

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes



Dissertação

**BETA-AMILASE: ATIVIDADE ENZIMÁTICA AO LONGO DE
DIFERENTES PERÍODOS DE REPOUSO**

FÁBIO DE OLIVEIRA GOMES

Pelotas - Rio Grande do Sul – Brasil

Maio de 2014

FÁBIO DE OLIVEIRA GOMES

**BETA-AMILASE: ATIVIDADE ENZIMÁTICA AO LONGO DE
DIFERENTES PERÍODOS DE REPOUSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre Profissional.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer,

Pelotas - Rio Grande do Sul – Brasil

Maio de 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G111b Gomes, Fábio de Oliveira

Beta-amilase: atividade enzimática ao longo de diferentes períodos de repouso / Fábio de Oliveira Gomes ; Paulo Dejalma Zimmer, orientador. — Pelotas, 2014.

27 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Fermentação. 2. Temperatura do mosto. 3. Atividade enzimática. I. Zimmer, Paulo Dejalma, orient. II. Título.

CDD : 633.16

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

FÁBIO DE OLIVEIRA GOMES

BETA-AMILASE: ATIVIDADE ENZIMÁTICA AO LONGO DE DIFERENTES PERÍODOS DE REPOUSO

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do título de Mestre Profissional, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas,

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer
Universidade Federal de Pelotas
(Presidente da Banca)

Prof. Dr. Silmar Teichert Peske
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Geri Eduardo Meneghello
Universidade Federal de Pelotas

Dr^a Andreia da Silva Almeida
Universidade Federal de Pelotas

RESUMO

GOMES, Fabio de Oliveira. **Beta-amilase: avaliação da atividade enzimática ao longo de diferentes períodos.** 2014. 27f. Dissertação (Mestrado Profissional). Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Sementes. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS

A Beta amilase é uma enzima do malte que tem a propriedade da hidrólise do amido em açúcares fermentescíveis. Atua hidrolisando ligações alfa-1,4 do amido, mais precisamente nas cadeias lineares da amilose e amilopectina, liberando carboidratos de cadeias menores (maltose, glicose e maltotriose), necessários para processo de fermentação pela levedura cervejeira. Essa quebra ocorre basicamente para disponibilizar açúcares que posteriormente servirão para formação de álcool na cerveja. A atividade enzimática é inicialmente dependente da solubilização das enzimas, como exemplo na mosturação onde os grãos moídos são imersos em água. Existem outros fatores como temperatura, tempo e pH que garantem máxima eficiência enzimática, o que de certa forma é de grande importância para cervejaria na busca de um rendimento otimizado durante a brassagem. Este trabalho propôs um estudo da beta amilase em diferentes períodos de atuação sobre o amido presente no mosto cervejeiro avaliando qual o melhor período de atuação enzimática. Foi utilizada uma única temperatura, diferentes tempos de atuação, que vão de zero até 60 minutos, intercalados em cinco minutos. Todas as amostras foram fermentadas e analisadas individualmente, buscando identificar qual o melhor período de atuação desta enzima e como os mostos produzidos em diferentes períodos de tempo sofreram fermentação, de acordo com a graduação alcoólica, teor alcoólico e extrato real.

Palavras Chave: Fermentação, Temperatura do Mosto, Atividade Enzimática.

ABSTRACT

GOMES, Fabio de Oliveira. **Beta - amylase : assessment of enzyme activity over different periods** . 2014. 27pg. Dissertation (Professional Master). Graduate Program in Seed Science and Technology. Federal University of Pelotas. Pelotas , RS

Beta amylase is an enzyme of the malt that has the property of breaking down starch into fermentable sugars. Connections acts hydrolyzing alpha -1 ,4 starch, more precisely in the linear chains of amylose and amylopectin, lower releasing carbohydrate chains (maltose, maltotriose and glucose) necessary to process the fermentation by the brewing yeast. This breakdown occurs primarily to provide sugars that subsequently serve to formation of alcohol in beer . The enzymatic activity is initially dependent on the solubilization of enzymes , such as the mashing where ground beans are immersed in water . There are other factors such as temperature , time and pH to ensure maximum enzyme efficiency, which is of great importance for brewery in search of a performance optimized during mashing somehow . This paper proposed a study of beta amylase in different periods of activity on the starch present in the beer wort evaluating the best period of enzymatic activity . A single temperature , different operating times , ranging from zero to 60 minutes , interspersed in five minutes was used . All samples were fermented individually analyzed in order to identify the best period of activity of this enzyme and the musts produced in different periods of time have undergone fermentation , according to alcohol content , alcohol content , real extract and apparent extract.

Keywords : Fermentation, wort temperature, Enzyme Activity .

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Resultado do grau de fermentação referente ao mosto 4:1....	11
Figura 2- Resultado do grau de fermentação referente ao mosto 8:1....	12
Figura 3- Resultado do teor do álcool referente ao mosto 4:1 e 8:1.....	12
Figura 4- Resultado do extrato aparente e extrato real referente ao mosto 4:1 e 8:1.....	13
Figura 5- Botão de ajuste da temperatura.....	18
Figura 6- Botão NETZ.....	19
Figura 7- Botão START.....	19
Figura 8- Botão Rüher.....	19
FIGURA 9- Mosturador – Mosto <i>Kongress</i>	20

SUMÁRIO

	Página
BANCA EXAMINADORA	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	v
1.INTRODUÇÃO	01
2. REFERENCIAL TEÓRICO	04
3.MATERIAL E MÉTODOS	08
4.RESULTADOS E DISCUSSÕES	11
5.CONCLUSÕES	14
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
ANEXO	17

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é produzida através da mistura de água, malte, lúpulo e da ação de leveduras, o que resulta nessa bebida graciosa. Dentre os diversos processos que ocorrem para a produção da cerveja, um dos fundamentais é chamado de “mosturação”, no qual o malte moído é imerso em água no interior de uma caldeira, sofrendo agitação constante e aquecimento gradativo. A agitação garante homogeneidade da temperatura e da solução criada entre a água e os componentes do malte, nomeado de mosto. O aquecimento gradativo tem como função ativar enzimas vindas do malte, as quais irão atuar sobre macromoléculas, como proteínas e carboidratos de alto peso molecular, convertendo estes em moléculas de médio e baixo peso molecular, de acordo com certas faixas de temperaturas e períodos de duração longos ou curtos em cada uma destas faixas respectivamente. As duas principais enzimas que têm atividade sobre carboidratos durante a mosturação são a alfa e beta amilase. A beta amilase é uma exo-amilase, com capacidade de hidrolisar ligações alfa-1,4 das extremidades das moléculas de amido, gerando carboidratos como glicose, maltose e maltotriose. Estes açúcares fermentescíveis são necessários para se criar diferentes perfis de cerveja, variando principalmente em teor alcoólico e conseqüentemente no corpo da cerveja. Devido a necessidade de se estabelecer parâmetros, buscando a melhor eficiência das enzimas durante a mostura, sendo que a melhor temperatura de atividade da beta amilase é de 63°C e o melhor período de tempo que a beta amilase atua sobre o amido durante o período de até uma hora.

Essa variação do tempo de atuação das enzimas em sua temperatura ótima, ajuda a estabelecer o perfil de uma cerveja. Uma maior formação de açúcares fermentescíveis ou elevada quantidade de proteínas de alto peso molecular, como exemplo, compondo uma cerveja de acordo com o estilo desejado.

Essa ação enzimática que gera um produto passível de fermentação, resta conhecer as formas de atuação dessa enzima, assim como quais condições são capazes de potencializar essa atividade e o quanto é possível extrair como resultado dessa reação entre o amido e a enzima. Há diversos fatores que influenciam a ação da beta amilase, e optou-se por estudar o

tempo de atuação da enzima sobre o amido, a fim de verificar qual grande é a variedade de produtos (açúcar fermentescível) formada dessa reação em períodos de contato maior e menor.

O tempo de atuação dessa enzima é diretamente proporcional à quantidade de açúcares formados, longos períodos de atuação são dispensáveis, pois não geram tanto produto como esperado.

Na elaboração de uma receita de cerveja, é levado em consideração as rampas de parada para ativar determinada enzima que tem uma função específica durante o processo de produção. Cada uma dessas rampas determinará uma característica da cerveja acabada, seja ela mais alcoólica, mais doce, com um corpo maior, uma espuma presente, enfim, são determinantes para o resultado final. Daí, o interesse em analisar o quanto necessário é deixar a enzima atuar para atingir o ponto esperado para a cerveja que está sendo desenvolvido, assim como o tempo que é despendido com certa intenção, que poderia ser otimizado e proporcionar um rendimento maior sem perder a qualidade do produto final.

A beta amilase é diretamente responsável pela geração de açúcares fermentescíveis expressada em graus Plato, e esses açúcares servirão de suprimento para a levedura durante a fermentação, gerando um teor alcoólico alto ou baixo conforme essa concentração no meio, ou seja, a beta amilase é determinante nas características da cerveja, e o intuito desta pesquisa é verificar como ela atua com diferentes intervalos de paradas (tempo) ao longo de 60 minutos, em condições ótimas de atuação, para saber como manipular essa rampa, e desenvolver uma receita de cerveja que atinja as qualidades desejadas, com eficácia, sem despende de períodos longos desnecessários, ou até mesmo curtos que não tragam tal característica desejada.

O extrato de um mosto é uma medida da concentração em massa das diversas substâncias presentes no mosto onde o resultado é lido geralmente em graus Plato (°P) ou em densidade.

O Extrato real corresponde a densidade da solução ao final da fermentação. É denominado real pois corresponde a densidade da solução ao final da fermentação, porém sem a interferência do álcool.

O grau de fermentação, extrato real e o teor alcoólico pode ser obtido através da análise em laboratório com o auxílio do equipamento denominado Beer Analyzer.

O presente trabalho teve como objetivo analisar e avaliar o aumento do teor alcoólico da cerveja em relação ao tempo de repouso na faixa ótima de atuação da beta amilase.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O Malte, a Água e a Enzima

O malte é a matéria prima principal para a elaboração de cervejas, possuindo uma relação otimizada entre amido e proteínas, substâncias essenciais para a produção da cerveja. A cevada pertencente à família das gramíneas, a cevada (*Hordeum vulgare*) é um cereal e seus grãos podem ser utilizados na indústria de bebidas, como cervejas e destilados e também compostos farináceos e panificação (PORTO, 2011). Sua estrutura é a de uma gramínea alta e amarelada, com uma espiga no topo da haste (OLIVER, 2012). É amplamente utilizada por possuir características essenciais para a produção de cerveja, como teor de amido e proteínas.

Para poder ser utilizada na fabricação de cerveja, a cevada passa pelo processo de malteação, que consiste inicialmente na umidificação dos grãos, processo chamado de maceração, e posterior germinação controlada, ativando o sistema enzimático que irá agir sobre os grânulos de amido (PORTO, 2011), é durante a malteação que são formadas as enzimas que atuam nas substâncias de reserva do grão e que atuarão durante o processo de mosturação, sendo um dos principais objetivos de tal processo (TSCHOPE, 1999) preparando o grão para ser utilizado na produção de cerveja.

Maltear é o processo no qual o grão de cevada é umidificado para iniciar o processo de germinação. Quando a semente germina, ela ativa enzimas que começam a converter suas reservas de amido e proteínas em açúcares e aminoácidos, os quais serão utilizados no crescimento da planta. O Objetivo de maltear um grão é liberar estas enzimas para sua utilização pelo cervejeiro. Uma vez que as enzimas começam a agir, o grão que começou a brotar é seco num forno, desnativando as enzimas do malte, até que o cervejeiro esteja pronto para usá-lo (PALMER, 2006).

A malteação torna o grão mais macio e branco, e faz com que a casca da cevada, que é muito dura, seja amenizada e o corpo farinhoso fique mais exposto, sendo possível seu uso para fins cervejeiros, por facilitar o acesso ao amido, que seria usado para a formação de um broto, mas é interrompido através do calor (KUNZE, 2006).

O amido do malte é um carboidrato composto entre outras substâncias por dois polissacarídeos: a amilose e a amilopectina. A amilose possui cadeia simples composta de ligações alfa 1,4 e representa 15-20% do amido, com 60 a 2.000 moléculas de glicose. Já a amilopectina, possui cadeia ramificada que além de ligações alfa 1,4 (linear) possui também ligações alfa 1,6 (ramificada) que não permitem a quebra pelas enzimas do malte, representam 80-85% do amido (6.000 a 40.000 moléculas de glicose), sendo que dessas 4 a 5% são ligações alfa 1,6 (BRIGGS et al, 2004).

Com o calor da mosturação, as ligações de hidrogênio entre a amilose e amilopectina se rompem, permitindo a entrada de água, deixando o grão intumescido, o que ocasiona o rompimento, e, dessa forma, a amilose passa do grão para o meio, aumentando a viscosidade. Esse processo é chamado de gelatinização, e possibilita a ação enzimática. É nesse exato momento que se inicia a atividade da beta amilase. Essa reação química ocorre no mosto com temperatura entre 58 e 62°C (KUNZE, 2006).

Após a gelatinização, através da enzima beta-amilase, o amido é degradado em cadeias menores de carboidratos, gerando maltose, as quais são fermentescíveis pela levedura. Em seguida, ocorre a sacarificação, onde há a atuação da enzima alfa-amilase, reduzindo as moléculas de amido em cadeias menores que nomeadas dextrinas, resultando em uma redução na viscosidade do mosto e na formação do corpo da cerveja (TSCHOPE, 1999).

As enzimas são proteínas e ocupam um papel de destaque na dinâmica e estruturação dos organismos vivos. Funcionam como catalisadores, permitindo que uma reação química ocorra dentro dos limites das temperaturas biológicas (PORTO, 2011).

No processo de mosturação que estas enzimas irão desenvolver suas atividades. As enzimas irão atuar em diversos componentes do malte como as proteínas e o amido, transformando substâncias de alto peso molecular em substâncias de médio e baixo peso molecular (KUNZE, 2006).

As enzimas em geral possuem alta especificidade, ou seja, um determinado tipo de enzima reage com uma substância de consumo típico dela, este mecanismo é chamado de “chave-fechadura”, e mesmo que tenha outras substâncias no meio, não ocorrerá reação alguma, a não ser com a de sua especificidade. Dessa reação entre enzima e substrato, resulta um produto

específico, e que em nosso estudo foi abordado, através da ação da beta-amilase, que atua sobre a amilase e amilopectina, gerando como produto a maltose (PORTO, 2011).

A beta-amilase é uma enzima amilolítica com atuação específica sobre as ligações alfa 1,4, e inicia sua atividade nas extremidades da cadeia em direção ao centro, liberando principalmente a maltose. Quase não produz viscosidade. Atua em temperatura entre 58 e 68°C, sendo sua temperatura ótima 63°C (BRIGGS et al, 2004).

Fora dessa faixa de temperatura, a atuação é quase nula, e acima de 70°C ocorre a desnaturação enzimática, que faz ela perder sua propriedade de quebra de amido em maltose, e mesmo que o meio seja submetido a uma temperatura mais baixa novamente, a enzima não consegue mais exercer sua atividade devido à mudança em sua conformação molecular e perda de sua função, resultante da temperatura alta (PALMER, 2006).

Além da temperatura, outros fatores influenciam a atividade enzimática, como o pH da água, determinante para a atuação dessa enzima, sendo que, para alcançar maiores rendimentos deve estar entre 5,2 a 5,5. Em casos de valores fora dessa faixa, ainda ocorre atividade enzimática, porém com menor eficácia (BRIGGS et al, 2004).

A água cervejeira deve ser livre de impurezas, filtrada, sem cloro, inodora e insípida. Para que a água possua tais parâmetros pode ser necessário passar por um sistema de tratamento de forma a deixá-la com as características desejadas, seja retirado o cloro, sólidos indesejáveis e ajustando os sais. Uma água adequada deve conter concentração de cálcio e magnésio (principalmente) controlados, para não tornar a água dura e minimizar a atividade das enzimas (BRIGGS et al, 2004).

A qualidade e especificações do malte são determinantes para saber o quanto de açúcar há disponível no grão. Maltes dividem sua capacidade de armazenamento entre amido e proteínas, sendo que são inversamente proporcionais quanto a quantidade disponível, ou seja, quanto mais proteínas, menos amido disponível para a hidrólise e vice versa (KUNZE, 2006).

O malte precisa passar por um processo de moagem para expor seu corpo farinhoso, que está protegido pela casca que o envolve. Uma boa

moagem é determinante para disponibilizar o amido para sofrer a gelatinização e sacarificação através da atividade enzimática (OLIVER, 2012).

Mosto Congresso

Consiste em solubilizar as substâncias contidas no malte (açúcares, dextrinas, proteínas, taninos, substâncias gomosas, sais minerais) em condições padronizadas de tempo e temperatura pelo processo de mostra padronizado pela EBC - Método Kongress (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 1998).

O malte moído é submetido a um processo padrão ou standard de mosturação normatizado pela EBC (European Brewery Convention) e que como tal, possibilita comparações de resultados em diferentes amostras de malte, assim como seu potencial.

No mosto obtido por este processo, efetuam-se várias determinações analíticas como extrato, tempo de sacarificação, odor, tempo de filtração, pH do mosto, cor, viscosidade, nitrogênio solúvel, nitrogênio aminado livre (FAN) e beta glucanos. Esses valores são de grande importância para o processo de fabricação da cerveja.

O método pode ser utilizado para maltes que possuam unidade de cor até 15 EBC. Para maltes escuros, é utilizado o método da ASBC, o qual utiliza uma mistura de malte claro para facilitar a sacarificação do mosto (ASBC, 1976).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de físico química do SENAI em Vassouras/RJ. Foram realizadas amostragem em triplicata, e devido a grande proximidade dos resultados obtidos, utilizou-se uma média ponderada dos mesmos.

Foram utilizados maltes que variam conforme seu processo de malteação e temperaturas de secagem e tempo de exposição ao calor. Foi utilizado uma saca de 50 kg de malte da cooperativa Agrária do Paraná. utilizou-se moagem fina para otimizar a disponibilidade de açúcar no meio e assim a atuação da beta amilase. Realizou-se a proporção de 4 – 5 litros de água para cada quilo de malte, utilizando duas propostas de concentração, sendo uma delas uma proporção de quatro de água para um de malte, com diluição de 50% com água ao adicioná-la após a mosturação (lavagem do bagaço de malte), e outra, com uma proporção de oito de água para um de malte sem lavagem do bagaço. No mosto mais concentrado foi misturado 90 gramas de malte em 360mL de água, e depois de terminado a mostura, adicionado mais 270mL de água para lavagem dos grãos. Já no mosto menos concentrado, foi utilizado 50 gramas de malte em 400mL de água, sem lavagem com água secundária. Ambas as amostras foram submetidas ao mesmo tratamento simultaneamente no mosto *kongress* para não haver diferenciações de processo, sendo três amostras idênticas de cada para ter a garantia de repetibilidade e confiança nos resultados obtidos.

A moagem do malte foi feita em um moinho de disco, feito para uso em laboratório que permite ser regulado até 1mm de espessura entre os discos.

O pH da água era elevado, por volta de 7,0 e assim foi necessário ajuste desse pH com a dosagem de ácido láctico para torná-lo mais ácido, até atingir um valor em que a beta amilase atue com maior potencialidade. Além de ajustar a água, após a infusão do malte, foi analisado novamente o pH da água, e em todas as vezes foi necessário ajustar novamente o pH para se atingir o pH entre 5,2 a 5,5 e posteriormente iniciar o aquecimento.

Utilizou-se uma levedura liofilizada inglesa de baixa fermentação chamada “*Diamond*”. A dosagem de levedura respeitou o volume de mosto adquirido após a filtração e retirada do bagaço, sendo um grama de levedura

para cada 10 mL de mosto, ou seja, uma quantidade elevada para sabermos realmente qual seria o grau final dessas amostras.

Para processo de mostura foi iniciada com a coleta da água no tanque de água fria da planta cervejeira do SENAI, sendo coletados 6 litros de água em um erleyemeyer para cada temperatura a ser analisada. Foi medido o pH dessa água, e depois tratada com ácido láctico, afim de ajustá-lo para um valor entre 5,2 a 5,5. Simultâneo à coleta de água, foi feito a moagem do malte para ser colocado na água que está passando pelo tratamento de ajuste de pH. Cada amostra foi registrada na vidraria em que ficou armazenada, a fim de identificar e nomear. Enquanto houve a preparação do material, o mosto *Kongress* foi ligado e colocado água no seu nível indicado, para iniciar o aquecimento até a temperatura desejada.

Com a água tratada, os copos do mosto *Kongress* foram divididos com três amostras de cada diluição: três copos com 400 mL de água que serão colocados 50 gramas de malte, três copos com 360 mL de água que receberam 90 gramas de malte, e os últimos dois copos com água que foi utilizada para a lavagem do bagaço do malte.

Após colocado a água nos copos, foram todos encaixados no equipamento do *Kongress*, e nesse momento foi colocado o malte em cada copo.

Realizou-se três repousos (rampas) de temperatura, sendo a primeira delas uma parada para atividade de uma enzima protéica chamada exopeptidase, Essa enzima atua em pH entre 5,2 e 8,2, ou seja, dentro do padrão que foi adotado para o experimento, e, em temperaturas entre 45 e 55°C, e daí a escolha por uma parada inicial em 45°C pelo período de 10 minutos, com o intuito de gerar aminoácidos que auxiliarão no processo de fermentação.

O *Kongress* foi ajustado para aumentar a temperatura até 63°C, onde ocorre a atividade da enzima beta amilase. Os tempos de repouso utilizado foram o primeiro de zero, ou seja, não houve repouso, depois cinco minutos de repouso, em outro experimento foram 10 minutos, e assim sucessivamente a cada cinco minutos mais, até chegar em 60 minutos de parada para atividade da beta amilase.

A última parada ocorreu em 78°C pelo período de cinco minutos, para inativar a atividade enzimática amiolítica de forma que não desempenhassem mais sua função e não interferisse nos resultados obtidos. Foi preparado 6 erlenmeyers de 500mL com um funil, papel filtro devidamente dobrado para ser separado o malte do mosto. Nas amostras que receberam água de lavagem, foi medido o volume de 270mL de água à 78°C, e despejado no mesmo funil para que fosse depositado e misturado no erleyemeyer. Com um mínimo de 200mL de mosto pronto de cada amostra e foram resfriados à 20°C.

Por fim, verificou-se o volume restante que ficou em cada uma das amostras de cada erlenmeyer, e pesou-se para cada 10mL de mosto um grama de fermento liofilizado de baixa fermentação. O fermento não foi previamente hidratado, e após dosado dentro do erlenmeyer foi tampado com uma rolha de algodão adaptada, e levado ao agitador para permanecer em constante agitação durante a fermentação.

Todas as amostras ficaram juntas em temperatura ambiente no laboratório, que é em torno de 20°C, pelo período de 24 horas e coletado um volume de 35mL dessa solução fermentada, agora uma cerveja, e ser filtrado com papel filtro e terra infusória dentro, para a leitura do grau de fermentação, teor de álcool, extrato aparente e extrato real das amostras no Beer Analyzer.

Esta pesquisa preconizou a melhor interpretação das formas de atuação dessa enzima, assim como quais condições são capazes de potencializar essa atividade e o quanto é possível extrair como resultado dessa reação entre o amido e a enzima. Há diversos fatores que influenciam a ação da beta amilase, e optamos por estudar o tempo de atuação da enzima sobre o amido, a fim de verificar qual grande é a variedade de produtos (açúcar fermentescível) formada dessa reação em períodos de tempos do contato enzimático com o amido maiores e menores. Para evidenciar tais parâmetros anteriormente citados, utilizamos a observação dos dados laboratoriais denominados de grau de fermentação, extrato real e teor alcoólico. Com base nos dados obtidos nesta pesquisa, podemos obter uma maior eficácia da atividade enzimática, sem despendar de períodos longos desnecessários ou até mesmo curtos que não tragam tal característica desejada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi realizada uma comparação entre as seguintes variáveis (grau de fermentação, extrato real e teor alcoólico), de mostos com concentração de 4:1 e 8:1.

O efeito da parada prolongada a 63°C é observado no grau de fermentação. Os resultados não seguem uma elevação linear proporcional ao tempo, sendo que o repouso que obteve o maior grau de fermentação foi no tempo de 35 minutos em ambas as concentrações de mosto (4:1 e 8:1), porém quando comparando os tempos iniciais com os finais de uma forma geral, nota-se que o mosto 4:1 obteve um aumento de produção de 1,76% quando comparamos com o mosto 8:1 (Figuras 1 e 2).

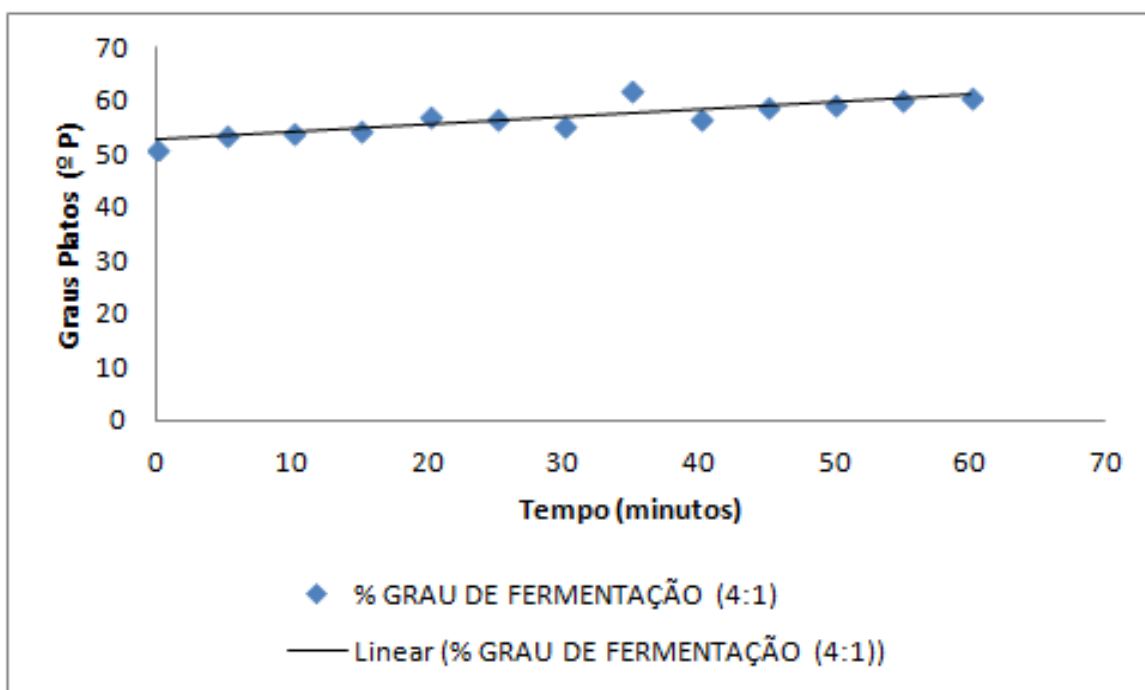


Figura 1: Resultado do grau de fermentação referente ao mosto 4:1

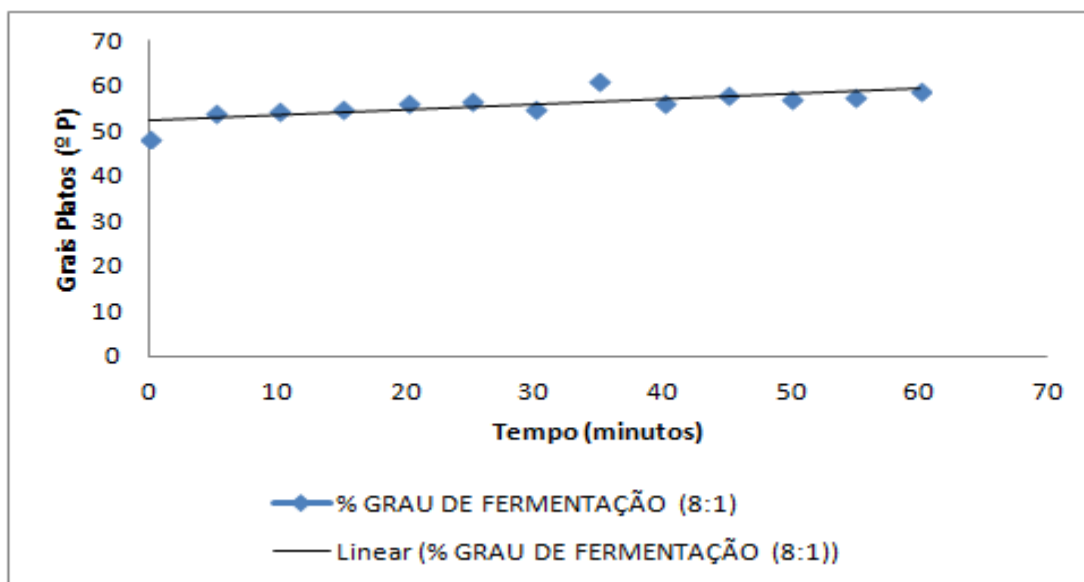


Figura 2: Resultado do grau de fermentação referente ao mosto 8:1

Quando nos referimos ao teor alcoólico visualizamos um aumento de 10,60% na produção do teor alcoólico quando comparamos as amostras de concentração 4:1 e 8:1 (Figura 3). Os resultados também não são progressivamente maiores a medida que aumentamos o tempo de repouso. O período de repouso que mais produziu álcool foi em 45 minutos, com um teor de 5,47% na concentração de 4:1 e 4,89% na concentração de 8:1, não havendo grande acréscimo no resultado nos períodos adicionais de repouso analisados.

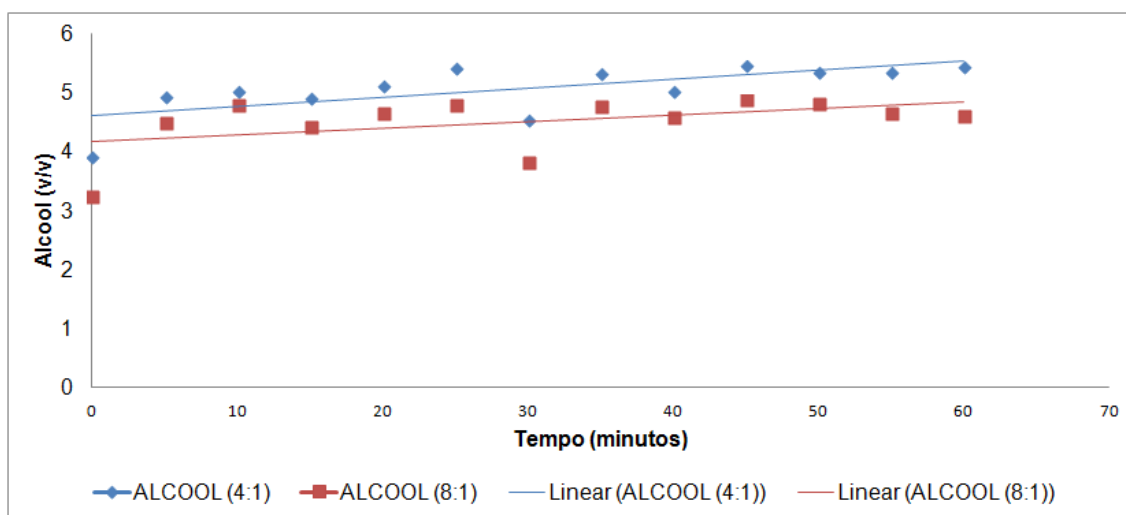


Figura 3: Resultado do teor do álcool referente ao mosto 4:1 e 8:1

Já em relação ao extrato real houve uma redução dos valores, tanto ao longo do tempo quanto em comparação aos dois mostos, o que significa que houve um aumento da porcentagem de açúcares fermentescíveis, conseqüentemente resultando em uma elevação do teor alcoólico. A diferença de extrato entre as amostras é dada pelo repouso em 63°C, onde há a atuação da enzima beta amilase, sendo que os outros repousos são constantes.

O extrato real, que mensura apenas os açúcares que restaram da fermentação, que não são fermentescíveis. Essa análise apontou uma variação maior entre as diferentes temperaturas, sendo a media de resultados na amostra mais concentrada (4:1) foi de 6,12°P e a amostra menos concentrada (8:1) foi de 5,67°P entre 5 e 25 minutos de repouso (Figura 4).

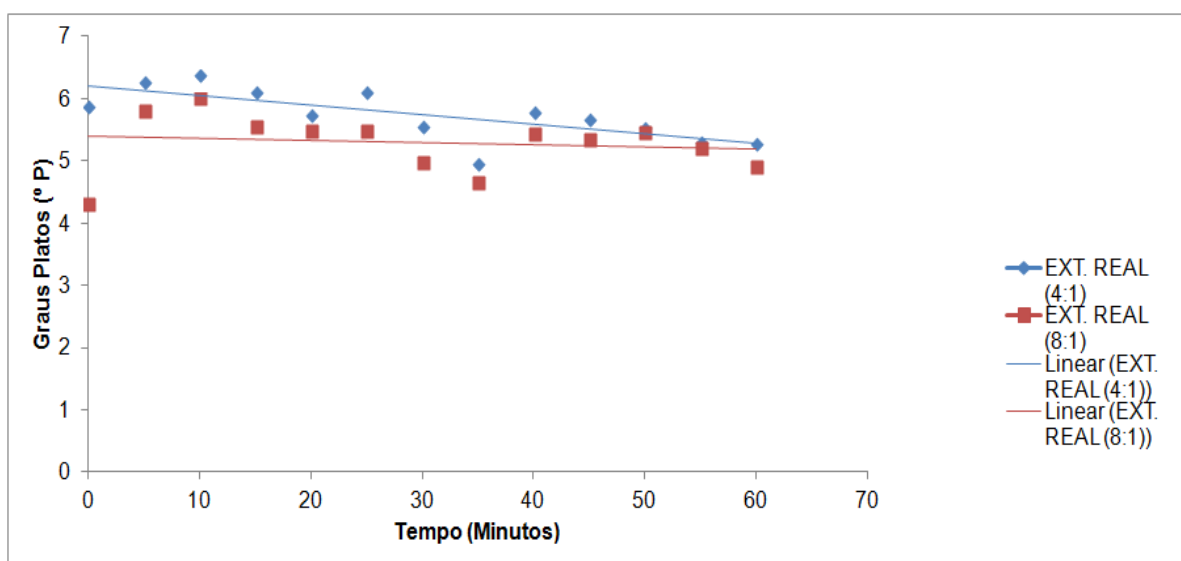


Figura 4: Resultado do extrato real referente aos mostos 4:1 e 8:1

Este elevado rendimento do mosto de concentração de 4:1 em relação ao mosto de 8:1 é devido a uma melhor ação enzimática da beta-amilase. Possivelmente este fato se deve a maior estabilidade da enzima beta-amilase em mostos mais concentrados em relação a alfa amilase, (BRIGGS et al., 2004). Outra possibilidade é a de que em mostos mais concentrados as enzimas sejam protegidas de uma inativação térmica rápida, desta forma ocorrendo o aumento do teor de açúcar fermentescível, conseqüentemente estendendo o limite de atenuação, (KUNZE, 2006).

5. CONCLUSÕES

Foi possível identificar que realmente a enzima beta-amilase apresenta uma melhor atividade enzimática ao longo do período analisado e obtivemos melhor eficiência no mosto mais concentrado (4:1), garantindo um maior teor de açúcar fermentescível, logo uma cerveja com aumento do teor alcoólico. Conforme aumentou o tempo de repouso em 63°C houve um aumento no grau de fermentação e na produção de álcool, porém os resultados não seguem uma elevação linear proporcional ao tempo de repouso analisado.

Frente a esse cenário, foi visualizada uma possibilidade de adaptação da receita utilizada na mostura, com um menor período de repouso para ação enzimática que impactará diretamente no retorno econômico da empresa gerando maiores lucros. A diferença de extrato e álcool gerados entre 10 e 20 minutos de repouso, é muito pequena frente ao volume de fabricações que pode ser incrementado a curto, médio e longo prazo. Por exemplo, para uma cervejaria que atualmente tem uma produção diária de 10 mosturas com 20 minutos de parada da beta amilase, poderia reduzir esse tempo para 10 ou 15 minutos de parada, que teria um incremento diário de 5 a 10% do volume de produção, sem diminuir o teor alcoólico da cerveja. Esse incremento pode chegar a mais um fabrico por dia, que somados na semana totalizam em 7 fabricos, e mensal um volume entre 20 e 30 fabricos a mais do que o operado atualmente. Ou seja, um aumento de produtividade alto que impactará diretamente nos cofres da cervejaria.

Outra aplicação que pode ser destacado é em micro cervejarias que há a produção de variados tipos de cerveja com teores elevados de álcool, que podem ser utilizados tempos maiores de repouso da beta amilase para extrair o máximo possível de açúcares fermentescíveis, e alcançar o teor alcoólico desejado para um determinado tipo de cerveja. Mas mesmo nesses casos, períodos muitos extensos são dispensáveis por não estarem muitos distantes os resultados de produção de extrato e álcool, em paradas entre 50 e 60 minutos de mosturação por exemplo. Os dados coletados oferecem uma boa ferramenta para elaboração de receitas variadas, mesmo que não seja com o intuito de aumentar o volume de produção, mas evita desperdícios de tempo de

mosturação, assim como riscos de oxidação do mosto, além de uma pequena economia energética de calor.

Maiores estudos são necessários para confirmar esses valores, mas os dados apontam uma possibilidade clara de otimizar o tempo de fabricação, sem custos adicionais como mão de obra, manutenção, refrigeração, vapor entre outros, apenas com a adaptação da receita utilizada na fabricação. Outros fatores precisam ser levados em consideração para manter a cerveja com o mesmo perfil organoléptico. Mas, esse estudo é um indicativo e abre portas para outros estudos mais aprofundados sobre essa possibilidade, que trarão um incremento financeiro na indústria cervejeira em geral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASBC, American Society of Brewing Chemists, Methods of analysis, U.S.A., 1976.

BRIGGS, J.S. et al, Brewing Science and Practice, CRC Press LLC, 2004, 863p.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION, Analytical - EBC, 5.ed, Zurich: Brauerei - und Getränke - Rundschau, 1998.

KUNZE, W. Tecnología para cerveceros y malteros. 1. ed. Berlín: VLB Berlin, 2006. p. 416-447.

OLIVER, Garrett. A Mesa do Mestre Cervejeiro. Tradução de Anthony Cleaver. – São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2012.

PORTO, P.D. Tecnologia de Fabricação de Malte: uma Revisão. Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de engenheiro de alimentos. Porto Alegre, 2011. 58p.

PALMER, John J. How to Brew. 3rd Ed. Brewers Publications, Boulder, Colorado, 2006.

TSCHOPE, E.C.; NOHEL, F. A malteação da cevada. Vassouras: Senai – RJ, 1999.

ANEXO

PADRÃO PARA PREPARO DAS AMOSTRAS

Com o intuito de estabelecer um padrão nas análises feitas em diferentes temperaturas do estudo, e obter amostras com os mesmos métodos para não haver influências e diferenciação nos resultados devido ao manejo errado do procedimento, foi criado um protocolo de execução do experimento, detalhado abaixo:

- 1) Ligar o mosto Kongress
- 2) Verificar nível de água
- 3) Seguir as etapas no procedimento do Mosto *Kongress*
- 4) Corrigir o pH da água de processo para 5,5 com o ácido láctico e apontar o resultado
- 5) Colocar a água de processo nos copos do Mosto *Kongress* para aquecer a 45°C

(mL) 4:1	(mL) 8:1
360	400
H2O lavagem 270	

(g) 4:1	(g) 8:1
90	50

- 6) Moer o malte – abertura de 10 (moagem fina) – padrão mosto *kongress*
- 7) Quando a água de processo chegar a 45°C adicionar o malte e contar o tempo das rampas
- 8) Medir o pH do mosto e anotar (Corrigir, se necessário, o pH do mosto para 5,5 com ácido láctico)
- 9) Colocar água de processo para aquecer no mosto *kongress* para lavagem do mosto 4:1

10) Preparar 6 erlenmeyers para filtrar o mosto – identifica-los com nº e amostra 4:1 ou 8:1

- a. colocar um funil com papel filtro no bico do erlenmeyer
- b. posicionar a peneira de inox acima do funil e despejar o mosto
- c. lavar o mosto 4:1

11) Resfriar o mosto a 20°C

12) Passar 2 amostras no beer analyzer

13) Anotar os resultados das amostras e guardar o ticket

Para inocular o fermento, colocar um grama de fermento para cada 10 mL de mosto presente no erlenmeyer

14) Adicionar fermento no mosto resfriado, homogeneizar a amostra, tampar com algodão e colocar no agitador em velocidade média

(g) 4:1	(g) 8:1
20g/200mL	20g/200mL

15) Anotar volume de cerveja

16) Após 24 horas filtrar duas amostras de cada erlenmeyer com terra infusória e analisar no beer analyzer e guardar o ticket

17) Lavar e organizar a área utilizada no laboratório

Ilustração:

1) Ajustar manualmente a temperatura para 45°C



FIGURA 5: Botão de ajuste da temperatura

2) Ligar o Mosto *Kongress*



FIGURA 6: Botão NETZ

3) Apertar botão START e deixar por 10 minutos



FIGURA 7: Botão START

4) Posicionar o botão Rührer para 100

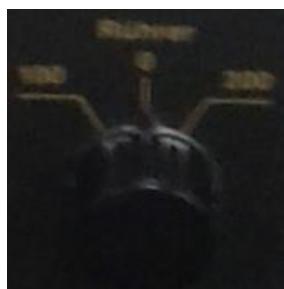


FIGURA 8: Botão Rührer

5) Colocar a água de processo com pH corrigido nas canecas identificadas

6) Quando a água dos copos chegar a 45°C adicionar o malte moído

7) Ao dar o tempo da primeira rampa, apertar botão verde NETZ – *fig 4*

8) Ajustar manualmente a temperatura para 63°C – *fig 3*

9) Apertar botão NETZ – *fig 4*

10) Apertar botão START – *fig 5* – e contar o tempo conforme o tempo a ser analisado

11) Ao dar o tempo apertar botão NETZ – *fig 4*

12) Ajustar manualmente a temperatura para 78°C

- 13) Apertar botão NETZ – *fig 4*
- 14) Apertar botão START – *fig 5* – e deixar por 5 minutos
- 15) Ao final, apertar o botão NETZ – *fig 4*

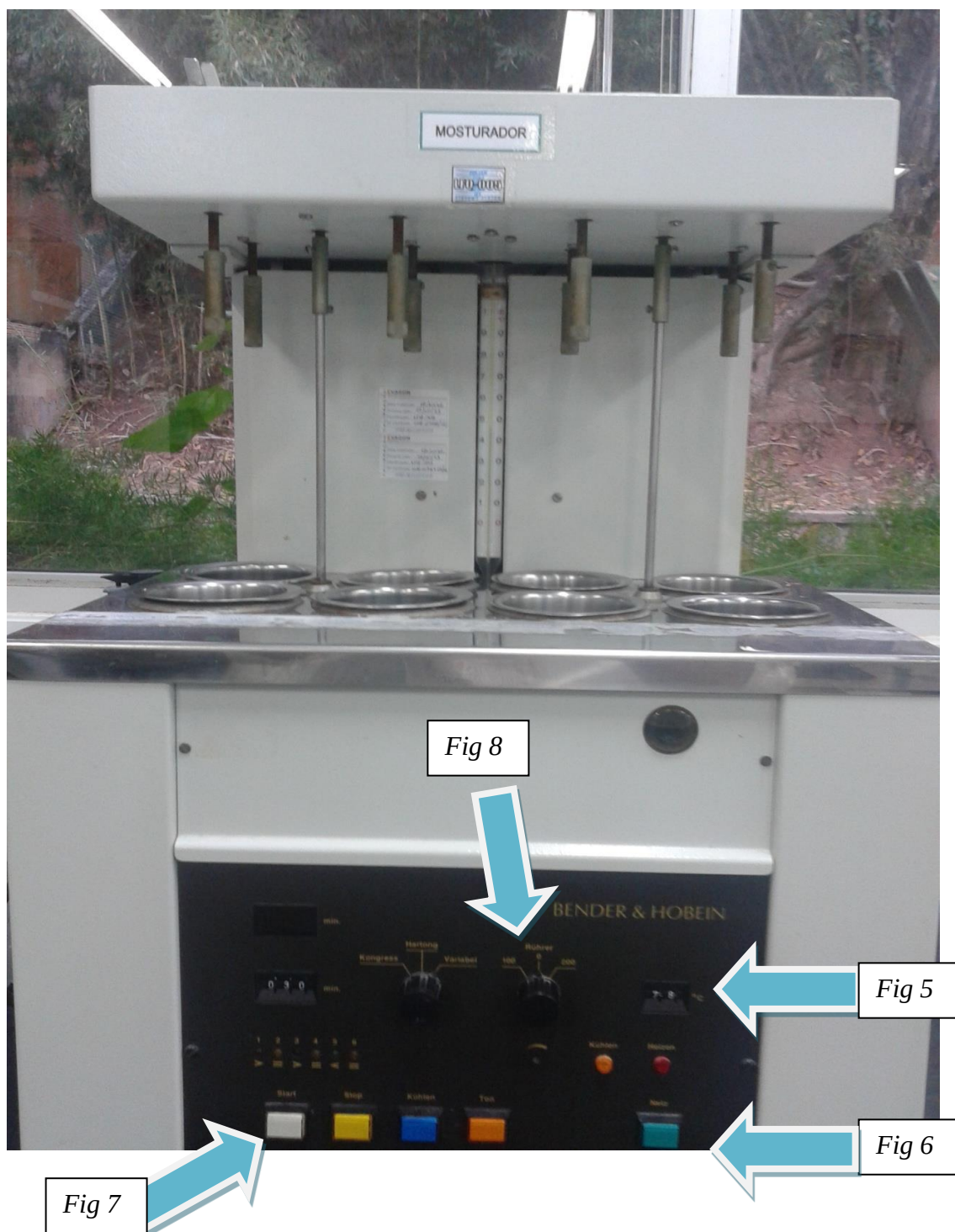


FIGURA 9: Mosturador – Mosto Kongress