio, consumindo o oxigénio do meio para a síntese de esteróis e ácidos gordos insaturados, assim como os aminoácidos. É nesta fase que a célula produz o α -acetolactato, pois ainda não se encontra a consumir os aminoácidos do Grupo B, onde se insere a valina. É de esperar que a concentração deste composto vá aumentando até cessar o consumo de oxigénio e a multiplicação celular. Com o aumento da temperatura para o *Ruh*, o α -acetolactato deveria cair rapidamente, dando origem a uma maior proporção de diacetilo livre em relação a este composto.

O descrito anteriormente não se observa. Em primeiro lugar, é importante referir que a concentração de diacetilo livre é muito mais alta do que o esperado em toda a fermentação; isto pode sugerir que a conversão do α -acetolactato aconteceu em todas as fases e que não é o fator limitante da fermentação, mas que o fator limitante é a remoção pela levedura. Em segundo lugar, os valores do diacetilo total parecem estar atrasados em 24 h – seria de esperar que, como a maior parte da formação do α -acetolactato é realizada na fase *lag*, antes do *uptake* da valina, que o maior aumento na concentração de diacetilo se desse nessa altura, indo depois aumentando mais devagar ao longo do tempo até atingir o seu máximo com o fim da proliferação celular. Os dados referentes ao *uptake* do FAN e da concentração de células em suspensão sugerem que a proliferação termina após 48 h, pelo que seria aqui que se veria o pico do diacetilo. No entanto, nas primeiras 24 h a concentração do diacetilo foi muito baixo; o aumento no diacetilo é muito mais rápido depois da fase *lag*, mas este só atinge o seu pico às 72 h, ou seja, 24 h depois da multiplicação celular terminar, o que sugere que pode haver um atraso na excreção do α -acetolactato para o mosto. Depois deste momento, o diacetilo vai sendo removido de acordo com o esperado, sendo cada vez mais lenta a sua remoção ao longo do tempo. A remoção cada vez mais lenta do diacetilo ao longo do tempo foi relacionada com uma redução da atividade do diacetilo redutase na presença de uma alta percentagem de álcool e com alterações no transporte do diacetilo pela membrana (Tolls *et al.*, 1970; Boulton & Box, 2008). Apesar da curva do α -acetolactato ser muito menor do que o esperado, isto pode-se dever ao método de deteção aplicado. O α -acetolactato é calculado pela subtração do diacetilo livre ao diacetilo total; no entanto, a concentração de diacetilo livre detetada pode ter sido superior, muitas vezes, ao real. O método de análise aplicado à deteção do

diacetilo livre teve várias falhas, uma vez que não evitou que houvesse uma grande conversão do α -acetolactato a diacetilo. O α -acetolactato descarboxila facilmente na presença de oxigénio, a pH's baixos e a altas temperaturas; no entanto a amostra preparada não foi saturada com azoto ou dióxido de carbono, não foi neutralizada e sofreu uma termostatização antes da análise em cromatografia gasosa, sendo injetada a alta temperatura (Landaud *et al.*, 1998). Tudo isto pode ter contribuído para uma alta concentração de diacetilo livre à custa de uma grande redução no α -acetolactato. Desta forma, as amostras utilizadas para a deteção do diacetilo livre deveriam ter sido tratadas de forma a manter as condições mencionadas (maior pH, saturação em gás inerte e menor temperatura de termostatização e injeção). Não se deve, no entanto, eliminar a hipótese da redução do diacetilo pela levedura ser um fator limitante para a diminuição do teor deste composto durante a fermentação.

Nos ensaios (Figura 5.31-b), Figura 5.31-d) e Figura 5.31-f)) a evolução das curvas foi ligeiramente diferente. Tal como nos controlos, após 24 h, a concentração de diacetilo era baixa. No entanto, após 48 h de fermentação, observa-se o pico máximo do diacetilo nos ensaios 1 e 2, sendo que após 72 h, a concentração de diacetilo já se encontra a descer. Este dado associado ao aumento da taxa de remoção do FAN, queda do pH e formação de álcool pode significar que a fermentação foi mais rápida e intensa nos ensaios que nos controlos, atingindo-se o pico do diacetilo mais cedo. O ensaio 3 (cujos dados do pico não foram obtidos) ainda apresentou uma alta concentração de diacetilo após 96 h; no entanto, a remoção deste nas horas seguintes também é muito mais rápida. Os dados não estão de acordo com a literatura, que reporta picos de diacetilo mais cedo para fermentações com temperaturas maiores (Krogerus *et al.*, 2015). Isto pode-se dever ao facto de se ter atingido uma temperatura de fermentação favorável para a estirpe no ensaio, acelerando o metabolismo da levedura e conseqüentemente a redução do pH. Pode também ser consequência de alterações na matéria prima ou na fermentação que aumentaram a velocidade de fermentação, ou ainda a utilização de uma levedura mais ativa e em melhores condições fisiológicas no ensaio.

Na Figura 5.32 encontram-se agrupadas, duas a duas, as curvas de diacetilo total observadas nas várias fermentações, e o momento em que atingem o limite máximo de 120 ppb de diacetilo. O ensaio 1 foi comparado com o controlo 1 e assim sucessivamente, de forma a ser possível realizar uma comparação eficiente. Na Tabela 5.12, foram apresentados o tempo ao qual cada uma das fermentações do controlo e ensaio atingiram os 120 ppb, a melhoria no tempo de fermentação que se observou entre os ensaios e o controlo e a média dessa melhoria.

Na Figura 5.32-a) foram comparadas as fermentações controlo 1 e ensaio 1. Enquanto que no controlo 1 o maior aumento no diacetilo se observou entre as 32 h e as 60 h, no ensaio 1 esta observou-se entre as 28 h e as 48 h. Desta forma, o pico do controlo ocorreu mais tarde (aproximadamente às 72 h) em comparação com o do ensaio 1 (aproximadamente às 60 h). O

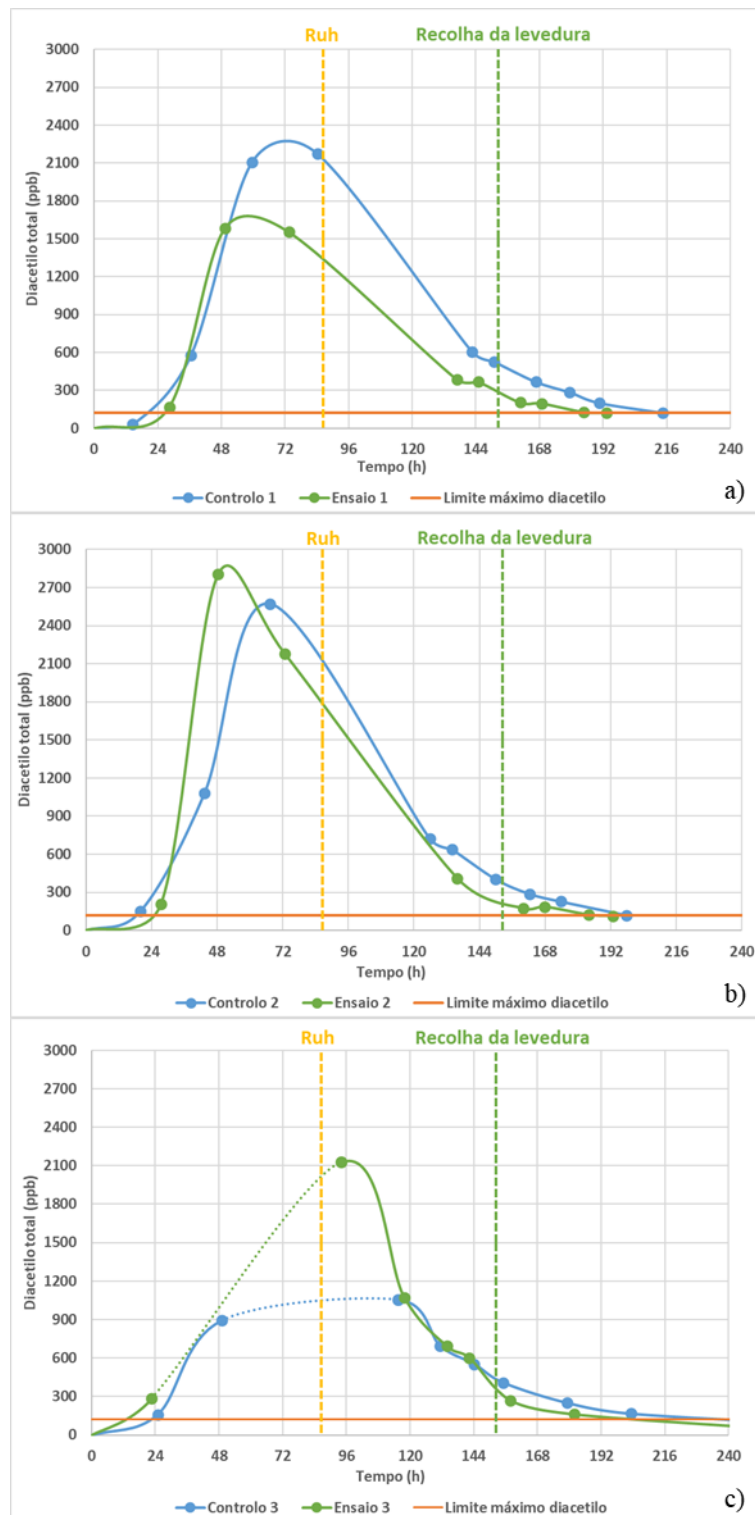


Figura 5.32 – Comparação entre as curvas de diacetilo e o momento em que atingem o limite máximo de 120 ppb de diacetilo entre: **a)** controlo 1 e ensaio 1; **b)** controlo 2 e ensaio 2; **c)** controlo 3 e ensaio 3

pico do diacetilo também foi maior no controlo 1 que no ensaio 1. Como o pico foi menor no ensaio 1 e ocorreu mais cedo, ao fim de 144 h a concentração de diacetilo foi menor neste e atingiu-se os 120 ppb também mais cedo. Segundo a Tabela 5.12, observou-se assim uma melhoria de 10,60 h no tempo de fermentação quando a fermentação é realizada nas condições do ensaio.

Na Figura 5.32-b) foi realizada a mesma comparação para o controlo 2 e ensaio 2. O controlo 2 teve um pico de diacetilo apenas após 72 h, enquanto que o ensaio apresentou esse pico após 48 h de fermentação. No entanto o pico no ensaio 2 foi mais alto. A velocidade de redução no ensaio 2 foi também maior, apresentando menor concentração de diacetilo ao fim de cerca de 135 h, em comparação com o controlo 2, e atingindo os 120 ppb mais cedo. A Tabela 5.12 reportou assim uma melhoria de 11,69 h com a implementação de uma menor temperatura de fermentação.

Na Figura 5.32-c) fez-se a mesma análise, comparando-se o controlo 3 com o ensaio 3. Para estas fermentações não se obtiveram os picos. No entanto, o ensaio 3 apresentou uma maior concentração de diacetilo ao fim de 24 h, em comparação com o controlo 1, e uma grande concentração de diacetilo ao fim de 96 h. Por voltas das 120 h, as concentrações do ensaio e controlo foram muito próximas; no entanto, a queda do diacetilo acabou por ser maior no ensaio 3, atingindo a concentração de 120 ppb mais cedo. Segundo a Tabela 5.12, o ensaio 3 representou uma redução no tempo de fermentação de 33,02 h, em comparação com o controlo 3.

Desta forma, foi possível concluir que o ensaio permitiu reduzir, em média, 18,44 h ao tempo de fermentação, sendo esta uma melhoria relevante. A comparação entre os controlos e ensaio permitiu observar que, aparentemente, uma fermentação primária mais rápida dá também origem a fermentações que atingem o limite dos 120 ppb de diacetilo mais cedo. Esta diminuição pode ser explicada pelo facto da levedura estar ainda bastante ativa e podendo remover o diacetilo mais rapidamente do meio se o pico deste for atingido mais cedo. O facto de se observarem altas concentrações de diacetilo livre fortalece este dado, uma vez que fica comprovado que a taxa de descarboxilação do α -acetolactato não é o fator limitante para a queda do diacetilo, mas que a taxa a que a levedura reduz o diacetilo também tem bastante influência.

Apesar da literatura prever uma curva de diacetilo mais baixa, mas mais tardia a temperaturas de fermentação mais baixas, o ensaio demonstrou exatamente o contrário, ou seja, um maior pico e mais cedo. No entanto, os resultados acabaram por ser melhores no ensaio, uma vez que se conseguiu reduzir o tempo de fermentação ao se reduzir a temperatura de fermentação, tal como havia sido testado por de Medeiros e os seus colaboradores (2017).

Tabela 5.12 – Tempo (h) ao qual as fermentações atingiram o limite máximo de 120 ppb de diacetilo, melhoria (h) observada entre os ensaios e os controlos, e melhoria média (h) que se obteve no tempo de fermentação entre os ensaios e os controlos.

Fermentação	Atingimento dos 120 ppb (h)	Melhoria (h)	Melhoria média (h)
Ensaio 1	204,53	10,60	18,44
Controlo 1	215,13		
Ensaio 2	186,29	11,69	
Controlo 2	197,98		
Ensaio 3	210,41	33,03	
Controlo 3	243,44		

5.3.1.7 Evolução da concentração de 2,3-pentanodiona

Por razões meramente académicas, decidiu-se também estudar a curva da 2,3-pentanodiona ao longo da fermentação, uma vez que este composto não costuma ser problemático para a cerveja visto que o seu limiar de deteção é muito alto, de cerca de 1 ppm (Krogerus & Gibson, 2013a). No entanto, sendo a 2,3-pentanodiona um produto secundário da

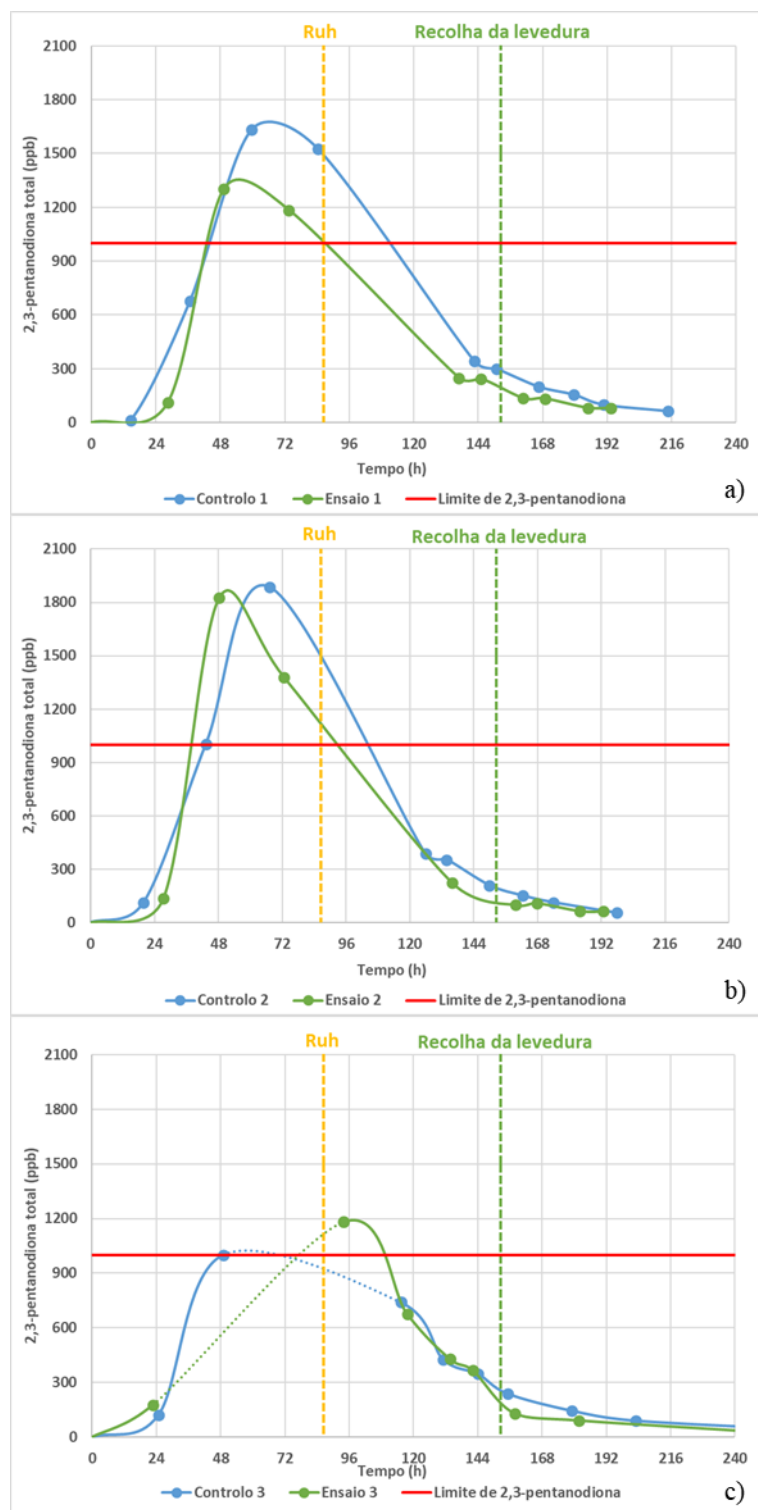


Figura 5.33 - Comparação entre as curvas de 2,3-pentanodiona do: a) controlo 1 e ensaio 1; b) controlo 2 e ensaio 2; c) controlo 3 e ensaio 3

síntese intracelular da isoleucina, um aminoácido também do Grupo B como a valina, é de esperar que esta apresente picos ao mesmo tempo que os do diacetilo, uma vez que são produzidos nas mesmas alturas (Krogerus & Gibson, 2013a; Ferreira & Guido, 2018).

Na Figura 5.33 encontra-se a mesma comparação que a realizada na Figura 5.32, em que se compararam os ensaios com os padrões. A curva da 2,3-pentanodiona parece seguir o mesmo comportamento que a do diacetilo. Os ensaios 1 e 2 apresentaram um pico mais cedo em relação aos respetivos controlos, seguido de uma redução mais rápida deste composto no meio. No ensaio 3 ainda se observam altas concentrações do composto após 96 h, mas a sua redução acaba por ser mais rápida que no controlo. É de notar que as concentrações de 2,3-pentanodiona não só são mais baixas que as do diacetilo, como apenas ultrapassam o limiar de deteção entre as cerca de 40 h de fermentação e as cerca de 100 h, não representando qualquer problema para o *flavour* da cerveja, uma vez que a fermentação é muito mais longa. As concentrações finais de 2,3-pentanodiona são também muito mais baixas que as do diacetilo.

5.3.1.8 Evolução da razão diacetilo/2,3-pentanodiona

A razão diacetilo/2,3-pentanodiona permite avaliar se ocorreram contaminações microbiológicas na fermentação. Sabe-se que bactérias como *Pediococcus* e *Lactobacillus*, que são encontradas frequentemente em fermentações contaminadas, são responsáveis por uma produção excessiva de diacetilo. Desta forma, caso os níveis de 2,3-pentanodiona sejam muito baixos em relação aos do diacetilo (e se se observar, por exemplo, uma tendência decrescente na 2,3-pentanodiona, mas crescente no diacetilo) pode-se suspeitar de uma contaminação microbiológica (Wainwright, 1973; Hughes & Baxter, 2001; Shibamoto, 2014; Russel, 2018).

De forma a ser possível identificar, no futuro, a presença de uma contaminação microbiológica, procurou-se estudar a razão diacetilo/2,3-pentanodiona ao longo da fermentação. Estes dados encontram-se representados na Figura 5.34; para simplificar a interpretação dos resultados, foram apresentadas as médias das razões calculadas em intervalos de tempo próximos.

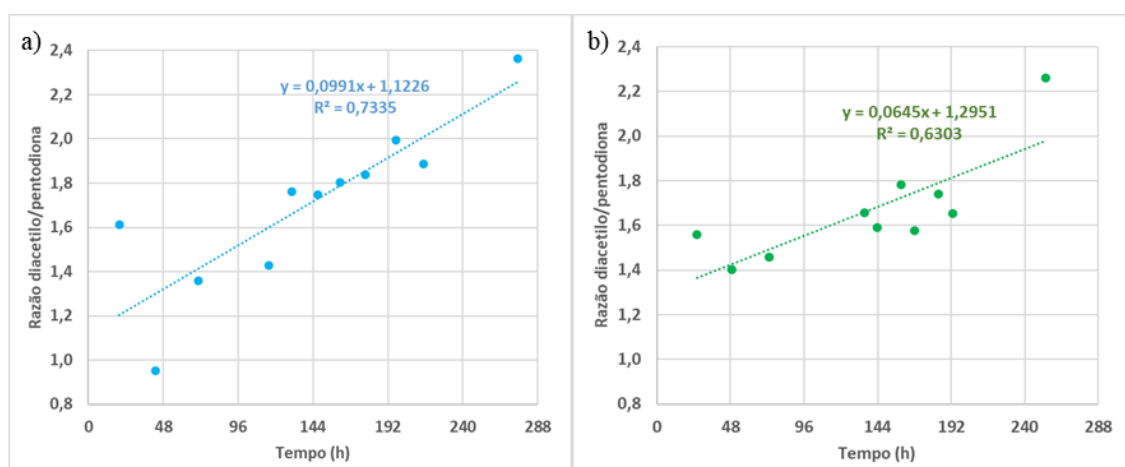


Figura 5.34 - Evolução das médias das razões diacetilo/2,3-pentanodiona ao longo do tempo de fermentação nos: **a)** controlos; **b)** ensaios

Na Figura 5.34-a) observou-se que as médias da razão diacetilo/2,3-pentanodiona se situou entre os valores de cerca de 0,9 e 2,4. Já na Figura 5.34-b) as razões centraram-se num menor intervalo, entre os 1,4 e 2,3. Desta forma, é de esperar que (quase sempre) a concentração de diacetilo seja superior à de 2,3-pentanodiona. No entanto, para razões superiores a 2,4, se forem observadas antes das 240 h de fermentação, deve-se analisar a existência de uma potencial contaminação. Tanto nos ensaios, como nos controlos observou-se uma relação linear entre a razão e o tempo, o que sugere que, no início da fermentação, se devem observar menores razões diacetilo/2,3-pentanodiona, enquanto que no fim da fermentação se devem observar maiores razões entre estes compostos (Wainwright, 1973; Hughes & Baxter, 2001; Shibamoto, 2014; Russel, 2018).

5.3.2 Segundo ensaio - Redução do pH do mosto

Como já explicado, espera-se que uma redução do pH do mosto tenha um efeito positivo na fermentação uma vez que leva a uma menor formação de α -acetolactato, a uma conversão maior do α -acetolactato a diacetilo e ainda a uma redução mais rápida do diacetilo pela levedura. Desta forma, procedeu-se à adição de ácido sulfúrico no mosto em fervura de forma a se reduzir o pH em 0,2 em relação ao pH dos fabricos normais, procurando-se estudar o efeito desta acidificação no diacetilo formado e no tempo de fermentação.

Em cada um dos gráficos apresentados para este ensaio foram agrupadas duas fermentações – controlo 1 com ensaio 1 e controlo 2 com ensaio 2. Desta forma, pretende-se realizar uma comparação direta entre ensaios e controlos, tendo também em conta que a levedura utilizada para o controlo 2 e ensaio 2 foi a mesma, o que permite uma ótima comparação. Nos vários gráficos foram apresentadas linhas verticais, uma que determina o início do *Ruh* (amarela) e outra o momento em que se recolhe a levedura do fermentador (verde). Estes tempos foram calculados com base na média das várias fermentações. Também está representada, num dos eixos, temperatura suposta do fermentador, ao longo do tempo. A justificação da evolução de cada parâmetro já foi realizada em 5.3.1, pelo que não se entrará em tanto detalhe.

5.3.2.1 Evolução do extrato aparente

A análise da evolução do extrato aparente permite seguir a velocidade de remoção dos açúcares do mosto, o que permite inferir a velocidade de fermentação do mesmo. Na Figura 5.35 encontra-se representada a evolução deste parâmetro ao longo das fermentações.

Na Figura 5.35-a) encontra-se representada a evolução do extrato aparente ao longo da fermentação do controlo 1 e ensaio 1. Foi possível observar que ambos partem de extratos aparentes semelhantes, não se observando diferenças na velocidade de fermentação nas primeiras 24 h, ou seja, durante a fase *lag*. No entanto, após 48 h de fermentação o valor de extrato aparente foi inferior no ensaio em relação ao controlo, o que sugeriu uma maior velocidade de fermentação

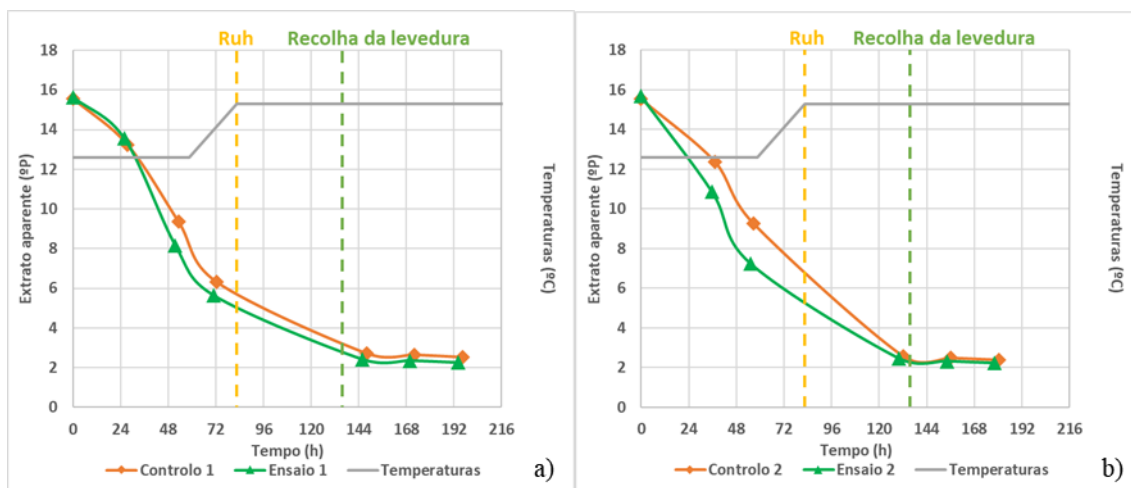


Figura 5.35 - Evolução do comportamento do extrato aparente (°P) e da temperatura (°C) ao longo das fermentações dos: **a)** controlo 1 e ensaio 1; **b)** controlo 2 e ensaio 2

no ensaio que no controlo. Após o início de *Ruh*, a queda de extrato aparente foi sendo cada vez menor, até que estabilizou por volta das 144 h; no entanto, o consumo total dos açúcares foi superior no ensaio que no controlo, o que sugere uma maior eficiência da fermentação, assim como um maior rendimento desta.

Na Figura 5.35-b) está representada a evolução do extrato aparente ao longo da fermentação, mas para o ensaio 2 e controlo 2, que foram inoculados com a mesma levedura. Nas primeiras 35 h já foi clara uma grande diferença no extrato aparente, sendo que a maior queda foi registada na fermentação do ensaio. O mesmo observou-se após 48 h, o que sugere que velocidade de fermentação foi maior no ensaio. O extrato aparente continuou a ser reduzido até que ao fim de cerca de 130 h estabilizou, sendo que o ensaio apresentou um menor extrato aparente que o controlo, mas com uma diferença menor do que a observada para o ensaio 1 e controlo 1.

Com base nos resultados analisados, pode-se afirmar que a redução do pH no mosto acelera a fermentação. No geral, observou-se uma maior queda no extrato aparente nos ensaios em relação aos controlos, o que sugere um consumo mais rápido dos açúcares do mosto. Nos dados obtidos por Krogerus e os seus colaboradores (2015) também se obteve uma maior redução no extrato aparente a pH mais baixos. No entanto, o pH adequado a cada levedura varia entre as estirpes, pelo que não deve ser muito elevado nem muito baixo; no entanto, tendo em conta que os limites apontados pela empresa para o pH do mosto o definem como entre 5,1 e 5,5, uma redução de 0,2 no mosto, uma vez que o pH médio estava muito próximo do limite superior, apenas vai favorecer a atividade da levedura, para além dos benefícios associados ao menor pH. No final da fermentação, os ensaios apresentaram um menor extrato aparente; a diferença é, no entanto, pequena, mas permite afirmar que a redução no pH permite obter um melhor rendimento da fermentação e maior consumo dos açúcares do mosto.

O estudo da atenuação limite aparente, neste caso, pode trazer duas vantagens. Por um lado, permite observar se não ocorreu nenhum erro de fabrico do mosto que teria influência na

evolução da fermentação e que levaria a que se considerasse o ensaio como nulo. Por outro lado, permite avaliar o efeito do pH na redução do extrato aparente pelas leveduras utilizadas para realizar este teste. Para os controlos, obteve-se uma atenuação limite aparente média de 87,40%, enquanto que para os ensaios a atenuação limite aparente média foi de 87,87%. O facto de tanto os ensaios como os controlos apresentarem altas atenuações aparentes confirma que a produção do mosto foi eficiente. No entanto, apesar da atenuação limite aparente ter sido maior nos ensaios, sugerindo um maior rendimento da fermentação, a diferença é muito pequena para se poderem tirar conclusões claras.

5.3.2.2 Evolução da percentagem de álcool

A evolução da percentagem de álcool ao longo da fermentação permite observar se a maior redução do extrato aparente do mosto, observada anteriormente, se traduz de facto numa maior conversão dos açúcares do mosto em álcool e num conseqüente maior rendimento. Na Figura 5.36 encontra-se representada a evolução deste parâmetro ao longo das fermentações.

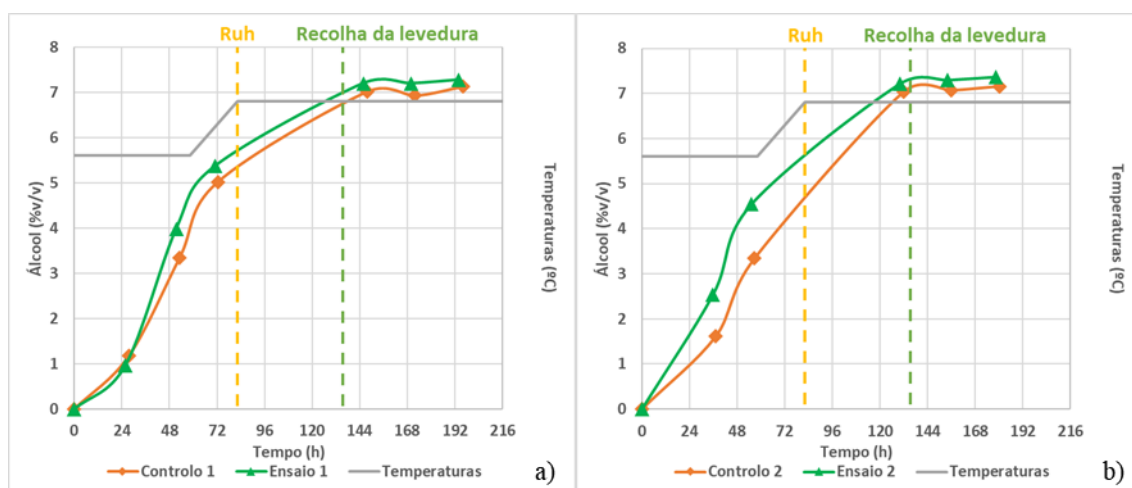


Figura 5.36 – Evolução da percentagem de álcool (%v/v) e da temperatura (°C) ao longo das fermentações dos: **a)** controlo 1 e ensaio 1; **b)** controlo 2 e ensaio 2

Na Figura 5.36-a) está representada a evolução da percentagem de etanol ao longo das fermentações do controlo 1 e ensaio 1. Nas primeiras 24 h houve um aumento ligeiro na percentagem de álcool que foi superior para o controlo em relação ao ensaio. No entanto, passadas 48 h do início da fermentação, observou-se uma percentagem de álcool superior no ensaio em relação ao controlo, apesar desta percentagem ter aumentado bastante em ambas as fermentações. Antes do início do *Ruh* o ensaio continuava a apresentar uma maior percentagem de álcool. Após 144 h de fermentação, a percentagem de álcool estabilizou em ambas as fermentações, sendo claro que houve uma maior formação de etanol no ensaio, o que comprova um maior rendimento do mosto nesta fermentação.

Na Figura 5.36-b) a mesma evolução foi estudada para o controlo 2 e ensaio 2. Após cerca de 35 h, foi clara uma diferença entre a percentagem de álcool, que foi maior no ensaio que no

padrão. A diferença foi aumentada depois das 48 h de fermentação, o que fortalece a tese de que a velocidade de fermentação será mais rápida no ensaio, ou seja, a menores valores de pH. Após cerca de 130 h de fermentação, a percentagem de etanol estabilizou, sendo, no entanto, maior no ensaio que no controlo, confirmando o maior rendimento desta fermentação.

É importante referir que, nos ensaios e nos controlos, a percentagem de álcool teve um comportamento inversamente proporcional ao do extrato aparente, uma vez que um é consequência do outro.

Os resultados apresentados permitem concluir que a redução do pH do mosto em 0,2 é benéfico para o produtor, uma vez que a levedura forma maior concentração de álcool e, conseqüentemente, se obtém um maior rendimento do mosto. Por outro lado, também se observa que o pH mais baixo leva a um aumento da velocidade de fermentação. Estas duas premissas foram comprovadas pelos estudos de Krogerus e os seus colaboradores (2015), em que estes investigadores observaram uma velocidade de fermentação ligeiramente mais rápida, assim como um ligeiro aumento do teor de álcool a pH's de mosto mais baixos. Tendo em conta o limite de pH's definido para o mosto, é assim de esperar que um pH mais reduzido do mosto tenha uma influência positiva na eficiência da levedura, obtendo-se maiores rendimentos a partir de mostos semelhantes.

5.3.2.3 Evolução do FAN

A evolução do consumo do FAN ao longo da fermentação permite monitorizar a velocidade de multiplicação da levedura, assim como a intensidade da fermentação em si. Na Figura 5.37 encontra-se representada a evolução deste parâmetro ao longo das fermentações.

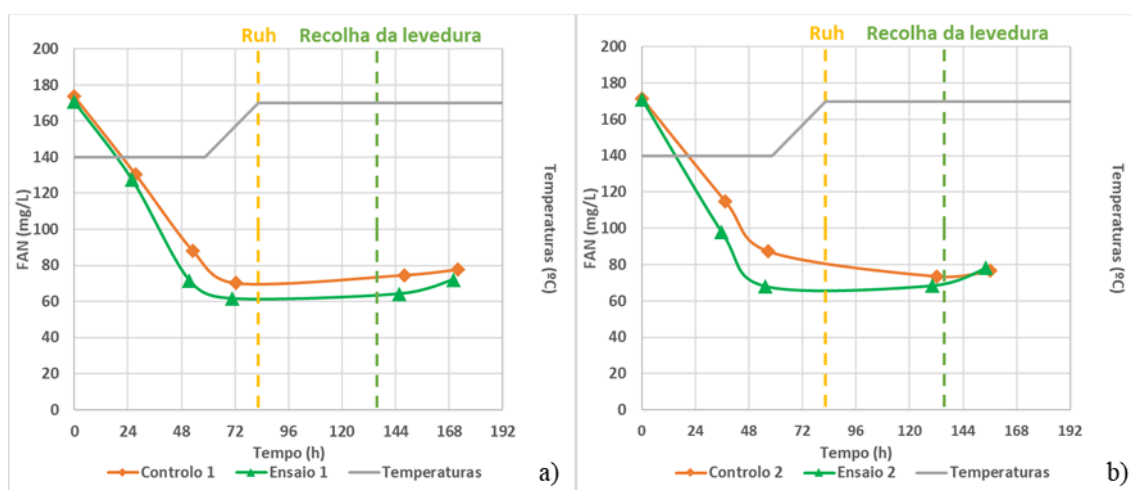


Figura 5.37 – Evolução do teor de FAN (mg/L) e da temperatura (°C) ao longo das fermentações dos: a) controlo 1 e ensaio 1; b) controlo 2 e ensaio 2

Na Figura 5.37-a) pode-se observar a evolução do teor de FAN no mosto, ao longo da fermentação, para o controlo 1 e ensaio 1. Inicialmente, o teor de FAN do mosto do controlo foi superior ao do ensaio. Após 24 h de fermentação, ambos os FAN caíram, não sendo possível

observar um maior consumo deste numa fermentação em relação à outra. No entanto, após 48 h, já foi possível distinguir uma clara diferença entre as duas fermentações, uma vez que a diminuição do FAN foi claramente maior no ensaio. Após 72 h de fermentação, o FAN atingiu a sua concentração mínima em ambas as fermentações, tendo-se atingido um menor teor no ensaio. Depois do início do *Ruh* e da recolha da levedura, observa-se uma ligeira subida no FAN. Este aumento é explicado pela autólise das leveduras no mosto que, ao fim de vários dias a altas temperaturas de *Ruh*, acabam por morrer e libertar os seus componentes celulares no mosto em fermentação (Layfield & Sheppard, 2015).

Na Figura 5.37-b) é possível observar a evolução do mesmo parâmetro ao longo das fermentações do controlo 2 e do ensaio 2. Apesar do teor de FAN dos dois mostos iniciais ter sido próximo, ao fim de 35 h de fermentação foi visível uma quebra maior deste parâmetro no ensaio em comparação com o controlo, apesar de ter sido grande em ambos. Após as 48 h de fermentação, o ensaio atinge o seu menor teor de FAN, bastante mais baixo que o do controlo. Depois de 130 h, o FAN do controlo diminuiu, mas o do ensaio subiu, subindo ambos nas 24 h seguintes; este aumento é explicado pela autólise das leveduras em suspensão, como explicado anteriormente (Layfield & Sheppard, 2015).

O controlo do teor de FAN ao longo da fermentação permite confirmar que as fermentações dos ensaios, não só levam a um maior consumo do FAN, como também possuem uma maior velocidade de consumo. O maior consumo de FAN pode-se dar pelo facto de pH's mais baixos levarem a uma maior expressão de permeases de aminoácidos, acelerando o *uptake* dos mesmos pela levedura (Schoondermark-Stolk *et al.*, 2005; Krogerus & Gibson, 2013a). Por outro lado, um pH mais baixo que o observado no controlo parece ser mais benéfico para o metabolismo da levedura, tal como observado na evolução do etanol e do extrato aparente.

5.3.2.4 Evolução do pH

Ao longo da fermentação, o pH vai diminuindo como consequência da produção de ácidos orgânicos, excreção protónica e *uptake* do FAN (Bouton & Quain, 2001; Layfield & Sheppard, 2015). Na Figura 5.38 encontra-se representada a evolução deste parâmetro ao longo das fermentações.

Na Figura 5.38-a) está representada a evolução do pH ao longo das fermentações do controlo 1 e do ensaio 1. O pH inicial do mosto foi, obviamente, diferente entre o controlo e o ensaio, uma vez que o mosto do ensaio foi acidificado de forma a que se reduzisse o seu pH em 0,2 em relação ao mosto do controlo. Nas primeiras 24 h houve uma queda do pH em ambos os mostos que parece semelhante; no entanto, ao fim de 48 h, foi possível observar um maior intervalo entre o pH da fermentação controlo e o do ensaio, uma vez que este último teve uma queda mais acentuada. Depois de 72 h em fermentação, o pH do ensaio caiu apenas ligeiramente, enquanto que o controlo, ao cair, reduziu a sua diferença em relação ao ensaio, o que sugere que

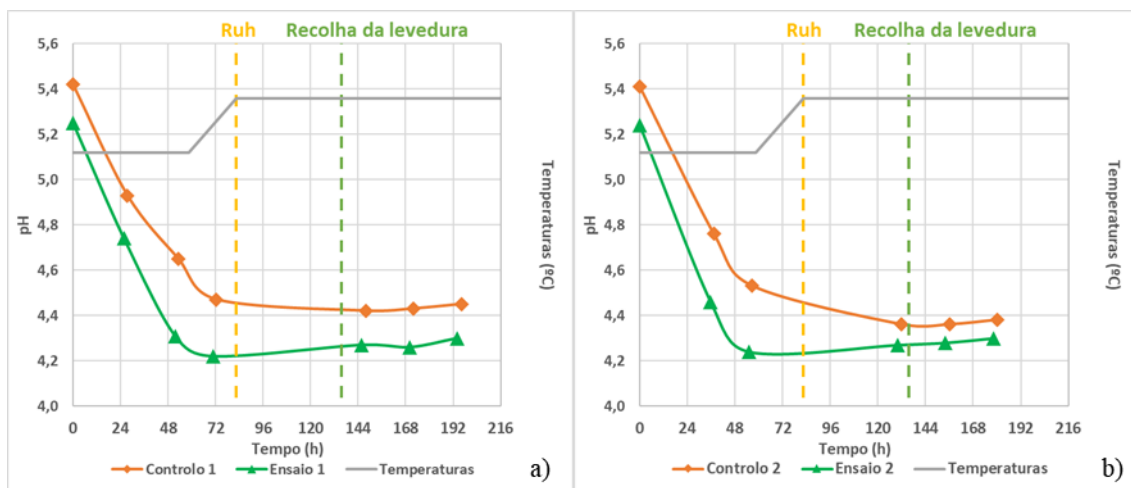


Figura 5.38 – Evolução do pH e da temperatura (°C) ao longo das fermentações dos: **a)** controlo 1 e ensaio 1; **b)** controlo 2 e ensaio 2

o ensaio diminui a sua atividade metabólica, enquanto que o controlo ainda a manteve durante mais algum tempo. Após 144 h, o pH do ensaio subiu um pouco e, daí em diante, teve algumas oscilações, enquanto que o do controlo desceu para voltar a subir ligeiramente nas horas seguintes; esta subida de pH ao fim de muito tempo de fermentação é justificada pela autólise da levedura que ainda se encontra em suspensão, uma vez que está sujeita a condições de *stress* pela alta percentagem de etanol e altas temperaturas de *Ruh* (Layfield & Sheppard, 2015). Note-se que a diferença entre o pH final das duas fermentações se manteve próximo dos 0,2, tal como no pH do mosto inicial.

Na Figura 5.38-b) encontra-se representada a evolução do mesmo parâmetro para as fermentações do controlo 2 e ensaio 2. O pH inicial dos mostos apresentou uma diferença de 0,2; no entanto, ao fim de cerca de 35 h de fermentação esta diferença aumentou, uma vez que, apesar do pH em ambas as fermentações ter caído bastante, a queda foi superior no ensaio. Após as 48 h de fermentação ainda se observou uma grande diferença entre o ensaio e o controlo, apesar do pH de ambos ter continuado a descer. Ao fim de cerca de 130 h de fermentação, o pH do ensaio aumentou ligeiramente enquanto que o do controlo desceu, reduzindo assim a diferença entre os dois. Nos dias seguintes o pH de ambas as fermentações foi subindo ligeiramente, apesar da diferença entre os dois se manter, sendo, no entanto, inferior a 0,2.

O comportamento do pH ao longo das fermentações do controlo e do ensaio está de acordo com o esperado, uma vez que, apesar do pH inicial ser maior no ensaio, espera-se que a queda absoluta observada seja relativamente igual à queda do controlo (Krogerus *et al.*, 2015). Desta forma, a explicação da queda do pH ser mais rápida nos ensaios que nos controlos pode-se prender pelo facto de pH's mais baixos sejam favoráveis à proliferação e fermentação desta levedura, em comparação com os pH's do controlo. Isto traduz-se num maior rendimento da fermentação, como reportado nos parâmetros analisados anteriormente. É também de notar que o

pH seguiu o mesmo padrão de queda que o teor de FAN, o que comprova que o pH é influenciado pela concentração de aminoácidos no mosto.

5.3.2.5 Evolução da população e viabilidade da levedura

O controlo da população de células em suspensão permite observar a evolução da fermentação ao longo do tempo. Desta forma, é possível distinguir os momentos em que as células se encontram em multiplicação ou quando terminam a fermentação primária, começando a flocular por esgotamento dos açúcares do meio. Pela análise das populações viáveis, não viáveis e controlo da viabilidade, é também possível garantir que o ensaio não tem uma consequência negativa na vitalidade da levedura, tornando-o reproduzível caso se confirmem melhorias na formação de diacetilo. Na Figura 5.39 estão representadas as populações totais, viáveis e não viáveis de levedura em suspensão ao longo da fermentação para os ensaios e controlos.

Na Figura 5.39-a) encontra-se representada a evolução da população total de células em suspensão nas fermentações do controlo 1 e ensaio 1. Após 24 h de fermentação, a quantidade de células em suspensão foi superior no controlo em relação ao ensaio. Nas 24 h seguintes, foi claro um grande aumento no número de células totais em suspensão como consequência da multiplicação celular. No entanto, a concentração de células continuou a ser maior no controlo em relação ao ensaio. Passadas 72 h na fermentação, o número total de células em suspensão no controlo já se encontrava em queda, o que sugeriu que a fermentação primária já estaria a terminar; por outro lado, o ensaio apresentou uma concentração de células semelhante à das 48 h, pelo que terá atingido o pico máximo entre este período, encontrando-se, também já no final da fermentação primária por esgotamento dos açúcares, tendo começado a levedura a flocular e sedimentar. Após 144 h de fermentação, a concentração total de células diminuiu bastante, sendo ligeiramente inferior no ensaio em relação ao controlo. Nos dias seguintes, observou-se uma ligeira estabilização no número de células total em suspensão.

Na Figura 5.39-b) apresenta-se a evolução do mesmo parâmetro para o controlo 2 e ensaio 2. Ao contrário dos controlo e ensaio 1, o ensaio 2 apresentou uma concentração de células em suspensão muito maior que o controlo 2, ao fim de 35 h de fermentação. Depois de 48 h de fermentação, a quantidade de células em ambas as fermentações aumentou apenas ligeiramente, prevendo-se que se tenha atingido o pico de células totais em suspensão nesse intervalo. Após 130 h de fermentação, observou-se uma queda no número de células em suspensão em ambas as fermentações, sendo que o ensaio apresentou um número ligeiramente maior. A concentração manteve-se nos dias seguintes ligeiramente estável para ambas as fermentações.

Salta à vista que o conjunto de dados 1 teve um comportamento oposto do conjunto de dados 2. Tendo em conta os dados anteriores, que referem que os ensaios apresentaram sempre uma maior velocidade de fermentação, seria também de esperar que a proliferação celular fosse maior nestes ensaios. No entanto o ensaio 1 apresentou uma menor concentração celular no pico

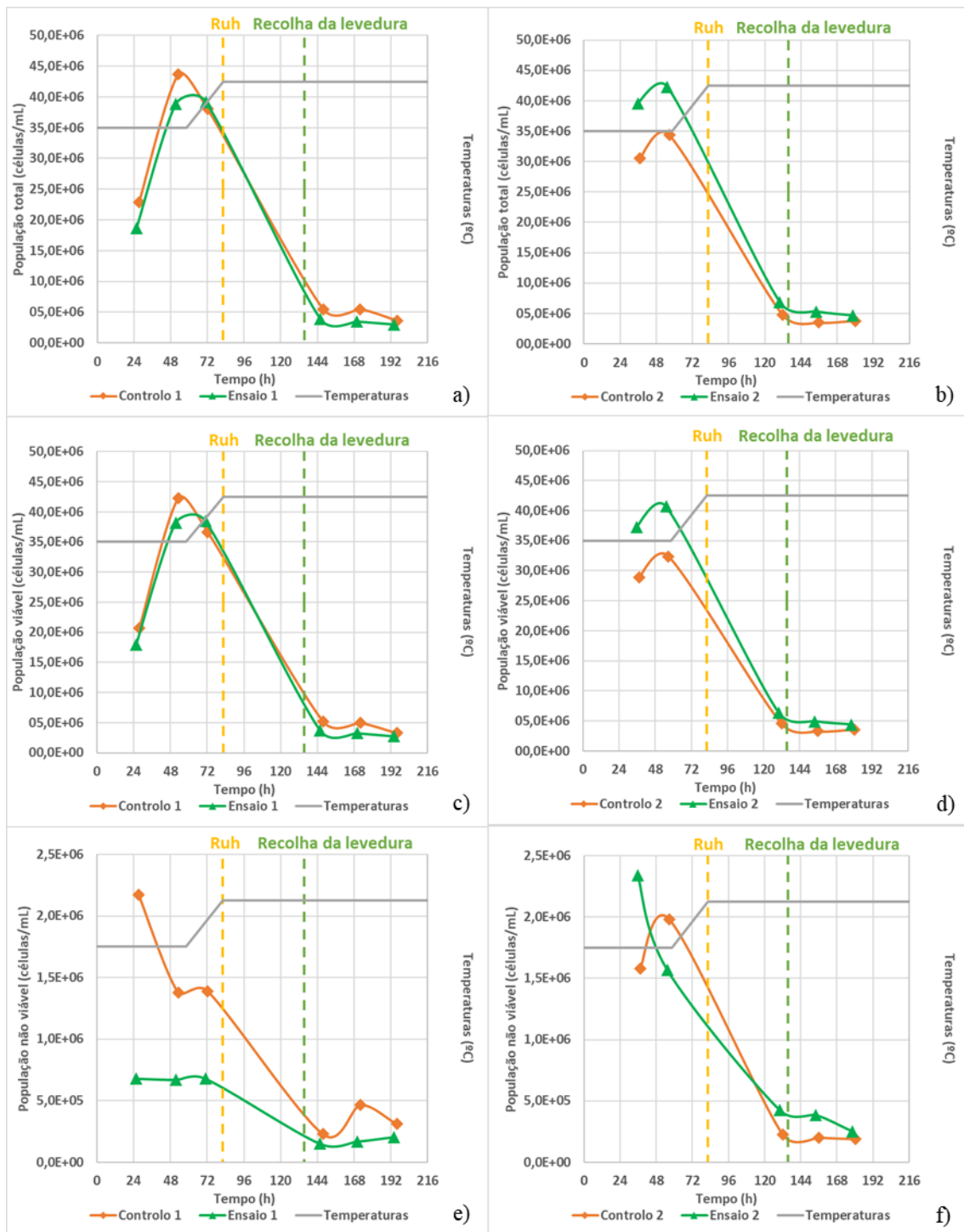


Figura 5.39 – Evolução ao longo da fermentação da temperatura (°C) e da população em suspensão de células (células/mL): **a)** totais no controlo 1 e ensaio 1; **b)** totais no controlo 2 e ensaio 2; **c)** viáveis no controlo 1 e ensaio 1; **d)** viáveis no controlo 2 e ensaio 2; **e)** não viáveis no controlo 1 e ensaio 1; **f)** não viáveis no controlo 2 e ensaio 2

em relação ao controlo 1. Isto pode-se dever a uma maior quantidade de levedura inoculada no controlo em relação ao ensaio. Seria também de esperar uma maior concentração de células em suspensão nos ensaios uma vez que pH's mais baixos reduzem a floculação prematura da levedura, sendo a acidificação um método utilizado com frequência para evitar este problema (de Medeiros *et al.*, 2017). Apesar do controlo 1 ter dado origem a mais células em suspensão que o

ensaio 1, nos outros parâmetros o ensaio 1 apresentou um maior velocidade de fermentação; desta forma, pode-se sugerir que a redução do pH não se traduz numa maior multiplicação celular, mas sim numa maior eficiência de fermentação.

Na Figura 5.39-c) e na Figura 5.39-d) encontra-se representada a evolução do número de células viáveis em suspensão ao longo da fermentação para os pares de resultados controlo/ensaio 1 e controlo/ensaio 2, respetivamente. A concentração de células viáveis em suspensão foi muito elevada em todas as fermentações, em comparação com as células totais, pelo que não se observa que os ensaios tenham tido um impacto negativo na sobrevivência da levedura. O comportamento da curva das células vivas em suspensão foi muito semelhante ao das células totais, pelo que não se realizará uma análise detalhada.

Na Figura 5.39-e) está representada a evolução da concentração de células não viáveis ao longo das fermentações do controlo 1 e ensaio 1. Enquanto que a concentração de células mortas no ensaio 1 se manteve relativamente constante entre as 24 e 72 h, esta concentração diminuiu bastante no controlo entre as 24 h e as 48 h, mantendo-se constante até às 72 h, o que sugere que o controlo apresentava um grande número de células mortas, mas que foram precipitando à medida que a multiplicação ocorria. Às 144 h obteve-se o menor número de células mortas em suspensão para ambas as fermentações, seguidas de um aumento nas horas seguintes, provavelmente devido ao *stress* causado pelas altas temperaturas de *R_{uh}* e concentrações de etanol.

Na Figura 5.39-f) está representada a evolução da mesma variável ao longo das fermentações do controlo 2 e ensaio 2. Enquanto que o número de células mortas em suspensão no ensaio 2 foi elevado às 24 h, mas foi sucessivamente caindo ao longo de toda a fermentação, este número aumentou no controlo entre as 24 e 48 h de fermentação, seguido de um declínio até às 130 h. A partir das 130 h, o controlo apresentou uma menor concentração de células mortas que o ensaio, ao contrário do observado para o conjunto de dados controlo/ensaio 1. A diferença no comportamento da levedura no controlo e ensaio 2 é interessante, uma vez que foi inoculada a mesma levedura em ambas. É também de notar que apesar do controlo ter apresentado menores concentrações de células totais após 48 h, apresentou uma maior quantidade de células mortas, ou seja, a levedura encontrava-se em piores condições. Desta forma, parece que a diminuição do pH tem um efeito benéfico na fermentação, uma vez que leva a que as células mortas sedimentem mais rapidamente e que sejam as células vivas as que permanecem principalmente em suspensão.

Entre os controlos e os ensaios não pareceu haver grandes diferenças ao nível da multiplicação celular. As leveduras que apresentaram maiores populações às 24 h de fermentação também apresentaram maiores concentrações ao fim de 48 h, sendo que a evolução deste parâmetro foi praticamente paralelo quando comparados os ensaios com os controlos, o que não sugere uma multiplicação mais rápida da levedura num processo em relação ao outro. Desta forma, pode-se sugerir que a diferença entre a velocidade de fermentação observada não se deu

por se ter verificado uma maior proliferação celular e maior formação de biomassa, mas sim pelas condições de menor pH terem facilitado o *uptake* dos elementos do mosto, acelerando a sua metabolização e traduzindo-se num maior rendimento do mosto. Pode-se também sugerir que a multiplicação celular tenha terminado em todas as fermentações por volta das 48 h, momento a partir do qual se começa a observar uma diminuição no número de células em suspensão, como consequência do início da floculação.

Para analisar se o pH teve uma influência positiva na viabilidade celular é importante estudar a viabilidade da mesma ao longo da fermentação. A Figura 5.40 representou a evolução da viabilidade da levedura ao longo das fermentações.

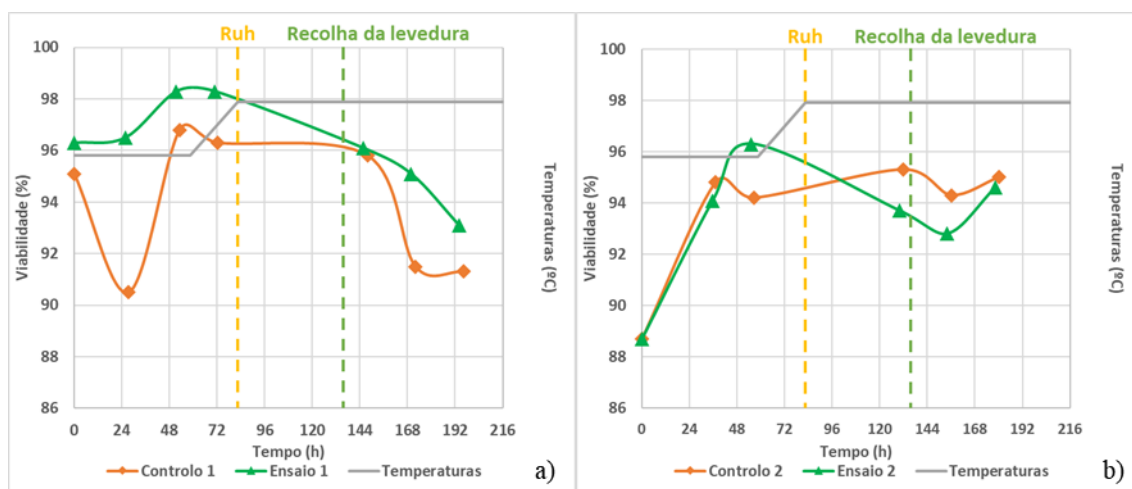


Figura 5.40 - Evolução da percentagem de viabilidade (%) e da temperatura (°C) ao longo das fermentações dos: **a)** controlo 1 e ensaio 1; **b)** controlo 2 e ensaio 2

Na Figura 5.40-a) está representada a evolução da percentagem de viabilidade ao longo das fermentações do controlo 1 e ensaio 1. O ensaio 1 foi aumentando a sua viabilidade durante a multiplicação celular; esta viabilidade foi depois descendo ao longo da fermentação, provavelmente devido ao efeito das altas temperaturas de *Ruh* e do stress causado pelas altas percentagens de álcool e de CO₂ dissolvido (Krogerus *et al.*, 2015; Kucharczyk & Tuszyński, 2018). Quanto ao controlo, observou-se uma queda acentuada da viabilidade nas primeiras horas em relação à viabilidade inicial (provavelmente decorrente das condições de armazenamento da levedura); a viabilidade subiu depois após 48 h, mantendo-se alta até às 144 h de fermentação, só diminuindo a partir desta altura.

Na Figura 5.40-b) está representada a evolução da mesma variável para as fermentações do controlo 2 e ensaio 2. Note-se que estas leveduras tiveram origem na mesma fermentação, o que permite uma melhor comparação entre elas. Nas primeiras 35 h houve um aumento da viabilidade das duas, ligeiramente semelhante. No entanto, depois das 48 h, a levedura do ensaio apresentou um aumento da viabilidade, enquanto que a do controlo caiu. Após 130 h, a viabilidade do ensaio já foi menor que a do controlo, mantendo-se menor até ao fim da fermentação.

A viabilidade da levedura nas fermentações controlo e do ensaio não parece seguir um parâmetro previsível, assim como não existe uma diferença relevante entre estas ao longo da fermentação. É apenas possível afirmar que a viabilidade da levedura parece ser máxima quando cessa o crescimento celular, diminuindo depois devidos aos vários fatores de *stress* a que esta fica sujeita. Desta forma, o ensaio não parece ter um efeito negativo nem positivo, pois não provoca a morte das leveduras nem melhora as suas viabilidades, podendo, portanto, ser aplicado a nível industrial caso se encontrem melhorias no diacetilo. Esta análise vem apenas salientar que a levedura, como organismo vivo, tem um comportamento pouco previsível, o que explica as grandes variações que se observam, nomeadamente no diacetilo, em fermentações que, aparentemente, possuem condições e mostos semelhantes. É ainda interessante estudar a evolução da viabilidade registada nas leveduras que foram recolhidas, em comparação com a viabilidade da levedura inoculada para se estudar se se recolheram leveduras com viabilidades que não foram comprometidas como consequência das alterações realizadas para o ensaio. Estes dados encontram-se apresentados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Viabilidades da levedura inoculada, viabilidades da levedura após fermentação, diferença entre as duas viabilidades e média da diferença para os vários controlos e ensaios analisados (Ensaio de redução do pH)

Fermentação	Viabilidade da levedura inoculada (%)	Viabilidade da levedura após fermentação (%)	Diferença (%)	Média (%)
Controlo 1	95,1	95,6	0,5	3,5
Controlo 2	88,7	95,1	6,4	
Ensaio 1	96,3	-	-	-
Ensaio 2	88,7	91,9	3,2	

A Tabela 5.13 apresenta as viabilidades das leveduras inoculadas nos vários controlos e ensaios e a viabilidade das leveduras recolhidas dessas mesmas fermentações. A diferença entre essas viabilidades permitiu observar se ocorreu uma melhoria na viabilidade da levedura pelo efeito da fermentação. Foi possível ainda calcular uma média do aumento da viabilidade para os controlos. A levedura recolhida do ensaio 1 não foi analisada, o que não permitiu observar o efeito da fermentação na viabilidade desta levedura.

Para as fermentações controlo, observou-se uma melhoria média na viabilidade de 3,5%. Já no ensaio 2, essa melhoria foi de 3,2%, ou seja, o ensaio não só não provocou a morte das células da levedura, como ainda fez melhorar a viabilidade das mesmas. É também de salientar que as melhores melhorias foram observadas em fermentações cuja viabilidade antes da inoculação era baixa. A levedura do controlo 2 e ensaios 2 foi a mesma; a melhoria observada na viabilidade foi, no entanto, melhor no controlo 2, o que pode sugerir que as condições de maior

pH do mosto têm um melhor efeito na viabilidade da levedura, pois sujeitam a levedura a um menor *stress* protónico.

5.3.2.6 Evolução do diacetilo e do α -acetolactato

Após a análise dos diferentes parâmetros ao longo das fermentações foi possível observar que a redução do pH do mosto em 0,2 permitiu acelerar a velocidade de fermentação, mas que não implicou necessariamente uma maior multiplicação celular. Desta forma, é interessante estudar o efeito desta mesma redução na formação do diacetilo. Para tal, mais uma vez foram estudadas duas amostras (com e sem aquecimento) para cada fermentação de forma a se obter a concentração de diacetilo total (diacetilo + α -acetolactato), diacetilo livre e α -acetolactato em solução.

Na Figura 5.31 encontra-se representada a evolução da concentração destes compostos ao longo das fermentações dos ensaios e dos controlos.

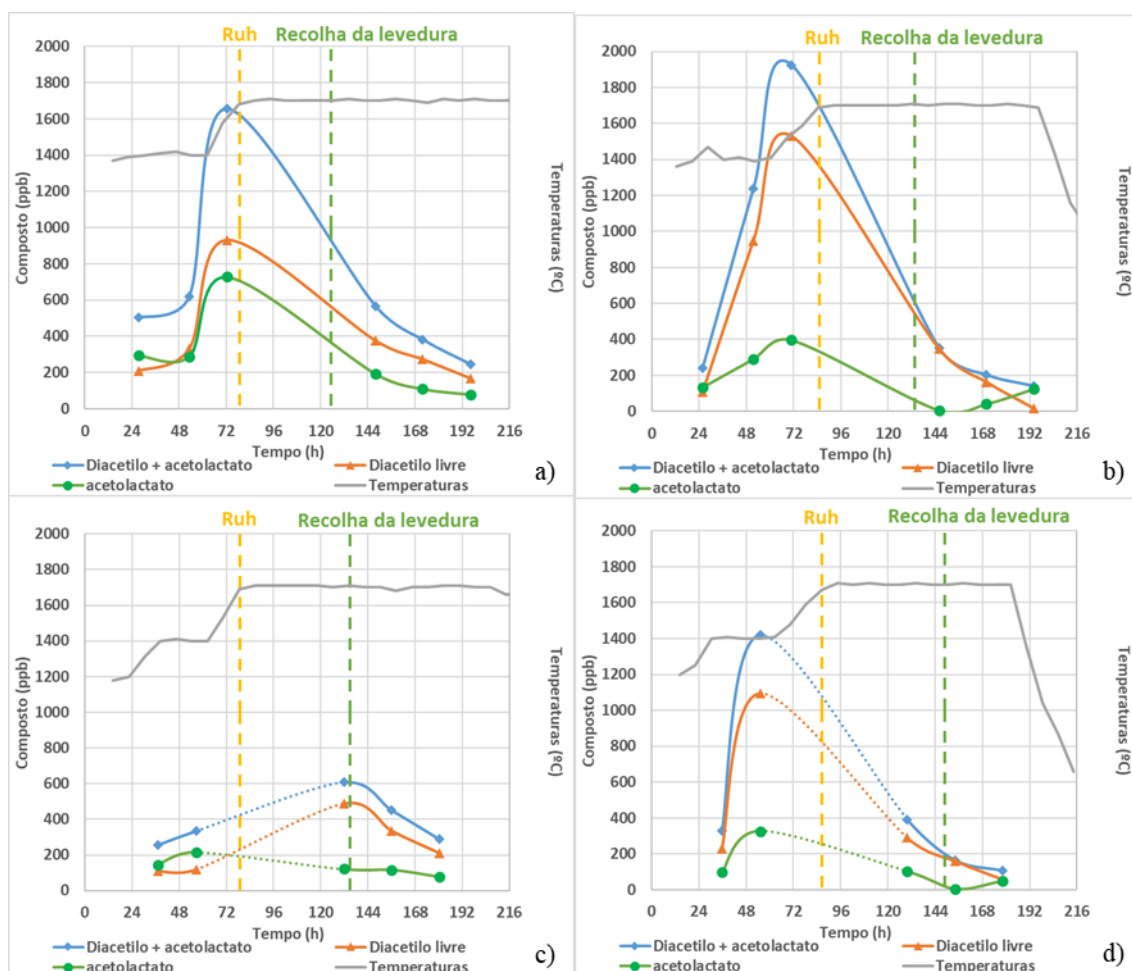


Figura 5.41 - Evolução da temperatura (°C) e da concentração (ppb) de diacetilo total (diacetilo + α -acetolactato), diacetilo livre e α -acetolactato ao longo das fermentações do: **a)** controlo 1; **b)** ensaio 1; **c)** controlo 2; **d)** ensaio 2

Na Figura 5.31-a) está representada a evolução da concentração do diacetilo total (ppb), diacetilo livre (ppb) e α -acetolactato (ppb) ao longo da fermentação do controlo 1. Quanto ao

diacetilo total, nas primeiras 24 h já se observavam grandes quantidades do composto, subindo pouco nas 24 h seguintes. Após 72 h de fermentação obteve-se o pico do diacetilo, que atingiu cerca de 1650 ppb. A concentração foi descendo nos dias seguintes, atingindo os 600 ppb, diminuindo depois mais lentamente com o tempo. Quanto ao diacetilo livre, este seguiu o mesmo padrão que o diacetilo total; note-se que mais uma vez se apresentaram grandes concentrações de diacetilo livre nas amostras, ou como consequência da dificuldade da levedura em o consumir, ou como consequência da metodologia escolhida para analisar a sua concentração. O α -acetolactato também apresentou uma curva semelhante apesar de com concentrações menores que as de diacetilo livre, exceto às 24 h de fermentação.

Na Figura 5.31-c) está representada a evolução dos mesmos compostos para o controlo 2. O diacetilo total, apesar de ter uma concentração de cerca de 250 ppb ao fim de 24 h, sofreu apenas um ligeiro aumento nas 24 h seguintes. Quando se voltou a ter dados para esta fermentação, ao fim de 130 h de fermentação, o diacetilo encontrava-se numa concentração de 600 ppb. Nos dias seguintes, a concentração de diacetilo foi descendo, cada vez mais lentamente. Apesar do diacetilo livre ter apresentado uma curva semelhante (mas mais baixa) à do diacetilo total, a concentração máxima de α -acetolactato foi detetada após as 48 h, sendo que ao fim das 130 h de fermentação este valor já é muito baixo, sugerindo que as temperaturas do *Ruh* levaram a uma grande redução deste composto a diacetilo e que a redução do diacetilo está apenas dependente da levedura.

Na Figura 5.31-b) está representada a evolução dos mesmos compostos para o ensaio 1. Após uma concentração de diacetilo total próxima dos 250 ppb (às 24 h), a concentração de diacetilo subiu bastante nas horas seguintes, atingindo o seu pico ao fim de 72 h de fermentação, no momento em que a temperatura já se encontrava a subir para o *Ruh*. Quando se voltou a ter resultados, após 144 h de fermentação, já a quantidade de diacetilo se tinha reduzido bastante, para cerca de 350 ppb. A redução nos dias seguintes foi cada vez mais lenta. A curva do diacetilo livre apresentou um comportamento semelhante à do diacetilo total. Por outro lado, o α -acetolactato foi subindo mais linearmente nas primeiras 72 h. Após 144 h quase não se observou este composto no mosto, observando-se este composto de novo nos dias seguintes. O facto disto ter acontecido confirma que o método escolhido para detetar este composto não foi o melhor e que a interpretação deste parâmetro nas fermentações pode ser falacioso, uma vez que, se não se detetar este composto numa amostra, não é de esperar que ele seja detetado nas amostras seguintes.

Na Figura 5.31-d) está representada a evolução dos mesmos compostos para o ensaio 2. Por volta das 35 h de fermentação, foi detetada uma concentração total de diacetilo de cerca de 300 ppb. A concentração deste composto disparou nas horas seguintes, obtendo-se uma concentração máxima de 1400 ppb depois das 48 h de fermentação. Ao fim de 130 h de fermentação, o diacetilo total já tinha caído para cerca de 400 ppb, continuando a concentração a

baixar nos dias seguintes, cada vez mais lentamente. Quanto ao diacetilo livre, este segue um comportamento semelhante ao diacetilo total. Quanto ao α -acetolactato, apesar de apresentar um pico ao mesmo tempo que os diacetilos total e livre, volta-se a registar um momento em que a concentração deste composto é quase nula (após 150 h), seguida de um aumento, o que volta a pôr em causa a eficácia do método. Nas várias amostras, o α -acetolactato pode ter sido convertido a diacetilo (e conseqüentemente quantificado como diacetilo livre) por ter descarboxilado durante a preparação da amostra e até à sua leitura, uma vez que esteve em contacto com oxigénio, foi mantida a pH ácido e foi sujeita a altas temperaturas de termostatização, da linha de transferência e da agulha de injeção no cromatógrafo (Landaud *et al.*, 1998).

Neste ensaio, a comparação entre os controlos e os ensaios parece mais óbvia. Nos controlos, apesar de ter sido detetado algum diacetilo após 24 h de fermentação, a sua concentração não subiu nas 24 h seguintes. Apenas entre as 48 h e 72 h se observou um grande aumento na concentração de diacetilo total. Por volta da altura em que se recolheu a levedura, a concentração de diacetilo ainda era elevada, sendo cada vez mais lenta com o decorrer dos dias. Esta redução cada vez mais lenta pode estar associada a uma redução da atividade do diacetilo redutase devido à grande percentagem de álcool e a alterações no transporte do diacetilo pela membrana (Tolls *et al.*, 1970; Boulton & Box, 2008). O facto de não haver um aumento expressivo do diacetilo em ambas as fermentações do controlo entre as 24 e 48 h parece sugerir a existência de um duplo pico do diacetilo. Os duplos picos do diacetilo estão associados a baixos FAN e ocorrem pelo facto de não haver valina suficiente no meio que permita o correto desenvolvimento da levedura; o primeiro pico ocorre durante ao *uptake* dos aminoácidos do Grupo A e o segundo após o esgotamento da valina do meio (Boulton & Quain, 2001; Petersen *et al.*, 2004). Desta forma, entre as 48 h e as 72 h, momento em que se observou a maior queda no FAN, seria o momento em que a valina estava a ser consumida, até se esgotar e ser necessário produzir mais diacetilo pela levedura. Esta hipótese poderia ser verdade uma vez que a média de FAN detetada em 2019 esteve baixa, próxima do limite mínimo para este parâmetro. No entanto, os dados obtidos para o ensaio da redução da temperatura de fermentação não sugerem a existência de um duplo pico. Analisando os dois ensaios, já é possível observar um grande aumento nas concentrações de diacetilo nas primeiras 72 h, atingindo-se picos superiores aos do controlo. No entanto, após 144 h de fermentação, a concentração de diacetilo nos ensaios é muito menor que nos controlos. Tendo em conta os dados obtidos para os outros parâmetros, parece seguro afirmar que a redução do pH do mosto levou à ocorrência de uma fermentação mais rápida e, como consequência, isso refletiu-se no diacetilo: não só o pico deste composto foi mais cedo, como foi maior. No entanto, o facto de se ter atingido um pico mais cedo, quando ainda havia muitas leveduras em suspensão que se encontravam bastante ativas, levou a que a redução do diacetilo também fosse mais rápida. O facto de se observar uma redução mais rápida do diacetilo nos ensaios que nos controlos volta a sugerir que a velocidade de conversão do α -acetolactato em

diacetilo não é o único fator que pesa na redução do diacetilo, mas que a velocidade de redução do composto pela levedura também é muito importante.

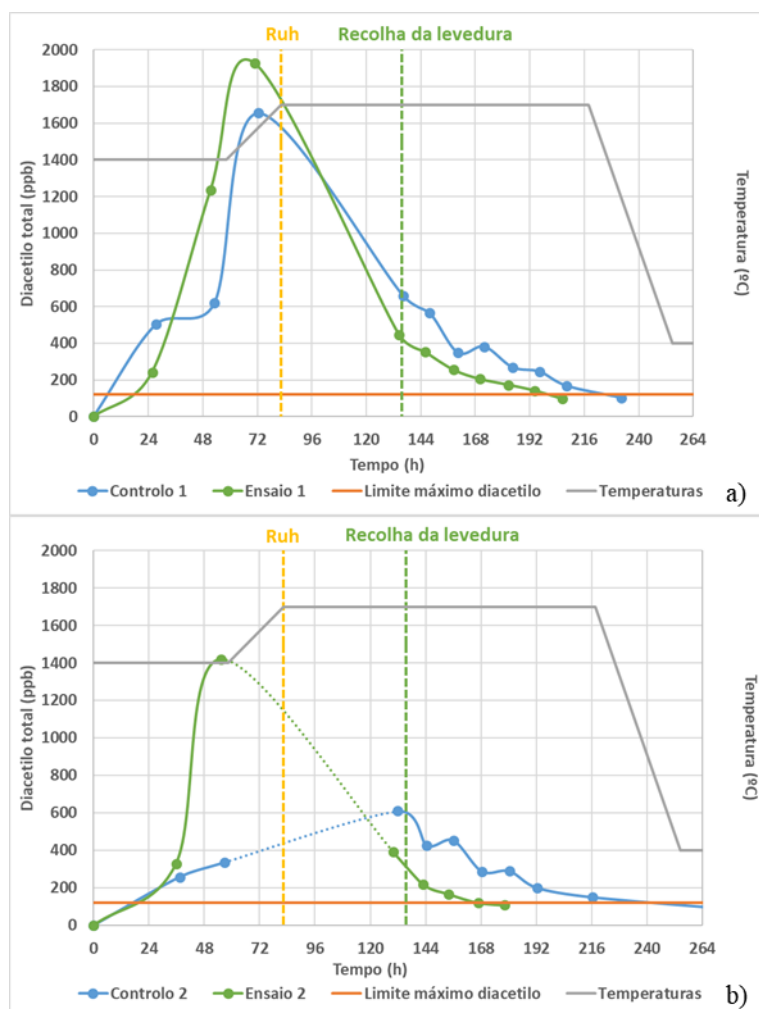


Figura 5.42 – Comparação entre as curvas de diacetilo total (ppb) e o momento em que atinge o limite máximo de 120 ppb de diacetilo, assim como a evolução da temperatura (°C), nas fermentações dos: **a)** controlo 1 e ensaio 1; **b)** controlo 2 e ensaio 2

Na Figura 5.42 foram agrupadas as curvas de diacetilo total, ao longo da fermentação, do controlo 1 com o ensaio 1 e do controlo 2 com o ensaio 2. Desta forma foi possível realizar uma comparação eficiente entre os ensaios e os controlos, permitindo retirar conclusões quanto o efeito da redução do pH no diacetilo. Na Tabela 5.14 estão apresentados os tempos de fermentação aos quais os ensaios e os controlos atingiram o limite máximo de 120 ppb para o diacetilo, a melhoria, em horas, que se obteve pela realização de cada ensaio em comparação com o controlo e a melhoria média, em horas, que a redução do pH do mostro traria ao tempo de fermentação.

Na Figura 5.42-a) foram comparadas as fermentações controlo 1 e ensaio 1. Apesar de após 24 h o ensaio apresentar menores valores de diacetilo que o controlo, nas horas seguintes o crescimento deste composto em solução foi muito maior no ensaio, atingindo-se um pico mais alto, após 72 h, no ensaio que no controlo. A ausência de dados para as 24 h seguintes não permite concluir se as concentrações de diacetilo continuaram a subir ou se iniciaram uma queda. No

Tabela 5.14 – Tempos de fermentação (h) ao qual as fermentações atingiram o limite máximo de 120 ppb de diacetilo, melhoria (h) observada entre os ensaios e os controles, e melhoria média (h) que se obteve no tempo de fermentação entre os ensaios e os controles.

Fermentação	Atingimento dos 120 ppb (h)	Melhoria (h)	Melhoria média (h)
Ensaio 1	199,96	25,91	51,92
Controlo 1	225,87		
Ensaio 2	166,80	77,92	
Controlo 2	244,72		

entanto, após 130 h de fermentação, o ensaio apresentou uma concentração de diacetilo menor que o controlo, apesar de o ensaio ter, aparentemente, apresentado um maior pico. A diferença entre as concentrações de diacetilo manteve-se até ao final das fermentações, sendo que o ensaio atingiu mais rapidamente o limite máximo de 120 ppb de diacetilo, sendo a sua fermentação terminada mais cedo que a do controlo. Assim é sugerido que, apesar do pico do diacetilo ter sido maior no ensaio, a sua redução também foi mais rápida nas primeiras horas do *Ruh*. Segundo a Tabela 5.14 observou-se uma melhoria de 25,91 h no tempo de fermentação quando esta é realizada nas condições do ensaio.

Na Figura 5.42-b) foi realizada a mesma comparação para o controlo 2 e ensaio 2. Após 35 h de fermentação, a concentração de diacetilo foi apenas ligeiramente superior no ensaio em comparação com o controlo. No entanto, depois das 48 h de fermentação, a concentração de diacetilo do ensaio disparou, enquanto a do controlo subiu apenas muito ligeiramente. Os dados obtidos não permitiram estudar a intensidade do pico do diacetilo ou o momento da sua ocorrência, sugerindo apenas que o do ensaio foi mais cedo, uma vez que a subida no diacetilo se efetuou mais cedo. Quando se voltou a ter valores de diacetilo, ao fim de 130 h de fermentação, a concentração de diacetilo foi mais uma vez superior no controlo em relação ao ensaio, uma vez que a redução do diacetilo no ensaio terá começado também mais cedo. O ensaio atingiu assim os 120 ppb de diacetilo muito mais depressa que o controlo. A Tabela 5.14 reportou, assim, uma melhoria de 77,92 h entre o controlo 2 e ensaio 2, sendo favorável que se apliquem as condições do ensaio.

Com base nestes resultados, foi possível reportar uma redução média no tempo de fermentação de 51,92 h quando se reduz o pH do mosto em 0,2, uma melhoria média de mais de dois dias. Esta diminuição do diacetilo parece dever-se a uma aceleração da fermentação, atingindo-se o pico do diacetilo mais cedo e num momento em que não só se observa uma grande quantidade de levedura em suspensão, como esta está muito ativa para realizar a redução do diacetilo e pouco afetada pelos efeitos das altas temperaturas de *Ruh*. Apesar do método de deteção do α -acetolactato em relação ao diacetilo total ter sido posto em causa quanto à sua pouca fiabilidade, mais uma vez os resultados parecem sugerir que a velocidade de descarboxilação deste composto durante o *Ruh* não é o único fator que pesa na redução do diacetilo, mas que a redução do diacetilo pela levedura tem muita importância.

No geral, tanto para o primeiro, como para o segundo ensaio, os resultados parecem sugerir que a velocidade de descarboxilação do diacetilo durante o *Ruh* não é o único fator que pesa na redução do diacetilo, mas que a redução do diacetilo pela levedura tem muita importância. Isto justifica-se, pois apesar dos ensaios apresentarem um maior pico de diacetilo, ao fim de vários dias de fermentação, o diacetilo apresenta menores concentrações nos ensaios. Se a taxa de conversão do α -acetolactato fosse o único fator importante, seria de esperar que maiores picos também demorassem mais tempo a baixar a sua concentração e não o contrário, visto que à temperatura de *Ruh* que tanto os ensaios como os controlos são sujeitos, a velocidade de conversão será semelhante. Assim, sugere-se que o facto de se atingir o pico máximo do diacetilo mais cedo leva a uma redução também maior deste composto pela levedura, numa altura em que esta está bastante ativa. Se explorarmos a curva da percentagem de redução média diária do diacetilo (5.1.12) e a extrapolarmos para os dias anteriores ao 7º dia, é natural que, quanto mais cedo se iniciar a redução do diacetilo, maior percentagem deste composto vai ser reduzido pela levedura nessa altura.

5.3.2.7 Evolução da concentração de 2,3-pentanodiona

Também neste ensaio foi estudada a curva da 2,3-pentanodiona ao longo da fermentação, como forma de garantir que esta não representa um problema para a qualidade organolética da cerveja, uma vez que o seu limiar de deteção é de 1 ppm (Krogerus & Gibson, 2013a).

Na Figura 5.43 estão representadas as comparações entre os ensaios e os controlos, tal como feito para o diacetilo na Figura 5.42. As curvas da 2,3-pentanodiona seguiram padrões muito semelhantes aos do diacetilo, sendo apenas de observar que as concentrações de 2,3-pentanodiona foram sempre muito mais baixas. É de notar que este composto foi aumentando a sua concentração ao mesmo tempo que a do diacetilo, não se observando, no entanto, um duplo pico. Os picos deste composto coincidiram com os do diacetilo, sendo que, nos ensaios, estes foram atingidos também mais cedo. Por outro lado, no final da fermentação, a concentração de 2,3-pentanodiona também foi sempre mais reduzida nos ensaios que nos controlos. É também de salientar que apenas no ensaio/controlo 1 se observaram concentrações de 2,3-pentanodiona acima do limiar de deteção (para os ensaio/controlo 2 não houve dados suficientes), sendo que que apenas foram ultrapassadas entre, sensivelmente, as 35 h e as 110 h, ou seja, muito antes do fim da fermentação, o que comprova que este composto não representa um perigo à qualidade organolética do produto. As concentrações finais da 2,3-pentanodiona acabam também por ser bastante inferiores às do diacetilo.

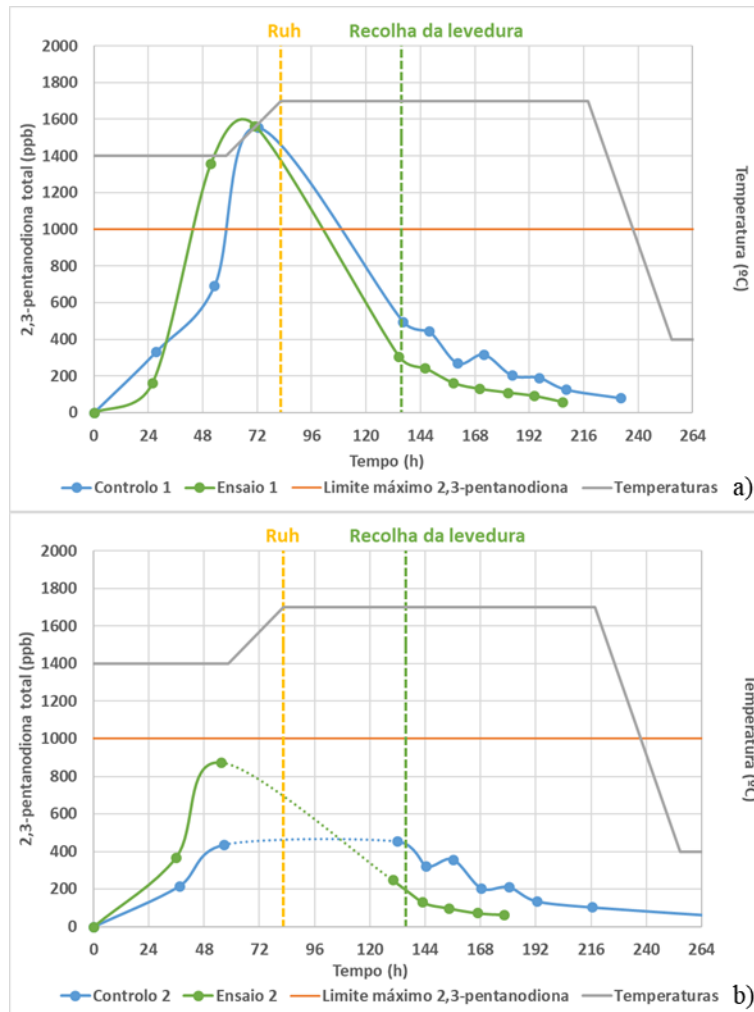


Figura 5.43 - Comparação entre as curvas de 2,3-pentanediona total (ppb) e o momento em que se atinge o limite máximo de 1000 ppb de 2,3-pentanediona, assim como a evolução da temperatura (°C), nas fermentações dos: **a)** controlo 1 e ensaio 1; **b)** controlo 2 e ensaio 2

5.3.2.8 Evolução da razão diacetilo/2,3-pentanediona

Mais uma vez, foi estudada a relação diacetilo/2,3-pentanediona como forma de excluir a existência de potenciais contaminações bacterianas. Este estudo permitiu também estimar o intervalo de valores em que a razão destes compostos se costuma situar de forma a que mais facilmente identifique ou exclua a hipótese de contaminação bacteriana. Na Figura 5.44 encontram-se compiladas as médias das razões diacetilo/2,3-pentanediona, ao longo da fermentação, para os controlos e para os ensaios.

Na Figura 5.44 pode-se observar que as médias da razão diacetilo/2,3-pentanediona dos ensaios se situou entre o intervalo de perto de 1,1 e 1,6. Por outro lado, as médias da mesma razão no controlo situaram-se entre, aproximadamente, os 0,8 e os 1,7. Desta forma, voltou-se a observar que a concentração de diacetilo é quase sempre superior à da 2,3-pentanediona. A proporção do diacetilo em relação à 2,3-pentanediona vai aumentando ao longo da fermentação,

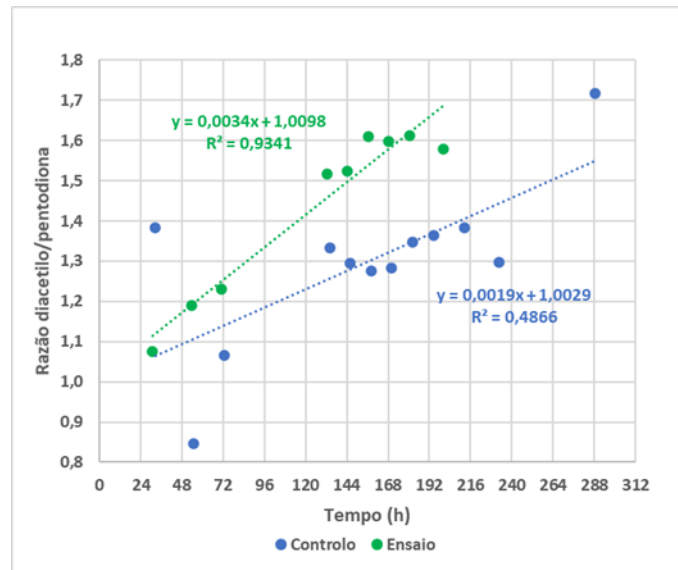


Figura 5.44 - Evolução das médias das razões diacetilo/2,3-pentanodiona ao longo do tempo de fermentação nos controlos e ensaios

uma vez que a razão entre estes compostos vai crescendo. Observou-se também uma relação linear entre a razão e o tempo, sendo de esperar um maior aumento da razão ao longo do tempo no ensaio que no controlo.

5.3.3 Validação dos ensaios

Apesar dos ensaios terem, aparentemente, apresentado melhorias no tempo de fermentação em relação aos controlos, foi necessário validar estes resultados. Para tal, realizou-se um controlo organolético das cervejas provenientes dos ensaios para identificar possíveis alterações no aroma e sabor da cerveja que pudessem estar associados aos parâmetros alterados nos ensaios. Por outro lado, foi realizado um ensaio industrial, em que três fermentadores foram sujeitos às mesmas condições do primeiro ensaio (redução da temperatura de fermentação), sendo estes comparados com três fermentações controlo.

5.3.3.1 Teste sensorial

Para a validação do primeiro ensaio, foi realizado um teste triangular. Este teste é um teste discriminativo em que o objetivo é a deteção das diferenças sensoriais que possam existir entre produtos. Ao painel de provadores são distribuídas três amostras, marcadas apenas com um código de dígitos, sendo duas delas de produtos iguais e uma de um produto diferente. O provador deve então descrever as diferenças que percebe entre as amostras e selecionar uma delas como diferente. Existe, no entanto, um terço de probabilidade do provador acertar na amostra, pelo que se deve consultar uma tabela de significância para a validação do teste (Sinkinson, 2017).

Para detetar se as fermentações resultantes do primeiro ensaio apresentavam diferenças significativas, foram apresentadas, a três provadores peritos, três amostras de cerveja em guarda. O Padrão 1 e o Padrão 2 foram provenientes de tanques de guarda, selecionados aleatoriamente,

cujas fermentações tinham decorrido de acordo com os parâmetros normais. Já a terceira amostra, o Ensaio, foi proveniente de um tanque de guarda que tinha sido enchido com a cerveja proveniente de um dos fermentadores que tinha tido a sua temperatura de fermentação reduzida em 1° C. Dois dos provadores identificaram o Padrão 2 como amostra diferente, salientando que esta apresentava um maior amargor. Já um terceiro provador identificou o Ensaio corretamente, salientando o sabor a levedura e a DMS nesta amostra. Foi determinado, assim, que não houve diferenças significativas entre o ensaio e os padrões, pelo que se validou, em termos organoléticos, o ensaio da redução da temperatura de fermentação.

De forma a se validar o segundo ensaio, realizou-se um teste de diferença do controlo, com discussão de grupo. Para este teste, pede-se ao painel de provadores que identifique o grau de diferença entre uma ou mais amostras em estudo em relação a uma amostra controlo, previamente identificada (Whelan, 2017).

Assim, para se identificar se as fermentações do segundo ensaio apresentavam diferenças significativas, foi apresentada uma amostra de cerveja em guarda proveniente de um fermentador cujo pH do mosto foi reduzido em 0,2 e foi pedido a quatro provadores peritos que comparassem esta amostra com um controlo/padrão proveniente de outro tanque de guarda selecionado aleatoriamente. Apenas um dos provadores detetou diferenças entre o ensaio e o controlo, justificando que o ensaio apresentou menos corpo e um palato mais seco. Desta forma, considerou-se que não foram detetadas diferenças significativas entre a amostra e o padrão, sendo o ensaio de redução do pH do mosto validado do ponto de vista organolético.

Os dois testes organoléticos realizados não detetaram diferenças significativas entre o produto dos ensaios e o produto de fermentações padrão. Desta forma, ambos foram validados do ponto de vista organolético, podendo as alterações ser reproduzidas sem alteração da qualidade do produto.

5.3.3.2 Ensaios industriais

Apesar de aprovado do ponto de vista organolético, o primeiro ensaio, em que foi detetada uma melhoria média de 18,44 h no tempo de fermentação quando se reduziu a temperatura de fermentação em 1° C, foi reproduzido de novo a nível industrial. Desta forma, procurou-se observar se as melhorias previstas pela comparação do ensaio com o controlo ocorriam de facto. Para tal, três fermentadores foram sujeitados a uma redução da temperatura de fermentação e os resultados do diacetilo o 7º dia foram comparados com os resultados obtidos, para esse parâmetro, em quatro fermentações controlo (duas iniciadas antes e duas depois).

Ao fim de 7 dias de fermentação, os três fermentadores apresentaram uma concentração média de diacetilo de 250,66 ppb. Dois dos fermentadores só atingiram o limite máximo de diacetilo ao fim de 9 dias de fermentação, enquanto que o terceiro o atingiu ao fim de 8 dias de fermentação. No entanto, ao fim de 7 dias de fermentação, os quatro fermentadores controlo

apresentaram uma média de diacetilo de 150,75 ppb, tendo os quatro atingido o limite máximo de diacetilo ao fim de 8 dias de fermentação. Desta forma, considerou-se o ensaio como inválido, uma vez que apresentou um diacetilo médio, ao fim de 7 dias, superior, assim como atrasou aproximadamente a fermentação em um dia, em relação aos controlos.

O segundo ensaio, que permitiu uma melhoria 51,92 h no tempo de fermentação, também foi aprovado do ponto de vista organoléptico. Desta forma, a redução de 0,2 ao pH do mosto foi imediatamente realizada após o ensaio, também como forma de manter este parâmetro dentro do intervalo pretendido. No entanto, não foi possível fazer uma comparação correta entre as fermentações que tiveram uma redução no pH e as que não tiveram, uma vez que esta mudança ocorreu num momento em que vários parâmetros do fabrico e fermentação foram alterados, não sendo o pH o único fator a ter influência no diacetilo.

6 Conclusões

O diacetilo é um composto com *flavour* a manteiga, que se tem revelado como um problema durante a produção de cerveja na SCC. O presente estudo pretendeu não só identificar os fatores com influência na formação e degradação de diacetilo, como também sugerir possíveis melhorias no fabrico de forma a se obterem resultados satisfatórios quanto a este composto. Pretendeu-se também desenvolver um método de previsão da evolução do diacetilo ao longo do tempo.

Com base no histórico da empresa, foi possível constatar que o diacetilo estava presente em concentrações superiores às pretendidas nas fermentações, guardas e produtos final de Sagres Branca e Sagres Preta. Vários fatores foram analisados de forma a se identificarem possíveis causas. Comprovou-se que quanto maior a concentração de diacetilo, maior terá de ser o tempo de fermentação e de *Ruh*. Por outro lado, o tempo de permanência da levedura, a taxa de inoculação e viabilidade da mesma e o arejamento do mosto não se revelaram como importantes para este composto, contrariando os pressupostos da literatura. Quando analisados os vários fermentadores, identificou-se que, apesar da taxa de multiplicação da levedura ser semelhante, alguns fermentadores pareciam apresentar maiores formações de diacetilo. Quando analisadas as gerações da levedura, identificou-se que as leveduras que já tinham realizado um maior número de fermentações, levaram a fermentações com menor formação de diacetilo e uma redução no tempo de fermentação, apesar de sofrerem uma queda na viabilidade. A análise dos parâmetros de fabrico do mosto também permitiu identificar o pH e o FAN como possíveis fontes deste problema, sendo que se encontrou uma correlação entre o pH e o diacetilo em guarda e em produto final. Apesar de se terem identificado fatores com influência no diacetilo em Sagres Branca, a baixa quantidade de dados para Sagres Preta não permitiu retirar algumas das mesmas conclusões.

Através da estimativa das percentagens de redução do diacetilo, foi possível desenvolver um método que, com base na concentração de diacetilo ao 7º dia, permite prever o dia em que se atinge o limite máximo de diacetilo para o tipo de cerveja em causa, possibilitando um melhor planeamento da produção. Observou-se também que a capacidade de redução do diacetilo do meio pela levedura vai sendo cada vez mais lenta ao longo do tempo.

Foi também possível estudar o efeito da redução da temperatura de fermentação em 1º C em vários parâmetros ao longo da fermentação de Sagres Branca, como o extrato aparente, percentagem de álcool, FAN, população e viabilidade da levedura, formação e redução do diacetilo e 2,3-pentanodiona e a razão entre o diacetilo e a 2,3-pentanodiona. Os resultados obtidos, quando comparados com fermentações controlo, permitiram observar que a redução na temperatura de fermentação levou ao atingimento do pico do diacetilo mais cedo, pico este que também foi mais alto; a velocidade de fermentação também foi maior. No entanto, ao fim de vários dias, as concentrações de diacetilo no ensaio foram menores, atingindo-se o limite máximo de diacetilo mais cedo, em relação ao controlo, o que representou uma melhoria de 18,44 h no

tempo de fermentação. Contudo, apesar do ensaio ter sido validado do ponto de vista sensorial, quando aplicado a novas fermentações, observou-se o efeito inverso, ou seja, um aumento no tempo de fermentação, pelo que se considerou que a redução da temperatura de fermentação não trouxe benefícios do ponto de vista do diacetilo.

Outro ensaio foi realizado em que se estudou a influência da redução de 0,2 no pH do mosto de Sagres Branca, sendo analisados os mesmos parâmetros ao longo da fermentação. A redução do pH teve o efeito de aumentar a velocidade da fermentação, com consumo mais rápido dos açúcares e do FAN, atingindo-se um pico do diacetilo mais cedo e mais intenso. No entanto, mais uma vez, a redução deste composto também foi mais rápida, traduzindo-se numa redução de 51,92 h ao tempo total de fermentação. Este ensaio foi validado do ponto de vista sensorial.

Tendo em conta os dados e os ensaios feitos, os objetivos deste trabalho foram atingidos com sucesso. Foi possível identificar os fatores com influência no diacetilo, prever a curva do mesmo e ainda realizar alterações que permitiram reduzir o tempo de fermentação, representando menos gastos energéticos para empresa e disponibilizando os fermentadores mais rapidamente, sem comprometer a qualidade do produto. A redução do pH do mosto, assim como a estimativa da curva de diacetilo podem, então, ser considerados como contributos efetivos à SCC, como consequência da realização desta dissertação.

Os dados obtidos durante os ensaios sugeriram que a utilização de condições que aceleram a fermentação, apesar de levarem a um maior pico de diacetilo, levam também a uma redução muito mais rápida deste composto, uma vez que a levedura o começa a reduzir também mais cedo, quando ainda está mais ativa. Desta forma, sugere-se como estudo futuro o de analisar o efeito do aumento da temperatura de fermentação. O FAN também apresentou concentrações baixas no histórico da Sagres Branca, sendo uma possível causa da grande formação de diacetilo por poder levar ao aparecimento de dois picos de diacetilo. Desta forma, surge também como possível ensaio o de alterar a percentagem de adjuntos na receita ou de aumentar o tempo da pausa proteolítica de forma a se obter uma maior concentração de FAN e a se analisar se esse aumento se traduz numa melhoria no diacetilo.

Bibliografia

- Alcohol.org (2020) *Types of Beer Styles* publicado em 30 de março de 2020. <https://www.alcohol.org/statistics-information/beer-styles/> consultado em 20 de maio de 2020.
- Anders, M. W. (2017) Diacetyl and related flavorant α -Diketones: Biotransformation, cellular interactions, and respiratory-tract toxicity. *Toxicology*, 388, pp. 21–29.
- Anger, H. M., Schildbach, S., Harms, D. & Pankoke, K. (2009) Analysis and Quality Control. In: H. M. Eßlinger (ed), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Market*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, pp. 437-465.
- ASBC (2009) Determination of Real Extract Using the Alcozyzer Method, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 67(4), pp. 264-267.
- Bamforth, C. W., & Kanauchi, M. (2004) Enzymology of Vicinal Diketone Reduction in Brewer's Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 110(2), pp. 83–93.
- Barth, R. (2013) *The Chemistry of Beer: The Science in the Suds*. 1st Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, Estados Unidos da América, pp. 1-215.
- BCOJ Collaborators (2019) Alcohol Concentration Analysis in Yeast Slurries and Samples During Fermentation by Alcozyzer: Report of 2017–2018 BCOJ Collaborative Work, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77(1), pp. 71-75.
- Boulton, C. & Quain, D. (2001) *Brewing Yeast and Fermentation*. 1st Ed., Blackwell Science Ltd, Oxford, Reino Unido, pp. 1-584.
- Boulton, C. A. (2020) Chapter 4 – Fermentation. In: Chris Smart (ed), *The Craft Brewing Handbook: A Practical Guide to Running a Successful Craft Brewery*, Woodhead Publishing, Duxford, Reino Unido, pp. 111-152.
- Boulton, C., & Box, W. (2008) Formation and Disappearance of Diacetyl During Lager Fermentation. In: Katherine Smart (ed), *Brewing Yeast Fermentation Performance*. 2nd Ed., Blackwell Science, Oxford, Reino Unido, pp. 181–195.
- Branen, A. L., & Keenan, T. W. (1972) Biosynthesis of α -acetolactate and its conversion to diacetyl and acetoin in cell-free extracts of *Lactobacillus casei*. *Canadian Journal of Microbiology*, 18(4), pp. 479–485.
- Brányik, T., Vicente, A.A., Dostálek, P. & Teixeira, J.A. (2008) A Review of Flavour Formation in Continuous Beer Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 114, pp. 3-13.
- Brewers Association (2020) *2020 CraftBeer.com Beer Styles Guide*. <http://www.craftbeer.com/beer-styles-guide>, consultado em 20 de maio de 2020.
- Cabras, I. & Higgins, D. M. (2016) Beer, brewing, and business history. *Business History*, 58(5), pp. 609-624.
- Carpentier, B., van Haecht, J. L., & Dufour, J. P. (1991) Influence of the trub content of the pitching wort on yeast by-products synthesis. In: *Proceeding of the 3rd Scientific and Technical Convention*, The Institute of Brewing, Central and Southern African Section, pp. 144-149.
- Charlton, P. & Vriesekoop, F. (2018) Brewery By-Products. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, p. 528.
- ChemoMetech (2005) Total cell count and viability of yeast in beer samples using the NucleoCounter® YC-100™ System. *NucleoCounter® YC-100™ Application note No. 302. Rev. 1.0*, pp. 1-11.
- Choi, E. J., Ahn, H. W., & Kim, W. J. (2015) Effect of α -acetolactate decarboxylase on diacetyl content of beer. *Food Science and Biotechnology*, 24(4), pp. 1373–1380.
- Clark, S., & Winter, C. K. (2015) Diacetyl in Foods: A Review of Safety and Sensory Characteristics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), pp. 634–643.
- Coghe, S., D'Hollander, H., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2005) Impact of Dark Specialty Malts on Extract Composition and Wort Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(1), pp. 51–60.
- Conway, J. (2019a) *Beer production worldwide from 1998 to 2018*. Statista. <https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/> consultado em 25 de junho de 2020.

Conway, J. (2019b) *Sales of the leading beer companies worldwide 2019*. Statista. <https://www.statista.com/statistics/257670/sales-of-the-leading-beer-companies-worldwide/> consultado em 25 de junho de 2020.

Cruz, M. (2020) *Coronavirus Boosts Innovation in the Beer Industry*. EHL Group, Lausanne, Suíça. <https://hospitalityinsights.ehl.edu/covid-19-beer-industry> consultado em 26 de junho de 2020.

Cyr, N., Blanchette, M., Price, S. P., & Sheppard, J. D. (2007) Vicinal Diketone Production and Amino Acid Uptake by Two Active Dry Lager Yeasts during Beer Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 65(3), pp. 138–144.

de Medeiros, C. D. (2010) Efeito de variáveis de processo no tempo de fermentação da cerveja e na concentração de dicetonas vicinais totais (TVDK). Dissertação de Mestrado, UFRN, Natal, Brasil, pp. 1-53.

de Medeiros, C.D., de Medeiros, F.G.M., da Silva Pedrini, M.R. (2017) Effects of Process Variables on Fermentation Time and Vicinal Diketones Concentration for Beer Production. *Annals of Food Processing and Preservation*, 2(1), 1010.

de Revel, G. & Bertrand, A. (1994) Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identification of wine aldehydes. *Proc 7th Weurman Flavour Research Symp*, Zeist, June, pp 353-361.

Decreto-Lei n.º 306/2007 (2007) Decreto-Lei que estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, revendo o Decreto-Lei n.º 243/2001, de 5 de setembro, que transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 98/83/CE, do Conselho, de 3 de novembro. *Diário da República* n.º 164/2007, Série I, 27 de agosto de 2007, pp. 5747-5765.

Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B. & Verstrepen, K. J. (2017) Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 41, pp. 95-128.

Eaton, B. (2018) An Overview of Brewing. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, pp. 53-66.

Eumann, M. & Schaelberle, C. (2016) Water. In: C. W. Bamforth (ed), *Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence*, Elsevier Inc., London, Reino Unido, p. 104.

Eurostat (2020a) *Happy International Beer Day!*. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/EDN-20190802-1> consultado em 27 de outubro de 2020.

Eurostat (2020b) *Sold production, exports and imports by PRODCOM list (NACE Rev. 2) – annual data; 11051000 – Beer made from malt (excluding non-alcoholic beer, beer containing <= 0,5% by volume of alcohol, alcohol duty)*. <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do> consultado a 27 de outubro de 2020.

Eßlinger, H. M. (2009) Malting. In: H. M. Eßlinger (ed), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Market*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, pp. 207-215.

Felismino, E. (2018) *Quantos litros de cerveja bebem os portugueses por ano? E de vinho?* publicado na Revista Online Eco Sapo em 22 de agosto de 2018. <https://eco.sapo.pt/2018/08/22/quantos-litros-de-cerveja-bebem-os-portugueses-por-ano-e-de-vinho/> consultado em 25 de junho de 2020.

Ferreira, I. M. & Guido, L. F. (2018) Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review. *Fermentation*, 4, 23.

Furnari, C. (2020) *Brewers Share How Coronavirus Has Disrupted The Beer Business* publicado na Revista Forbes em 28 de abril de 2020. <https://www.forbes.com/sites/chrisfurnari/2020/04/28/brewers-share-how-coronavirus-has-disrupted-the-beer-business/#3e035fb376a5> consultado em 26 de junho de 2020.

Gajanan, M. (2018) *How to Talk About Beer Like a Pro* publicado na Revista Times em 7 de abril de 2018. <https://time.com/5218581/types-of-beer-guide/> consultado em 20 maio de 2020.

- Garcia, A., Garcia, L., & Diaz, M. (1994) Modelling of diacetyl production during beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 100, pp. 179–183.
- Gibson, B. R. (2011) 125th Anniversary Review: Improvement of Higher Gravity Brewery Fermentation via Wort Enrichment and Supplementation. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(3), pp. 268–284.
- Gibson, B., Vidgren, V., Peddinti, G., & Krogerus, K. (2018) Diacetyl control during brewery fermentation via adaptive laboratory engineering of the lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45(12), pp. 1103–1112.
- Goldiner, F., Klemann, H. & Kämpf, W. (1966) Sugar Table, Institut für Gärungsgewerbe, Berlin.
- Gomaa, A. M. (2016) Application of Enzymes in Brewing. *Journal of Nutrition and Food Science Forecast*, 1(1), 1002.
- Guido, L.F., Rodrigues, P.G., Rodrigues, J.A., Gonçalves, C.R., & Barros A.A. (2004) The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. *Food Chemistry*, 87(2), pp. 187–193.
- Hahn, G. J. (1973) The coefficient of determination exposed!. *Chemical Technology*, 3(10), pp. 609–612.
- Haukeli, A. D., & Lie, S. (1972) Production Of Diacetyl, 2-Acetylacetate And Acetoin By Yeasts During Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 78(3), pp. 229–232.
- Haukeli, A. D., & Lie, S. (1978) Conversion Of A-Acetylacetate And Removal Of Diacetyl A Kinetic Study. *Journal of the Institute of Brewing*, 84(2), pp. 85–89.
- Hill, A. E. & Stewart, G. G. (2019) Free Amino Nitrogen in Brewing. *Fermentation*, 5(1), 22.
- Howe, S. (2020) Chapter 1 – Raw Materials. In: Chris Smart (ed), *The Craft Brewing Handbook: A Practical Guide to Running a Successful Craft Brewery*, Woodhead Publishing, Duxford, Reino Unido, pp. 4–43.
- Hubbs, A. F., Kreiss, K., Cummings, K. J., Fluharty, K. L., O’Connell, R., Cole, A., Dodd, T. M., Clingerman, S. M., Flesher, J. R., Lee, R., Pagel, S., Battelli, L. A., Cumpston, A., Jackson, M., Kashon, M., Orandle, M. S., Fedan, J. S., Sriram, K. (2019). Flavorings-Related Lung Disease: A Brief Review and New Mechanistic Data. *Toxicologic Pathology*, 47(8), pp. 1012–1026.
- Hughes, P. S. & Baxter, E. D. (2001) *Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects*. 1st Edition, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido, pp. 1–52.
- Inoue, T., & Yamamoto, Y. (1969) Absence of diacetyl in fermenting wort. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 135, pp. 454–457.
- Inoue, T., & Yamamoto, Y. (1970) Diacetyl and Beer Fermentation. *Proceedings. Annual Meeting - American Society of Brewing Chemists*, 28(1), pp. 198–208.
- Inoue, T., Yamamoto, Y., Kokubo, E., & Kuroiwa, Y. (1973) Formation of Acetohydroxy Acids during Uptake of Amino Acids by Yeasts. *Proceedings. Annual Meeting - American Society of Brewing Chemists*, 31(1), pp. 36–39.
- Jones, M. & Pierce, J. S. (1964) Absorption of Amino Acids from Wort by Yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*, 70, pp. 307–315.
- Kaneda, H.; Kimura, T., Kano, Y., Koshino, S., Osawa, T., & Kawakishi, S. (1991) Role of fermentation conditions on flavor stability of beer. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72(1), pp. 26–30.
- Kirin (2019) *Global Beer Consumption by Country in 2018*. Kirin Beer University Report. https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2019/1224_01.html consultado em 25 de junho de 2020.
- Kissmeyer, A. B. & Oliver, G. (2020) *Fermentation Vessels*. <https://beerandbrewing.com/dictionary/YCCmYUmOuv/> consultado a 8 de novembro de 2020.
- Kreis, S. (2009) Malting. In: H. M. Eßlinger (ed), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Market*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, pp. 147–157.
- Krogerus, K. & Gibson, B. R. (2013a) 125th Anniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 119, pp. 86–97.

Krogerus, K. & Gibson, B. R. (2013b) Influence of valine and other amino acids on total diacetyl and 2,3-pentanedione levels during fermentation of brewer's wort. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, pp. 6919–6930.

Krogerus, K., Gibson, B., & Hytönen, E. (2015) An Improved Model for Prediction of Wort Fermentation Progress and Total Diacetyl Profile. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 73(1), pp. 90–99.

Krottenthaler, M. (2009) Hops. In: H. M. Eßlinger (ed), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Market*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, pp. 85-99.

Krottenthaler, M., Back, W. & Zarnkow, M. (2009) Wort Production. In: H. M. Eßlinger (ed), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Market*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, pp. 165-205.

Kucharczyk, K. & Tuszyński, T. (2017) The effect of wort aeration on fermentation, maturation and volatile components of beer produced on an industrial scale. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), pp. 31–38.

Kucharczyk, K., & Tuszyński, T. (2018) The effect of temperature on fermentation and beer volatiles at an industrial scale. *Journal of the Institute of Brewing*, 124, pp. 230-235.

Kunze, W. (2004) *Technology, Brewing and Malting*. 3rd Ed. VLB Berlin, Berlin, Alemanha, pp. 367-371.

Landaud, S., Lieben, P. and Picque, D. (1998) Quantitative Analysis Of Diacetyl, Pentanedione And Their Precursors During Beer Fermentation By An Accurate GC/MS Method. *Journal of the Institute of Brewing*, 104, pp. 93-99.

Layfield, J. B., & Sheppard, J. D. (2015) What Brewers Should Know About Viability, Vitality, and Overall Brewing Fitness: A Mini-Review. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 52(3), pp. 132-140.

Lekkas, C. (2010) Metabolism of nitrogenous wort components by brewers' yeast. Dissertação de Doutorado, School of Life Sciences/ICBD of Heriot-Watt University, Edimburgo, pp. 1-61.

Lekkas, C., Stewart, G. G.; Hill, A. E., Taidi, B. & Hodgson, J. (2007) Elucidation of the Role of Nitrogenous Wort Components in Yeast Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*. 113(1), pp. 3–8.

Lie, S. (1973) The Ebc-Ninhydrin Method For Determination Of Free Alpha Amino Nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79, pp. 37-41.

Masschelein, C.A. (1981) Flavour developments in large-capacity vessels. *Brewing & Distilling International*, May, pp. 37-42. Citado por: Boulton, C. & Quain, D. (2001) *Brewing Yeast and Fermentation*. 1st Ed., Blackwell Science Ltd, Oxford, Reino Unido, pp. 1-584.

Meussdoerffer, F. & Zarnkow, M. (2009) Starchy Raw Materials. In: H. M. Eßlinger (ed), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Market*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, p. 43.

Meussdoerffer, F. G. (2009) A Comprehensive History of Beer Brewing. In: H. M. Eßlinger (ed), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Market*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, pp. 1-38.

Miedl-Appelbee, M. (2018) Brewhouse Technology. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, pp. 336-348.

Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K. & Kumada, J. (1984) Kinetic study of vicinal diketones in brewing (1): formation of total vicinal diketones. *Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas*, 21, pp. 73–78. Citado por: Coghe, S., D'Hollander, H., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2005) Impact of Dark Specialty Malts on Extract Composition and Wort Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(1), pp. 51–60.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017) *Lehninger principles of biochemistry*. 7th Ed. W.H. Freeman and Company, Nova Iorque, Estados Unidos da América, pp. 522-533.

Nickel, J. S. (2020) *Vicinal diketones* <https://beerandbrewing.com/dictionary/OFH8CHBicP> consultado a 29 de novembro de 2020.

- Nielsen (2019) *Consumo de cerveja bate recordes da última década*. The Nielsen Company. https://www.nielsen.com/pt/pt/insights/article/2019/consumo-de-cerveja-bate-recordes-da-ultima-decada/#_ftn1 consultado em 25 de junho de 2020.
- Palmer, G. H. (2018) Barley and Malt. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, pp. 107-124.
- Palmer, J. (2017) *Attenuation Information*. <https://byo.com/article/attenuation-advanced-brewing/> consultado a 12 de dezembro de 2020.
- Petersen, E. E., Margaritis, A., Stewart, R. J., Pilkington, P. H., & Mensour, N. A. (2004) The Effects of Wort Valine Concentration on the Total Diacetyl Profile and Levels Late in Batch Fermentations with Brewing Yeast *Saccharomyces Carlsbergensis*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 62(4), pp. 131–139.
- Philliskirk, G. (2018) Quality. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, pp. 619-625.
- Pierce, J. S. (1987) Horace Brown Memorial Lecture: The Role Of Nitrogen In Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 93, pp. 378-381.
- Pires, E. & Brányik, T. (2015) *Biochemistry of Beer Fermentation*. 1st Ed. Springer International Publishing, New York, Estados Unidos da América, pp. 1-60.
- Portaria n.º 1/96 (1996) Portaria que define e estabelece as características e regras de fabrico, acondicionamento e rotulagem das cervejas. *Diário da República* n.º 2, Série I-B, 3 de janeiro de 1996, pp. 8-9.
- Portaria n.º 180/96 (1996) Portaria que altera o n.º 4.º e o anexo I da Portaria n.º 1/96, de 3 de janeiro. *Diário da República* n.º 125, Série I-B, 29 de maio de 1996, p. 1313.
- Portno, A. D. (1966) The Influence Of Oxygen On The Production Of Diacetyl During Fermentation And Conditioning. *Journal of the Institute of Brewing*, 72(5), pp. 458–461.
- Regulamento (CE) n.º 1333/2008 (2008) Regulamento do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia* n.º L 354/16, pp. 16-33.
- Rice, J. F., Chicoye, E., Helbert, J. R. & Garver, J. (1977) Inhibition of Beer Volatiles Formation by Carbon Dioxide Pressure. *Journal of the American Society*, 35(1), pp. 35-40.
- Robards, K., Haddad, P. R. & Jackson, P. E. (2004) Gas Chromatography. *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, Reprinting, Elsevier Ltd., London, Reino Unido, pp. 75–177.
- Roberts, T. R. & Falconer, R. (2018) Hops. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, p. 148.
- Roberts, T. R. (2016) Hops. In: C. W. Bamforth (ed), *Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence*, Elsevier Inc., London, Reino Unido, pp. 48-50.
- Rodman, A. D. & Gerogiorgis, D. I. (2016) Multi-objective process optimisation of beer fermentation via dynamic simulation. *Food and Bioproducts Processing*, 100 (A), pp. 255-274.
- Romaniuk, M., Suswał, K., Komisarczuk, M., Tuszyńska, W., Krupa, K., Zygmunt, W., & Milanowski, J. (2020) E-cigarettes, is this alternative safe?. *Journal of Education, Health and Sport*, 10(8), pp. 313–321.
- Romkes, S. and Lewis, M. (1971) Some factors which affect amino acid uptake by *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 21, pp. 799–805.
- Rondags, E., Stien, G., Germain, P., & Marc, I. (1996) Kinetic study of the chemical reactivity of α -acetolactate as a function of pH in water, and in fresh and fermented culture media used for *Lactococcus lactis* spp. *lactis* bv. *diacetylactis* cultivation. *Biotechnology Letters*, 18(7), pp. 747–752.
- Ruppel, T. & Grecsek, H. (2005) Brewing QC Applications Using Headspace Sampling-Gas Chromatography (GC). *PerkinElmer Life and Analytical Sciences*, pp. 1-4.
- Russel, I. (2016) Yeast. In: C. W. Bamforth (ed), *Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence*, Elsevier Inc., London, Reino Unido, pp. 77-94.

- Russel, I. (2018) Yeast. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, pp. 226-265.
- Ryder, D. S. (2018) Processing Aids in Brewing. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, pp. 287-327.
- Saerens, S. M., Verbelen, P. J., Vanbeneden, N., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(6), pp. 1039–1051.
- Saison, D., De Schutter, D. P., Uyttenhove, B., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2009) Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chemistry*, 114(4), pp. 1206–1215.
- Sampaio, T. (2004) Estudo do efeito dos níveis de azoto do mosto no metabolismo de uma levedura cervejeira. Dissertação de Mestrado, FCUL, Lisboa, pp. 1-95.
- SCC (2017) *Módulo 2 - Fabricação de Malte e Cerveja*. Sociedade Central de Cervejas, Academia da Cerveja, Vialonga, Portugal, pp. 6-38.
- SCC (2019) *O Cervejeiro*. Sociedade Central de Cervejas, Vialonga, Portugal, pp 2-7.
- SCC (2020a) *Sociedade Central de Cervejas e Bebidas*. <https://www.centralcervejas.pt/pt/sobre-nos/soc-central-cervejas.aspx> consultado em 13 de dezembro de 2020.
- SCC (2020b) *Instalações*. <https://www.centralcervejas.pt/pt/sobre-nos/instalacoes.aspx> consultado a 13 de dezembro de 2020.
- SCC (2020c) *História*. <https://www.centralcervejas.pt/pt/sobre-nos/historia.aspx> consultado a 13 de dezembro de 2020.
- SCC (2020d) *Factos & Números*. <https://www.centralcervejas.pt/pt/sobre-nos/factos-e-numeros.aspx> consultado a 13 de dezembro de 2020.
- SCC (2020e) *Marcas & Produtos*. <https://www.centralcervejas.pt/pt/marcas-produtos.aspx> consultado a 13 de dezembro de 2020.
- SCC (2020f) *Visita Virtual*. <https://www.centralcervejas.pt/visitavirtual/index.html> consultado a 13 de dezembro de 2020.
- Schoondermark-Stolk, S. A., Jansen, M., Veurink, J. H., Verkleij, A. J., Verrips, C. T., Euverink, G.-J. W., Boonstra, J. & Dijkhuizen, L. (2005) Rapid identification of target genes for 3-methyl-1-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(2), pp. 237–246.
- Shibamoto, T. (2014) Diacetyl: Occurrence, Analysis, and Toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), pp. 4048–4053.
- Sinkinson, C. (2017) Triangle Test. In: L. Rogers (ed), *Discrimination Testing in Sensory Science*, 1st Edition, Woodhead Publishing, Duxford, Reino Unido, pp. 153-170.
- Stewart, G. G. (2018a) Adjuncts. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, pp. 129-135.
- Stewart, G. G. (2018b) Fermentation. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, pp. 433-451.
- Stewart, G. G., Hill A. & Lekkas, C. (2013) Wort FAN – Its Characteristics and Importance During Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 71(4), pp. 179-185.
- Subin, S. R. & Bhat, S. G. (2016) Enzymes: Concepts, Nomenclature, Mechanism of Action and Kinetics, Characteristics and Sources of Food-Grade Enzymes. In: M. Chandrasekaran (ed), *Enzymes in Food and Beverage Processing*, 1st Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, p. 4.
- Swiegers, J. H., Saerens, S. M. G. & Pretorius, I. S. (2016) Novel yeast strains as tools for adjusting the flavor of fermented beverages to market specifications. In: Daphna

Havkin-Frenkel & Nativ Dudai (eds), *Biotechnology in Flavour Production*. 2nd Ed. John Wiley Wiley & Sons, Ltd, Chichester, Reino Unido, pp. 78-90.

TasteAtlas (2015) *Gueuze*. <https://www.tasteatlas.com/gueuze> consultado em 23 de maio de 2020.

TasteAtlas (2019a) *Porter*. <https://www.tasteatlas.com/porter-beer> consultado em 21 de maio de 2020.

TasteAtlas (2019b) *Stout*. <https://www.tasteatlas.com/stout-beer> consultado em 21 de maio de 2020.

TasteAtlas (2019c) *Pale Ale*. <https://www.tasteatlas.com/pale-ale> consultado em 21 de maio de 2020.

TasteAtlas (2019d) *India Pale Ale*. <https://www.tasteatlas.com/india-pale-ale> consultado em 21 de maio de 2020.

TasteAtlas (2019e) *Pilsner*. <https://www.tasteatlas.com/pilsner> consultado em 22 de maio de 2020.

TasteAtlas (2019f) *Bock*. <https://www.tasteatlas.com/bock> consultado em 22 de maio de 2020.

TasteAtlas (2019g) *Dunkel*. <https://www.tasteatlas.com/dunkel> consultado em 22 de maio de 2020.

TasteAtlas (2020a) *American Lager*. <https://www.tasteatlas.com/american-lager> consultado em 22 de maio de 2020.

TasteAtlas (2020b) *Marzen*. <https://www.tasteatlas.com/marzen> consultado em 22 de maio de 2020.

TasteAtlas (2020c) *Lambic*. <https://www.tasteatlas.com/lambic> consultado em 23 de maio de 2020.

TasteAtlas (2020d) *Fruit Lambic*. <https://www.tasteatlas.com/fruit-lambic> consultado em 23 de maio de 2020.

Taylor, B. & Organ, G. (2009) Sensory Evaluation. In: H. M. Eßlinger (ed), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Market*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, pp. 679-690.

Taylor, D. G. (2018a) Water. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, pp. 70-90.

Taylor, D. G. (2018b) Aging, Dilution, and Filtration. In: G. G. Stewart, I. Russel, A. Anstruther (eds), *Handbook of Brewing*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos da América, pp. 456-462.

Tenge, C. (2009) Yeast. In: H. M. Eßlinger (ed), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Market*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, pp. 119-145.

Tian, J. (2010) Determination of several flavours in beer with headspace sampling–gas chromatography. *Food Chemistry*, 123(4), pp. 1318-1321.

Tolls, T. N., Shovers, J., Sandine, W. E., & Elliker, P. R. (1970) Enzymatic removal of diacetyl from beer. II. Further studies on the use of diacetyl reductase. *Applied Microbiology*, 19(4), pp. 649–657.

Torija, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2003) Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation: study of their buffering capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), pp. 916–922.

Trelea, I. C., Landaud, S., Latrille, E., & Corrieu, G. (2002) Prediction of Confidence Limits for Diacetyl Concentration during Beer Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 60(2), pp. 77–87.

Verbelen, P. J., De Schutter, D. P., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Delvaux, F. R. (2006) Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, 28(19), pp. 1515–1525.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2003) Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(3), pp. 197–205.

- Viking Malt (2019) *Beer & Malt Handbook*. Viking Malt, Finlândia, pp. 5-22.
- Viking Malt (2020) *Malting Process*. Viking Malt, Finlândia, pp. 1-20.
- Villanueva, K. D., Goossens, E., & Masschelein, C. A. (1990) Subthreshold Vicinal Diketone Levels in Lager Brewing Yeast Fermentations by Means of ILV5 Gene Amplification. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 48(3), pp. 111–114.
- Virkajärvi, I., Vauhkonen, T., & Storgårds, E. (2001) Control of Microbial Contamination in Continuous Primary Fermentation by Immobilized Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59(2), pp. 63–68.
- Volpe, P. L. O. (1997) Estudo Da Fermentação Alcoólica De Soluções Diluídas De Diferentes Açúcares Utilizando Microcalorimetria De Fluxo. *Química Nova*, 20(5), pp. 528-534.
- Wainwright, T. (1973) Diacetyl-A Review: Part I-Analytical And Biochemical Considerations: Part II-Brewing Experience. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(6), pp. 451-470.
- Wainwright, T. (1986) Nitrosamines in malt and beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 92, pp. 73-80.
- Wang, J., Ding, H., Zheng, F., Li, Y., Liu, C., Niu, C., & Li, Q. (2019) Physiological Changes of Beer Brewer's Yeast During Serial Beer Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77(1), pp. 10-20.
- Whelan, V. J. (2017) Difference From Control (DFC) Test. In: L. Rogers (ed), *Discrimination Testing in Sensory Science*, 1st Edition, Woodhead Publishing, Duxford, Reino Unido, pp. 153-170.
- White, F.H., & Wainwright, T. (1975) Occurrence Of Diketones And A-Acetoxyacids In Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 81, pp. 46-52.
- Wilcocks, K. L., & Smart, K. A. (1995) The importance of surface charge and hydrophobicity for the flocculation of chain-forming brewing yeast strains and resistance of these parameters to acid washing. *FEMS Microbiology Letters*, 134(2-3), pp. 293–297.
- Wunsch, N. (2020) *Portugal: annual volume of beer consumed per capita 2008-2018*. Statista. <https://www.statista.com/statistics/447124/portugal-volume-beer-consumption-per-capita/> consultado em 25 de junho de 2020.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Kajino, K., Nagara, akira, & Noguchi, K. (1995) Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor. 2. Balance of total diacetyl reduction and regeneration. *Journal of Biotechnology*, 38(2), pp. 109–116.

Anexo

Na Tabela A.1 encontram-se apresentados os dados dos diferentes parâmetros, cujo registo é mantido, referentes às várias fermentações realizadas em 2019.

Tabela A.1 – Médias, desvios padrão absolutos e em percentagem, mediana e contagem, para Sagres Branca e Sagres Preta, dos parâmetros: tempo de enchimento do fermentador (h:min:s), tempo até início de *Ruh* (h:min:s), tempo de permanência da levedura em *Ruh* (h:min:s), permanência total da levedura (h:min:s), tempo de *Ruh* (h:min:s), tempo do golpe de frio (h:min:s), tempo total até ao golpe de frio (h:min:s), tempo total no fermentador (h:min:s), taxa de multiplicação da levedura, viabilidade da levedura e concentrações de diacetilo dos 7º ao 15º dias

	Sagres "Branca"					Sagres Preta					
	Média	Desvio padrão	Desvio Padrão (%)	Mediana	<i>n</i>	Média	Desvio padrão	Desvio Padrão (%)	Mediana	<i>n</i>	
Tempo de enchimento do fermentador(h:min:s)	14:14:07	1:43:25	12,11	14:18:00	241	13:13:56	1:41:20	12,76	13:36:00	16	
Tempo até início de <i>Ruh</i> (h:min:s)	87:10:42	7:37:58	8,76	86:35:00	193	67:04:40	3:34:34	5,33	67:19:30	6	
Permanência da levedura em <i>Ruh</i> (h:min:s)	70:31:14	21:26:53	30,41	63:02:00	192	78:12:30	16:57:14	21,68	72:51:30	6	
Permanência total da levedura (h:min:s)	157:25:35	23:20:59	14,83	149:52:00	192	145:17:10	19:20:12	13,31	139:58:00	6	
Tempo de <i>Ruh</i> (h:min:s)	125:12:18	21:30:52	17,18	121:25:00	193	167:46:40	28:32:25	17,01	159:22:30	6	
Tempo Golpe de Frio (h:min:s)	39:06:08	13:10:08	33,68	37:26:00	241	32:26:47	8:41:20	26,78	32:21:00	14	
Tempo total até golpe (h:min:s)	211:13:15	21:21:27	10,11	207:35:00	241	232:15:23	30:15:29	13,03	227:09:30	16	
Tempo total no fermentador (h:min:s)	250:19:24	27:47:57	11,11	248:59:00	241	267:13:09	28:00:03	10,48	265:12:00	14	
Taxa de multiplicação	2,52	0,39	15,27	2,59	183	2,31	0,24	10,61	2,36	6	
Viabilidade da levedura (%)	94,98	1,90	2,00	94,80	183	94,78	1,20	1,27	94,70	13	
Diacetilo (ppb)	7º dia	553,22	193,61	35,00	516,50	196	333,71	146,66	43,95	275,00	14
	8º dia	293,65	114,31	38,93	278,00	232	205,92	82,42	40,03	180,00	13
	9º dia	172,48	66,60	38,62	162,00	218	137,92	48,72	35,32	118,00	13
	10º dia	121,39	38,33	31,58	110,00	134	100,00	31,47	31,47	86,50	4
	11º dia	105,06	26,59	25,31	103,00	33	105,20	37,86	35,99	102,00	5
	12º dia	74,83	17,79	23,78	73,50	34	103,67	35,17	33,93	99,00	6
	13º dia	74,24	12,29	16,55	76,50	16	125,60	38,16	30,38	106,00	5
	14º dia	72,00	11,31	15,71	69,50	6	-	-	-	-	0
15º dia	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	