República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1103305-3 A2

(22) Data de Depósito: 27/07/2011
(43) Data da Publicação: 18/03/2014
(RPI 2254)

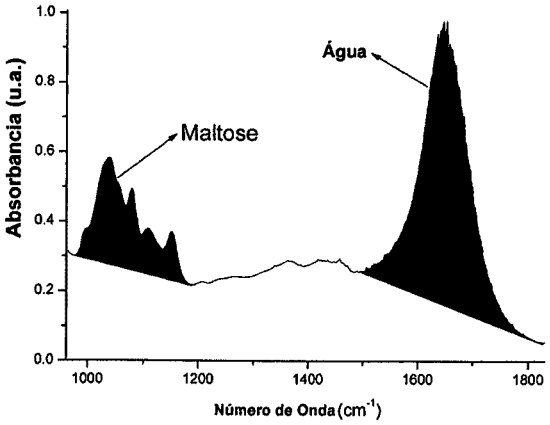
(51) Int.Cl.:
G01N 21/35

(54) Título: SISTEMA DE MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO E FERMENTAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

(72) Inventor(es): CRISTINA KURACHI, EVERTON SERGIO ESTRACANHOLLI, IGOR POLIKARPOV, VANDERLEI SALVADOR BAGNATO

(57) Resumo: SISTEMA DE MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO E FERMENTAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO A presente patente de invenção refere-se a um sistema de monitoramento da produção e fermentação do mosto cervejeiro utilizando a absorção óptica na região espectral do infravermelho, que abrange o intervalo de número de onda entre 975 cm-1 e 1190 cm-1, tomando o processo mais eficiente e obtendo um produto final mais apurado e com melhor qualidade e com economia de tempo e dinheiro.



SISTEMA DE MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO E FERMENTAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO.

A presente patente de invenção refere-se a um sistema de monitoramento da produção e fermentação do mosto cervejeiro utilizando a absorção óptica na região espectral do infravermelho, que abrange o intervalo de número de onda entre 975 cm^{-1} e 1190 cm^{-1}, tornando o processo mais eficiente e obtendo um produto final mais apurado e com melhor qualidade e com economia de tempo e dinheiro.

A mosturação é uma etapa importante do processo de fabricação da cerveja (ou chope). Nesta etapa o malte de cevada é inserido em meio aquoso, podendo-se ou não ser acrescentado adjuntos. Adjuntos são outros cereais que podem ser maltados ou não, como por exemplo, malte de trigo, arroz, milho, aveia, entre outros. A fase denominada de mosturação pode ser realizada por diversos modos, sendo os mais conhecidos o procedimento de mosturação por infusão e a mosturação por decocção. Em todos os métodos, o objetivo principal visa à conversão do amido presente nos cereais em açúcares, através da atuação de enzimas.

Geralmente as enzimas utilizadas nessa etapa de mosturação já estão presentes nos grãos do malte, porém, há a possibilidade de serem inseridas mais enzimas além destas. As enzimas responsáveis por converter o amido em açúcar são a alfa-amilase e a beta-amilase. Portanto, durante a etapa de mosturação há um decréscimo da quantidade de amido e um aumento na quantidade de açúcares. Desses açúcares, os mais importantes são a maltose e as dextrinas.

Dependendo das condições como foi produzido o malte, da forma como foi transportado, da maneira e do tempo como foi armazenado, tanto nas malterias (empresas responsáveis por maltear os cereais) como nas cervejarias, a qualidade do malte pode ser comprometida. Esses fatores podem influenciar muito fortemente na quantidade de enzimas que estão presentes no malte que ainda podem exercer sua função durante a etapa de mosturação. Dessa forma, cada vez que se utiliza o malte não se tem certeza da eficiência do processo de mosturação, sendo que, se a quantidade de

enzimas viáveis for baixa é necessário um prolongamento dessa etapa de forma a obter uma total sacarificação do amido presente no mosto. No caso de ter uma quantidade alta de enzimas com boa funcionalidade, o tempo da etapa de mosturação pode ser minimizado, obtendo economia no processo e melhor controle da qualidade do produto.

Muitas vezes deseja-se um equilíbrio entre a produção de maltose e dextrinas obtidas a partir do amido, pois esses açúcares distintos fornecem características distintas ao produto final. Dependendo de como é controlado essa etapa, pode-se produzir cervejas mais secas (tipo dry stout, por exemplo) ou mais encorpadas (sweet stout, por exemplo), com sabores e sensações organolépticas distintas. Um mal controle desse procedimento pode facilmente gerar um produto final que não se enquadre com as características desejadas, e o produto final tem que ser descartado, gerando prejuízos ou então passar por procedimentos paliativos que mesmo assim envolvem perca de tempo, dinheiro e baixa qualidade.

Portanto, é extremamente importante ter conhecimento das reações que estão ocorrendo durante o processo de fabricação do mosto cervejeiro. Caso as reações da mosturação não estejam ocorrendo conforme o planejado para que a cerveja (ou chope) se enquadre nas características necessárias que se pretende obter, seria possível fazer correções no processo de mosturação de forma a corrigir o problema e manter o produto com as especificações adequadas.

Porém, para que esse tipo de monitoramento seja possível de ser realizado é necessário utilizar de procedimentos que informe muito rapidamente as quantidades desses compostos produzidos (maltose e dextrinas), uma vez que o processo de mosturação requer pouco tempo (em torno de 2 horas).

Atualmente, os procedimentos empregados para determinar a quantidade desses compostos no mosto cervejeiro são laboratoriais e requerem um tempo longo de análise, como por exemplo, reações com ácido dinitrosalicílico (DNS), ou o uso de cromatografia líquida (HPLC). A quantificação do etanol contino na produção e fermentação do mosto cervejeiro também é uma questão que requer técnicas que

necessitam de tempo de análise longo; pessoas qualificadas e equipamentos com alto custo, como por exemplo, o HPLC. É possível realizar-se medidas indiretas, como por exemplo, através da densidade do líquido, onde através dessa estima-se quanto de açúcar ainda está presente no mosto e assim calcula-se a quantidade de álcool. Porém, esse é um método de medida indireto que não apresenta muita precisão e requer a coleta de amostras. No caso de tanques de tamanhos que abrangem centenas ou milhares de hectolitros, que realizam fermentação continuada, esse procedimento torna-se inviável, uma vez que em cada ponto do fermentador o mosto possui uma quantidade de açúcar e álcool distinta.

No objeto da presente patente, estamos nos referindo a um sistema desenvolvido com a finalidade de fornecer em tempo real (poucos segundos) a quantidade desses açúcares presente no mosto cervejeiro durante a sua produção e sua fermentação.

Outros pontos importantes a serem identificados é saber exatamente a etapa em que se encontra a fermentação do mosto para que se dê prosseguimento na etapa seguinte; a da maturação; além do controle de vários outros agentes, como por exemplo, o tempo exato de se fazer o descanso do diacetil (2,3-butanodiona). É de costume nas cervejarias que a temperatura de fermentação do mosto não seja fixa do início ao fim do processo de fermentação, esta é variável e depende muito do estágio em que se encontra a fermentação do mosto.

Sabendo-se com mais rapidez e com maior precisão o estágio da fermentação, esse procedimento de controle de temperatura pode ser feito de maneira mais eficiente e portanto gerar melhorias na qualidade do produto, redução de possíveis danos ao produto e melhor rendimento do processo quanto a economia de tempo e outros gastos.

Assim, com o intuito de superar e inovar todos os inconveninets citados acima, desenvolveu-se a presente patente de invenção, que consiste de um sistema de monitoramento para produção e fermentação do mosto cervejeiro, utilizando a absorção óptica na região espectral do infravermelho, tornado-o mais confiável, preciso, com qualidade e com economia de tempo e dinheiro.

A patente será melhor compreendida através da descrição abaixo em consonância com as figuras, onde:

A figura 1 representa um gráfico com as bandas de absorção da maltose e da água.

A figura 2 representa um gráfico com o resultado de monitoramento das bandas de absorção da maltose e da água.

A figura 3 representa um gráfico com a correlação entre o valor da área da banda entre 975 e 1190 cm^{-1}, após a normalização, e a quantidade real de maltose.

A figura 4 representa um gráfico com os espectros dos compostos puros: etanol, maltose e água.

A figura 5 representa um gráfico com a evolução temporal dos espectros do mosto durante a fermentação.

A figura 6 representa um gráfico com a correlação entre o valor da área da banda entre 1470 a 1840 cm^{-1}, após a normalização, e a quantidade real de maltose.

A figura 7 representa um gráfico com a correlação entre a quantidade determinada por HPLC e a quantidade determinada pelo processamento por PCA e Redes Neurais para a maltose.

A figura 8 representa um gráfico com a correlação entre a quantidade determinada por HPLC e a quantidade determinada pelo processamento por PCA e Redes Neurais para
o etanol.

O sistema de monitortamento se baseia na obtenção da medida da absorção óptica do mosto cervejeiro, entre 975 e 1190 cm^{-1}, para quantificar a maltose e o etanol nas duas etapas de produção do mosto cervejeiro – mosturação e fermentação.

Nesta região espectral é possível observar picos de absorção devido à presença de determinados compostos. Nesse caso de interesse, quando se analisa a absorção para o mosto cervejeiro, é possível detectar a presença de açúcares, como a maltose, na etapa de produção do mosto cervejeiro (mosturação). Dessa forma, conforme as enzimas vão produzindo esse açúcar a partir do amido observa-se um aumento na absorção em várias bandas, como por exemplo, entre 975 e 1190 cm^{-1}.

Analogamente, também podemos aplicar este sistema de monitoramento na etapa de fermentação do mosto cervejeiro. Nesta etapa ocorre a inoculação do levedo (*Saccharomyces Cerevisiae*) no mosto cervejeiro. O levedo consome os açúcares fermentáveis, como por exemplo, a maltose, a glicose e a sacarose e libera álcool etílico (ou etanol, cuja fórmula é CH_3CH_2OH para o meio. O etanol também possui a característica de ser detectável nessa mesma região do infravermelho, possuindo bandas

distintas das dos açúcares. Dessa forma, conforme os açucares são consumidos pelo levedo e este libera álcool, é possível detectar um decréscimo nas bandas de absorção dos açúcares e um aumento na intensidade das bandas de absorção do etanol.

O sistema de monitoramento também permite quantificar o etanol no processo de produção do mosto cervejeiro, no interior dos tanques, independentemente do tamanho destes. Dessa maneira obtém-se em segundos a quantidade de álcool e maltose no interior dos tanques e em qualquer ponto, sabendo-se exatamente como está ocorrendo o processo de fermentação.

Testes e análises:

Quantificação de açúcares etanol

As medidas realizadas se baseiam em saber a absorbância óptica da luz pelas amostras na região entre 975 e 1190 cm^{-1}. Essas medidas podem ser feitas utilizando equipamentos com a técnica conhecida como FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy), ou simplesmente por uma medida direta em específicos comprimentos de onda da região citada.

Este procedimento tem como propósito quantificar os açúcares fermentáveis e o etanol presentes na cerveja durante a sua produção. Como na fase de mosturação o etanol está ausente, então todo o processamento tem como objetivo quantificar os açúcares fermentáveis presentes no mosto, sendo que a maior parte deles é representada pela maltose.

Na fase de fermentação do mosto, este é constituído, entre outras coisas, por açúcares e etanol. Com sistema de monitoramento de medição e processamento, se pode quantificar ambos compostos simultaneamente com um curto tempo de processamento.

Quantificação de maltose na mosturação

Na etapa de mosturação, foram identificados nos espectros de absorbância, as bandas de absorção da maltose e da água (conforme demonstra a figura 1) através de amostras puras das mesmas. A região da maltose e do etanol, compreendida entre 975 e 1190 cm^{-1}, e a região da água, utilizada para a normalização dos dados, compreendida entre 1470 a 1840 cm^{-1}.

Na sequência, foi monitorado durante a mosturação o surgimento da banda da maltose (conforme demonstra a figura 2). Na região espectral analisada para quantificação de maltose e etanol na cerveja, identificou-se as bandas entre 975 e 1190

cm^{-1}

Os espectros foram normalizados dividindo-se cada espectro pela área de absorção da água em uma região específica (área entre 1470 a 1840 cm^{-1}). Para cada amostra foi quantificado a quantidade de maltose presente através de um método padrão aceito internacionalmente, High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Como sabemos que a intensidade da absorbância na banda do composto a ser quantificado (nesse caso sendo este a maltose), tem uma dependência com a quantidade do mesmo, então correlacionamos a área dessa banda de absorção com a quantidade de maltose determinada por HPLC. O resultado dessa correlação é demonstrado na figura 3.

A partir da figura 3, determinamos uma excelente correlação entre a área da banda de absorção da maltose e o valor da quantidade de maltose na solução. Isto prova que a partir dos valores de absorbância nessa região espectral podemos determinar a quantidade de maltose no mosto cervejeiro.

Quantificação de maltose na fermentação através de analise matematica de correlação da área da banda de absorção

Na fase de fermentação do mosto cervejeiro encontra-se presente tanto a maltose quanto o etanol. A figura 4 demonstra o espectro de absorbância da maltose, do etanol e da água. Pode-se ver que a maltose e o etanol possuem uma região de sobreposição no espectro, o que dificulta o cálculo das suas quantificações.

Durante a fermentação do mosto observou-se o consumo da maltose pelas leveduras e a produção de etanol pelas mesmas. Cada amostra obtida durante o processo de fermentação foi analisada pela espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio (975 e 1190 cm^{-1}) e a quantidade de maltose e etanol determinada por HPLC. A figura 5 demonstra a evolução espectral durante a fermentação do mosto cervejeiro.

A partir da analise dos espectros de absorbância durante a fermentação encontrou-se uma região especifica cuja composição do sinal de absorbância seja exclusivamente devido à presença da maltose, não tendo nenhuma interferência do álcool (etanol). Essa região corresponde a banda entre 1097 e 1135 cm^{-1}. Esses espectros foram normalizados, sendo divididos pela área da banda de absorção da água na região entre 1470 a 1840 cm^{-1}.

Analisou-se, para cada amostra o comportamento dessa área da banda de absorção da maltose normalizada, como descrito acima. Este valor da área foi

correlacionado com a quantidade de maltose em cada amostra determinada por HPLC. O resultado é demonstrado na figura 6.

Dos resultados obtidos na figura 6, com a alta correlação entre as grandezas analisadas, é provado que a partir do valor da absorbância nessa região do espectro é possível quantificar a maltose mesmo na presença do etanol.

Quantificação de maltose e do etanol simultaneamente durante a fermentação utilizando análise de componentes principais e redes neurais artificiais

Para a quantificação do etanol e da maltose simultaneamente utiliza-se duas técnicas de processamento nos espectros de absorção. Em um primeiro passo realiza-se uma redução do número de variáveis utilizando um procedimento de análise de componentes principais (PCA – *Principal Component Analisys*). Dessa análise utilizam-se as maiores componentes principais e desprezam-se as menores. As componentes principais são então inseridas em uma rede neural do tipo perceptron multicamadas.

Uma vez que a rede neural é treinada com amostras padrão cujas quantidades de etanol e maltose são conhecidos, então ela está apta para quantificar estes mesmos compostos em amostras com valores desconhecido. Esta técnica foi aplicada a um conjunto de amostras, e os resultados estão apresentados na figura 7 e 8, onde é feita a comparação entre os valores calculados pela rede neural e os valores quantificados por HPLC.

A partir dos resultados apresentados na figura 7 e 8 fica demonstrada a grande capacidade do procedimento aplicado em quantificar a maltose e o etanol no mosto cervejeiro.

REIVINDICAÇÕES

1) SISTEMA DE ANÁLISE DO MOSTO CERVEJEIRO, caracterizado por utilizar como controle de processo ou qualidade a medida de absorbância na região entre 975 e 1190 cm^{-1} com processamento das áreas ou intensidades das bandas de absorção nessa região, com a finalidade de quantificar a maltose.

2) SISTEMA DE ANÁLISE DO MOSTO CERVEJEIRO caracterizado por utilizar como controle de processo ou de qualidade a medida de absorbância na região espectral entre 975 e 1190 cm^{-1}, com processamento por análise de componentes principais e redes neurais, com a finalidade de quantificar a maltose e o etanol.

Fig.1

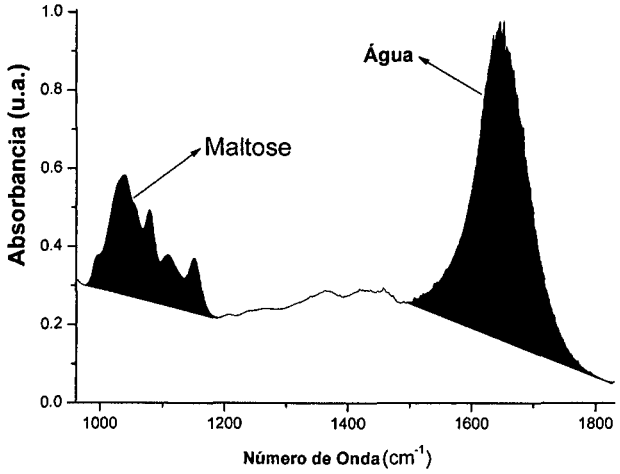

Água
Maltose
Absorbancia (u.a.)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1000
1200
1400
1600
1800
Número de Onda (cm-1)

Fig.2

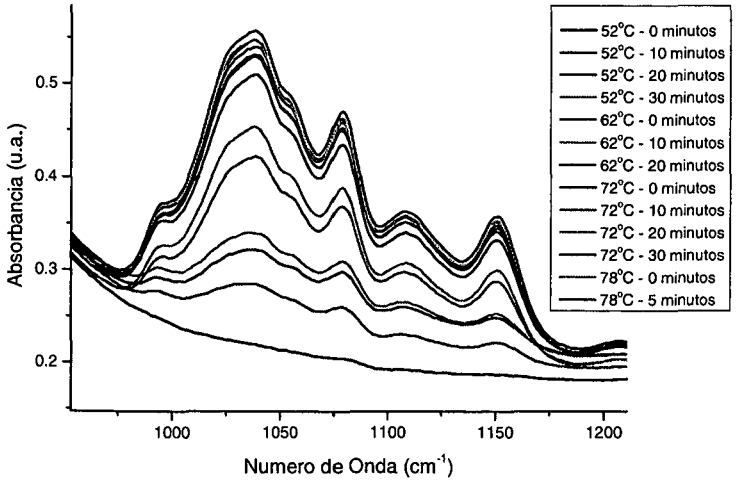

52°C - 0 minutos
52°C - 10 minutos
52°C - 20 minutos
52°C - 30 minutos
62°C - 0 minutos
62°C - 10 minutos
62°C - 20 minutos
72°C - 0 minutos
72°C - 10 minutos
72°C - 20 minutos
72°C - 30 minutos
78°C - 0 minutos
78°C - 5 minutos
Absorbancia (u.a.)
0.5
0.4
0.3
0.2
1000
1050
1100
1150
1200
Numero de Onda (cm-1)

Fig.3

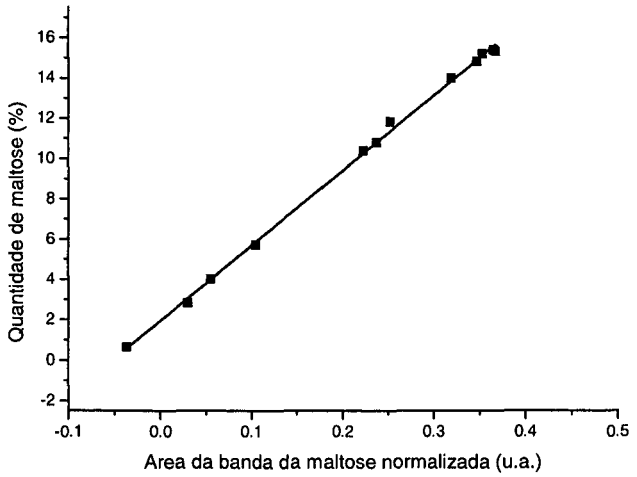

Quantidade de maltose (%)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-0.1
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
Area da banda da maltose normalizada (u.a.)

Fig.4

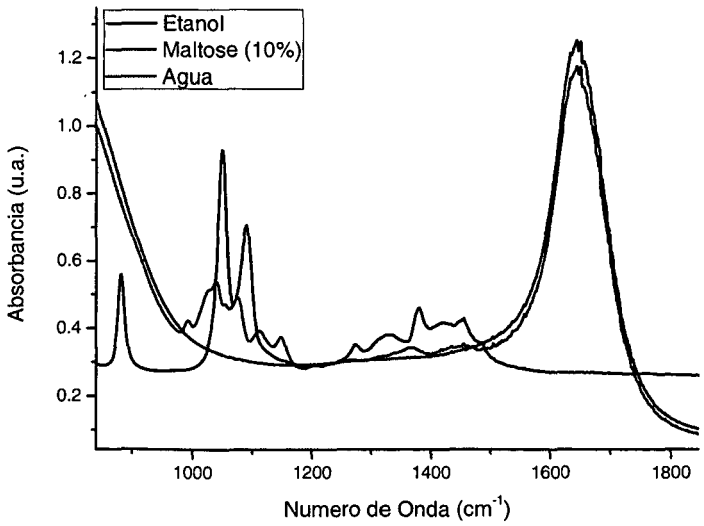

Etanol
Maltose (10%)
Agua
Absorbancia (u.a.)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
1000
1200
1400
1600
1800
Numero de Onda (cm-1)

Fig.5

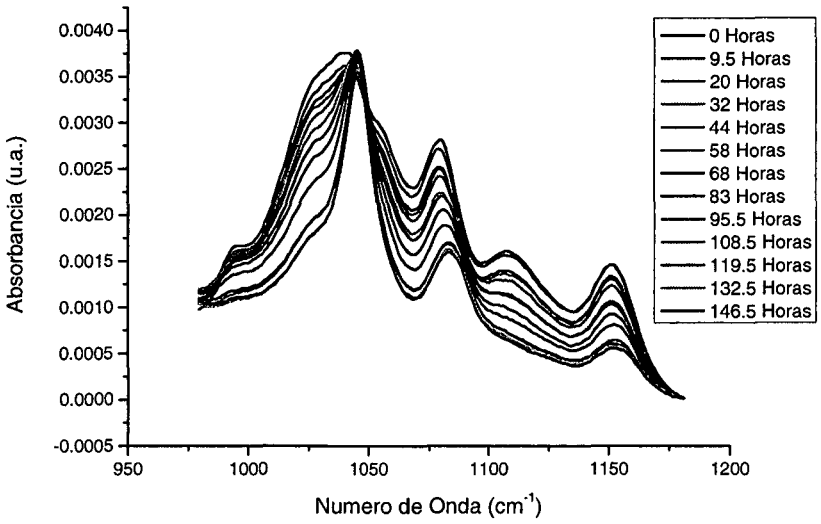

0.0040
0.0035
0.0030
0.0025
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000
-0.0005
Absorbancia (u.a.)
950
1000
1050
1100
1150
1200
Numero de Onda (cm-1)
0 Horas
9.5 Horas
20 Horas
32 Horas
44 Horas
58 Horas
68 Horas
83 Horas
95.5 Horas
108.5 Horas
119.5 Horas
132.5 Horas
146.5 Horas

Fig.6

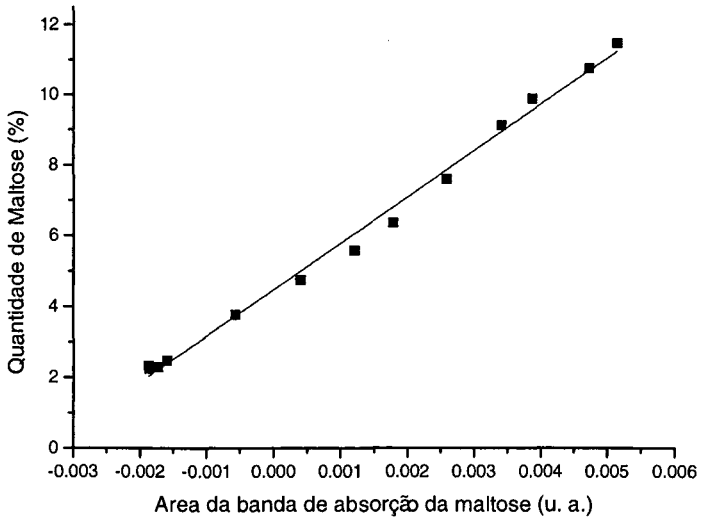

12
10
8
6
4
2
0
Quantidade de Maltose (%)
-0.003
-0.002
-0.001
0.000
0.001
0.002
0.003
0.004
0.005
0.006
Area da banda de absorção da maltose (u. a.)

Fig.7

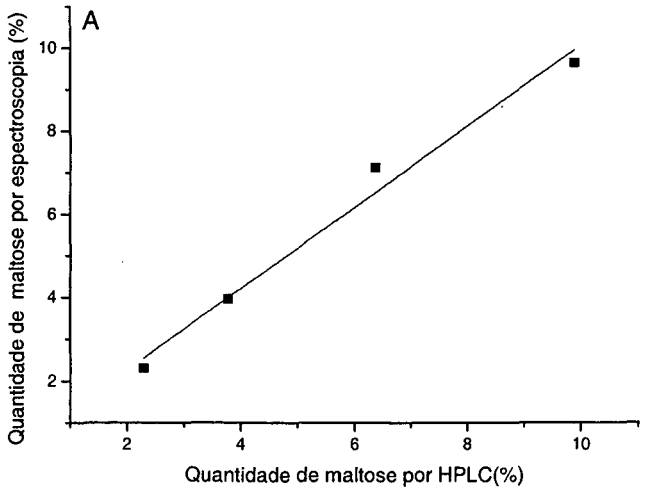
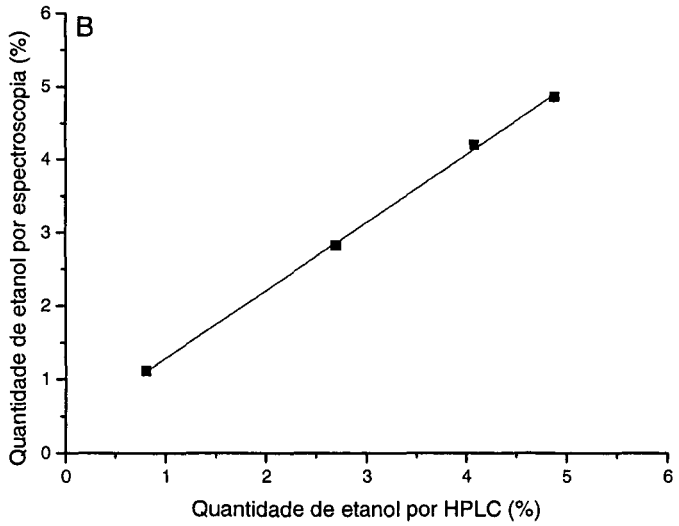

A
Quantidade de maltose por espectroscopia (%)
10
8
6
4
2
2
4
6
8
10
Quantidade de maltose por HPLC(%)

Fig.8


B
Quantidade de etanol por espectroscopia (%)
6
5
4
3
2
1
0
0
1
2
3
4
5
6
Quantidade de etanol por HPLC (%)

RESUMO

SISTEMA DE MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO E FERMENTAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO.

A presente patente de invenção refere-se a um sistema de monitoramento da produção e fermentação do mosto cervejeiro utilizando a absorção óptica na região espectral do infravermelho, que abrange o intervalo de número de onda entre 975 cm^{-1} e 1190 cm^{-1}, tornando o processo mais eficiente e obtendo um produto final mais apurado e com melhor qualidade e com economia de tempo e dinheiro.