

ELEMENTOS BIOTECNOLÓGICOS FUNDAMENTAIS NO PROCESSO CERVEJEIRO: 3º PARTE – A MATURAÇÃO

RESUMO

A cerveja é uma solução aquosa complexa, contendo CO₂, etanol, diversos sais inorgânicos e cerca de 800 compostos orgânicos. O *flavour* da cerveja é determinado principalmente, por compostos produzidos pela levedura durante a fermentação e em parte na maturação. O presente artigo finaliza uma série de revisões sobre os elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro demonstrando os aspectos básicos na maturação da cerveja.

Palavras-chave: maturação, cerveja, biotecnologia

SUMMARY

Beer is a complex watery solution, containing CO₂, ethanol, several inorganic salts and about 800 organic compounds. The *flavour* of the beer is determined, mainly, through compounds produced by the yeast during the fermentation and in part of the maturation. The present paper finishes a series of revisions on the basic biotechnological elements in the brewing, demonstrating the basic aspects in the maturation of the beer.

Keywords: maturation, beer, biotechnology

INTRODUÇÃO

Entende-se por Biotecnologia a utilização de sistemas celulares para a obtenção de produtos ou desenvolvimento de processos industriais. A cerveja é um produto biotecnológico clássico para o qual a imagem é muito importante. Qualquer mudança no processo de produção com vistas à redução de custos deve preservar as características organolépticas do produto final, tradicionalmente denominadas de *flavour*.

O sabor da cerveja é determinado pela matéria-prima, pelo tipo de processo e pela levedura utilizados, além dos compostos produzidos durante a fermentação e maturação, que exercem maior impacto. Entre os compostos produzidos pela levedura, que influenciam marcadamente o *flavour* da cerveja obtida, encontram-se álcoois, ésteres, ácidos orgânicos, compostos carbonilados e compostos sulfurados.

Ao iniciar-se a maturação, a maior parte dos açúcares foi metabolizada em etanol, gás carbônico, glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores. Durante o processo de maturação, ocorrem algumas alterações de grande importância para a qualidade da cerveja, como o gás carbônico produzido

durante a fermentação do extrato restante provoca a carbonatação da cerveja e é suficiente para fornecer à cerveja o teor ideal de carbonatação, e se não alcançado, pode ser corrigido após a filtração; o repouso à baixa temperatura provoca a precipitação dos resíduos de leveduras que ainda permanecem na cerveja; maturação do sabor pelas transformações que ocorrem na concentração de ácido sulfídrico, de acetaldeído e de diacetil, os quais são minimizados durante o processo. Os álcoois superiores e ácidos graxos que se formam durante a fermentação não se modificam significativamente no decorrer da maturação. Durante o período de maturação são formados ésteres dando origem a aroma e sabor que caracterizam a cerveja; entre os ésteres, predominam o acetato de etila, acetato de isoamila, caproato de etila e caprilato de etila.

Neste artigo, encontram-se revisados e sumariados os aspectos básicos mais relevantes da etapa de maturação da cerveja, finalizando a série de revisões sobre os elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro.

*Giovani Brandão Mafra de Carvalho**,
Camila Vieira Bento e João Batista de A. e Silva

Universidade de São Paulo,
Escola de Engenharia de Lorena – EEL, Departamento de Biotecnologia.

* Autor para correspondência:
Estrada Municipal do Campinho
Caixa Postal 116
CEP: 12602-810. Lorena. SP
Fone: (12) 3159-5107
E-mail: gbmafra@yahoo.com.br

A MATURAÇÃO DA CERVEJA E SEUS ASPECTOS BÁSICOS

Pode-se dividir o processo de fermentação da cerveja em duas etapas distintas. A primeira, denominada fermentação primária, cobre a fase de grande atividade metabólica da levedura, durante a qual quase todo extrato fermentável é convertido em etanol e gás carbônico. Essa fase dura apenas alguns dias. A segunda etapa, chamada fermentação secundária, diz respeito ao período de maturação da cerveja. Após a fermentação primária, o extrato fermentável residual da cerveja verde continua a ser lentamente fermentado. Mas o processo de maturação continua por um longo tempo, mesmo depois do término da fermentação secundária (Venturini Filho & Cereda, 2001).

Até algum tempo atrás a cerveja era fermentada em um tanque e maturada em outro. Atualmente há uma nítida tendência de as cervejarias realizarem a fermentação primária e secundária em um único tanque (Figura 1). Este, normalmente, é denominado “outdoor” ou unitanque (Venturini Filho & Cereda, 2001). A utilização do processo de fermentação e maturação em dois tanques separados não é proibida, porém implica em maiores gastos com equipamentos e utilidades e menor aproveitamento do espaço disponível. Ademais do maior risco de contaminação e oxidação por causa da transferência (Tschope, 2001).



Figura 1. Fermentador / maturador da microcervejaria do Departamento de Biotecnologia da USP de Lorena (SP)

A maturação é conduzida a baixa temperatura, normalmente 0°C, por um período que varia de duas a quatro semanas. Mas em virtude dos custos envolvidos nessa fase, têm-se proposto a redução do tempo de maturação com a adoção de novas técnicas. Por exemplo, nos Estados Unidos há cervejarias que, terminada fermentação primária, com a cerveja “verde” apresentando um mínimo de diacetil e nenhum oxigênio dissolvido, maturam a cerveja a 2-4°C por 2 a 4 dias. Outros processos envolvem o chamado “repouso do diacetil”. Após a fermentação primária a cerveja é mantida a 12-18°C por uma semana (repouso do diacetil) e em seguida armazenada a frio (próximo de 0°C) por mais outra. Esse método é semelhante ao antigo sistema britânico de armazenamento a “quente” seguido por outro a frio, para melhorar o paladar da bebida (Venturini Filho & Cereda, 2001). Segundo Madrid *et al.* (1995) a cerveja verde oriunda do fermentador ainda tem um sabor grosseiro, por falta de maturação, e ainda contém açúcares que fermentam durante o período de maturação ou armazenamento. Ao finalizar a fermentação, quando cessa a produção de CO₂, as leveduras começam a sedimentar e nestas condições não turbulentas, a clarificação se acelera com o frio.

Assim, a maturação tem por objetivo: a) iniciar a clarificação da cerveja mediante a remoção, por sedimentação, das células de levedura, de material amorfo e de componentes que causam turbidez a frio na bebida; b) saturar a cerveja com gás carbônico, através da fermentação secundária; c) melhorar o odor e sabor da bebida, através da redução da concentração de diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico, bem como o aumento do teor de éster; d) manter a cerveja no estado reduzido, evitando que ocorram oxidações que comprometam sensorialmente a bebida (Almeida e Silva, 2005; Venturini Filho & Cereda, 2001).

Clarificação por sedimentação

Quando cessa a fermentação primária, o volume é mantido em repouso por alguns dias para ocorrer a separação dos fermentos (leveduras) no tanque. Uma maneira de reduzir o tempo nesta etapa é separar o fermento por meio de uma separadora centrífuga. Normalmente, não se remove todo fermento, pois a cerveja verde, como é conhecida, não tem desenvolvido todo seu sabor, e ainda possui algum açúcar disponível para posterior fermentação (fermentação secundária). Assim, este açúcar será fermentado durante a maturação por aquele fermento residual (Tornic, 1986). De acordo com Venturini Filho & Cereda (2001), na maturação, para que ocorra a fermentação secundária (e os benefícios dela decorrentes) é necessário que a cerveja verde contenha um adequado nível de extrato fermentável (0,5-1,5 % m/m) e uma

contagem de leveduras viáveis na faixa de 2 a 5.10^6 células/ml. Nesse caso, a levedura deve apresentar apenas um moderado poder de floculação. Leveduras muito floculantes sedimentam rapidamente, permanecendo poucas células em suspensão na cerveja em maturação. O tipo de levedura normalmente define o método de maturação.

Durante a fermentação e a maturação da cerveja, formam-se também redes coloidais que podem precipitar, e ocasionar a turvação da cerveja engarrafada, durante o armazenamento a frio. Esses precipitados coloidais consistem de agregados de proteínas e polifenóis, extraídos do malte e do lúpulo. No processo de fabricação de cerveja, a maioria desses precipitados se forma durante a fase de maturação a frio. Os polifenóis e as proteínas remanescentes que poderiam levar a turvação do produto envasado, durante o armazenamento a frio, são normalmente removidos por tratamento com polivinilpirrolidona (PVPP) ou sílica hidrogel, antes ou após a filtração. Foi estabelecido, há muitos anos, que somente as chamadas “proteínas precursoras de turvação” são capazes de agregar-se aos polifenóis. A literatura disponível relaciona o elevado conteúdo de prolina dessas proteínas ao processo de formação de precipitado. Na cerveja, as proteínas responsáveis pela turvação se originam, predominantemente, da fração de α -gliadina rica em prolina (hordeína) da cevada maltada. Substâncias polifenólicas tais como os flavonóides, estão presentes na maioria das plantas estando concentradas em suas sementes, pele ou casca do fruto e flores. O mecanismo que leva à formação de redes de proteínas-polifenóis foi demonstrado por experimentos de difusão. Foi observado que, antes da dimerização e precipitação, os peptídeos ricos em prolina se tornam cada vez mais cobertos com polifenóis. Acima de certa carga de polifenóis, a associação dos polifenóis entre si pode conferir estabilidade aos complexos de proteína-polifenol. Dessa forma, a associação de cadeias peptídicas ocorre simultaneamente via pontes com polifenóis e via associação de polifenóis entre si. Pode-se esperar que tais redes precipitem, turvando a cerveja, em condições de baixa temperatura (Edens *et al.*, 2006a). Segundo Edens *et al.* (2006b), entre várias opções disponíveis, o uso de adjuntos é a que, mais provavelmente, traz uma significativa contribuição para a redução do potencial de turvação a frio da cerveja. As frações de proteínas presentes no milho e no arroz têm conteúdos relativamente baixos de prolina, diluindo o nível de proteínas formadoras de turvação, que são extraídas do malte. Entretanto, resfriar a cerveja a aproximadamente 0°C num tanque de maturação, adicionar PVPP e/ou sílica hidrogel e filtrar o precipitado da cerveja continua sendo o padrão industrial para prevenção da turvação a frio. Há algumas desvantagens no

uso do PVPP. Estas incluem elevados custos operacionais, elevados custos de investimento, se o PVPP for regenerado, e uma redução do potencial antioxidante natural da cerveja, já que o PVPP se liga seletivamente aos polifenóis presentes (o PVPP se assemelha a poliprolina). Embora a sílica hidrogel tenha menor custo, sua capacidade de remoção do resíduo de proteínas formadoras de turvação é limitada, de modo que as cervejas clarificadas por este método devem apresentar estabilidade coloidal meramente marginal. Assim, estes pesquisadores desenvolveram uma solução enzimática capaz de aumentar a estabilidade coloidal da cerveja a partir do entendimento das reações químicas envolvidas no processo de turvação da cerveja, durante o armazenamento a frio. Eles sugerem a utilização da protease prolina-específica da DSM Beverage Enzymes, comercializada com o nome de “*Brewers Clax*”.

Saturação com gás carbônico

A pressão tem como efeito saturar o meio gás, no caso da fermentação com CO_2 . Isto tem como consequência, primeiramente, a redução da formação de alguns subprodutos como álcoois superiores; pode levar, também, à diminuição da velocidade da fermentação (consumo de extrato), por causa dos efeitos tóxicos deste gás sobre a levedura, ou ainda, a problemas de autólise da levedura, levando à diminuição da qualidade da espuma, escurecimento e perda da qualidade microbiológica e físico-química da cerveja. No geral, a pressão é utilizada quando já foram consumidos 85% dos açúcares disponíveis para a levedura e este residual será utilizado para a saturação gasosa do produto (Tschope, 2001). Segundo Venturini Filho & Cereda (2001), durante a fermentação secundária a cerveja é naturalmente carbonatada pelo gás carbônico produzido pela atividade da levedura e mediante uma contrapressão de CO_2 de 0,8-1,0 atm no tanque de maturação. Entretanto, dadas as dificuldades de controle da fermentação final e do nível de CO_2 no produto, as cervejarias normalmente optam por outros métodos de carbonatação. Esses outros métodos de carbonatar cerveja são chamados de mecânicos. Nesses casos utiliza-se CO_2 comprado de empresas especializadas ou recuperado na própria cervejaria, a partir do gás carbônico produzido na fermentação da cerveja. Quando recuperado, o CO_2 deve ser desidratado, purificado com carvão ativo e liquefeito. Dentre as várias técnicas de carbonatação mecânica de cerveja, as mais conhecidas são a carbonatação em linha e a carbonatação em tanque.

Na carbonatação em linha, o gás carbônico é injetado durante a passagem da bebida por uma tubulação. Um difusor produz bolhas muito pequenas de CO_2 (10-100 μm), que são facilmente absorvidas pela cerveja. Normalmente,

realiza-se a carbonatação em linha durante a transferência da cerveja filtrada para o tanque de armazenamento final (tanque de pressão).

Na carbonatação em tanque, o CO₂ é injetado na cerveja através de um difusor localizado no fundo de um tanque de armazenamento, até que se atinja uma determinada contra-pressão. Seja qual for o método empregado, o nível de CO₂ na cerveja antes do envase deve estar entre 2,5 a 2,8 v/v.

Melhora do flavour da bebida

Na maturação do sabor da cerveja, três reações têm grande influência sobre este fator: a redução na concentração de ácido sulfídrico, de acetaldeído e de diacetil. Todos estes compostos são produtos do metabolismo da levedura. Podem ser minimizados mediante a menor temperatura de fermentação, a seleção da levedura e a composição do mosto. O sulfeto de hidrogênio, ácido sulfídrico ou gás sulfídrico (H₂S), possui odor repugnante, o que, aliado ao seu baixo limite de detecção sensorial (“threshold”), torna a sua presença nas bebidas indesejável. Na fermentação da cerveja, o sulfeto de hidrogênio produzido pelas leveduras é removido durante a maturação (Carvalho *et al.*, 2007). O acetaldeído pode exceder o valor de detecção sensorial durante a fase ativa da fermentação (fermentação primária), mas normalmente é reduzido a etanol na fase de maturação. Entre os compostos carbonilados, acetaldeído e diacetil são os mais importantes. O diacetil é o composto chave na determinação das características organolépticas do produto final. Este composto determina um sabor de manteiga no produto final (Angelino, 1991).

A remoção de diacetil (2,3-butanodiona) e 2,3-pentano-diona, coletivamente denominados dicetonas vicinais, e de seus precursores, α -acetolactato e α -acetohidróxibutirato, respectivamente, é um dos principais objetivos da fermentação secundária da cerveja (Masschelein *et al.*, 1994). Três passos estão envolvidos na formação e remoção de dicetonas vicinais: 1) síntese e excreção de α -acetohidróxiácidos pela levedura, 2) descarboxilação oxidativa de α -acetohidróxiácidos até as respectivas dicetonas, e 3) redução das dicetonas vicinais pela levedura (Masschelein *et al.*, 1994). Embora ambos compostos (diacetil e 2,3-pentano-diona) sejam importantes no controle da maturação da cerveja, o diacetil é o composto que apresenta maior impacto no *flavour* do produto final (Carvalho *et al.*, 2007). De acordo com Linko *et al.* (1998), o limite de detecção sensorial do diacetil é de apenas 0,05 mg/L ou menos.

O controle eficiente da concentração de diacetil pode ser obtido de duas maneiras: a) prevenção da formação do precursor (α -acetolactato), ou b) aumento da taxa de descarboxilação química do precursor (Carvalho *et al.*, 2007).

A prevenção da formação do precursor α -acetolactato pode ser alcançada através de leveduras que contêm o gene que codifica a síntese da enzima α -acetolactatodescarboxilase integrado a seu genoma. Desta forma, o excesso de α -acetolactato produzido através da via de biossíntese do aminoácido valina é convertido diretamente a acetoína pela enzima incorporada ao genoma da levedura (Linko *et al.*, 1998). Estudos em escala piloto confirmam a possibilidade de uso desta estratégia (Kronlöf & Linko, 1992). Entretanto, a aplicação da tecnologia de DNA recombinante na cervejaria moderna pode ser retardada, ou até mesmo rejeitada, por regulações governamentais e/ou rejeição por parte do consumidor (Masschelein *et al.*, 1994).

A fase limitante na maturação da cerveja é a baixa taxa de conversão espontânea (não enzimática) de α -acetolactato em diacetil. Esta reação, como todas as reações, procede mais lentamente a baixas temperaturas, sendo limitada pela temperatura de maturação de 4°C (Linko *et al.*, 1998). Backer & Kirsop (1973), foram os primeiros pesquisadores a reportar o emprego de tratamento térmico da cerveja e rápida conversão de precursores a dicetonas vicinais e remoção dos produtos formados por células imobilizadas. Este conceito é o fundamento através do qual, processos contínuos de fermentação secundária, são utilizados em escala industrial hoje em dia. Após a fermentação principal, a levedura residual é removida por meio de uma centrifuga hermeticamente fechada, e a cerveja verde é aquecida a 90°C por 10 minutos utilizando-se trocadores de calor. Este tratamento térmico é suficiente para converter todo o α -acetolactato presente em diacetil e acetoína. Após resfriamento, o diacetil remanescente é então convertido em acetoína através de um sistema contínuo, operado em reator de leite empacotado, com células imobilizadas em DEAE celulose, um derivado granular da celulose. Um tempo de residência no reator de apenas duas horas é suficiente para completar a maturação da cerveja e alcançar níveis de diacetil inferiores ao limite de detecção sensorial (Masschelein *et al.*, 1994; Linko *et al.*, 1998). Deve-se ressaltar que não foram detectadas mudanças significativas nos espectros analíticos e sensoriais impostas por esta nova tecnologia de maturação, podendo-se citar como exemplo de aplicação industrial deste processo à produção de cerveja pela *Sinebrychoff Kerawa Brewery*, Finlândia (Virkajärvi, 2001).

É importante também saber que os álcoois superiores e ácidos graxos se formam durante a fermentação e não se modificam significativamente durante a maturação. O álcool amílico pode aumentar durante o repouso prolongado. Os ésteres aumentam na mesma proporção que se produz etanol. Durante o período de maturação são formados ésteres dando origem a aroma e sabor que caracterizam a cerveja “madura”.

Entre os ésteres formados, predominam o acetato de etila, acetato de isoamila, caproato de etila e caprilato de etila (Carvalho et al., 2007).

Prevenção das reações de oxidação

Conforme relatado por Venturini Filho & Cereda (2001), um dos objetivos da maturação, é manter a cerveja no estado reduzido, evitando que ocorram oxidações que comprometam sensorialmente a bebida. Como a maioria dos alimentos e bebidas, a cerveja não tem uma estabilidade ilimitada. As reações de oxidação parecem ser o principal mecanismo de deterioração do *flavour* da cerveja, e elas começam tão logo termina o processo de fermentação e se tenha perdido o efeito redutor natural das leveduras. Com o passar do tempo haverá desenvolvimento de compostos indesejáveis que estão presentes na cerveja fresca em níveis extremamente baixos ou como precursores. Além do fator tempo, a temperatura elevada também acelera as reações de oxidações, envelhecendo a bebida mais rapidamente.

Para desacelerar o envelhecimento da cerveja, a indústria deve: 1) usar matérias-primas de boa qualidade; 2) apresentar um processamento adequado; 3) utilizar antioxidantes, tais como sulfitos e ascorbatos; 4) reduzir ao máximo os traços de metais e a quantidade de ar na cerveja; 5) pasteurizar minimamente a cerveja; 6) armazenar

a cerveja em temperatura baixa. É muito importante também, diminuir o tempo entre o envase e o consumo. A cerveja, ao contrário das bebidas destiladas que necessitam de envelhecimento, deve ser tomada tão logo seja produzida.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a maturação é a etapa em que ocorre a fermentação secundária, saturação com CO₂, clarificação e o amadurecimento dos componentes de aroma e paladar (redução do diacetil), ou seja, confere estabilidade à cerveja. Desse modo, a maturação confere a definição das características de identidade da cerveja produzida. Pode-se concluir também que após o processo fermentativo (fermentação / maturação) a cerveja ainda não está pronta para o consumo e requer vários tratamentos (alguns citados no texto) antes de ser engarrafada. A cerveja maturada poderá passar pelos tratamentos de carbonatação; modificação de aroma e sabor; padronização da cor; estabilização contra turvação e mudança de sabor; clarificação e estabilização biológica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro da FAPESP, da CAPES e do CNPq para o desenvolvimento de projetos de pesquisa.

Referências

- ALMEIDA e SILVA, J.B. **Cerveja**. In: Venturini Filho, G. W. Tecnologia de Bebidas, pp. 347-380, Edgar Blücher, Brasil, 2005.
- ANGELINO, S.A.G.F. **Beer**. *Journal of Food Science and Technology*, v. 44, p. 581-616, 1991.
- BAKER, D.A.; KIRSOP, B.H. *Rapid beer production and conditioning using a plug fermentor*. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 79, p. 487-494, 1973.
- CARVALHO, G.B.M.; ROSSI, A.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B. *Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2ª parte – A fermentação*. *Revista Analytica*, n. 26, p. 46-54, 2007.
- EDENS, L.; van der LAN, J.M.; CRAIG, H.D. *Turvação da cerveja a frio - mecanismos e prevenção por meio de proteases específicas para prolina – Parte I*. *Engarrafador Moderno*, n. 147, p. 18-21, 2006.
- EDENS, L.; van der LAN, J.M.; CRAIG, H.D. *Turvação da cerveja a frio - mecanismos e prevenção por meio de proteases específicas para prolina – Parte II*. *Engarrafador Moderno*, n. 148, p. 44-50, 2006.
- KRONLÖF, J.; LINKO, M. *Production of beer using immobilized yeast encoding α -acetolactate decarboxylase*. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 98, p. 479-491, 1992.
- LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTILÄ, M. *Recent advances in the malting and brewing industry*. *Journal of Biotechnology*, v. 65, p. 85-98, 1998.
- MADRID, A., et al. **Manual de Indústrias de Alimentos**. 599p., São Paulo: Varela, 1ªed, 1996.
- MASSCHELEIN, C.A.; RYDER, D.S.; SIMON, J.P. *Immobilized cell technology in beer production*. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 14, p. 155-177, 1994.
- TORNIC, H.E. *Da cevada à bebida*. *Revista Alimentos e Tecnologia*, n. 07, v. 1, p. 11-16, 1986.
- TSCHOPE, E.C. **Microcervejarias e Cervejarias: A Historia, a Arte e a Tecnologia**. 223p., São Paulo: Editora Aden, Brasil, 2001.
- VENTURINI FILHO, W.G.; CEREDA, M.P. **Cerveja**. In: Almeida Lima, U., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. *Biotechnology Industrial* (Biotecnologia na produção de alimentos v.4), pp. 91-144, Edgar Blücher, Brasil, 2001.
- VIRKAJÄRVI, I. **Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast**, 2001. 137f. Tese (Doutorado em Tecnologia) – Helsinki University of Technology, Helsinki, Finlândia, 2001.