UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

BARBARA BELODI DOS SANTOS

UTILIZAÇÃO DO PERMEADO DE LEITE COMO ADJUNTO NA PRODUÇÃO DE CERVEJA DE ALTA FERMENTAÇÃO (*ALE*).

LORENA
2016

BARBARA BELODI DOS SANTOS

UTILIZAÇÃO DO PERMEADO DE LEITE COMO ADJUNTO NA PRODUÇÃO DE CERVEJA DE ALTA FERMENTAÇÃO (*ALE*).

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, na área de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva

Edição reimpressa e corrigida

LORENA

FEVEREIRO, 2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Barbara Belodi dos
Utilização do permeado de leite como adjunto na produção de cerveja de alta fermentação (ale). / Barbara Belodi dos Santos; orientador João Batista de Almeida e Silva – ed. reimp., corr. – Lorena, 2016.
109 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2016
Orientador: João Batista de Almeida e Silva

1. Cerveja. 2. Permeado de leite. 3. Fermentação. 4. Adjunto. I. Título. II. Silva, João Batista de Almeida e, orient.

Dedico este trabalho aos grandes amores da minha vida,
Leonardo e Olivia.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus e ao Universo por toda prosperidade que tenho em minha vida. Gratidão por tudo sempre ter dado muito certo!

Ao meu orientador, Prof. João Batista, agradeço de todo coração pela confiança, carinho e amizade ao longo deste trabalho. Agradeço pela liberdade de ação e por sempre abraçar minhas ideias no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Ismael Mancilha, pelas inúmeras discussões e sugestões sobre a metodologia deste projeto, por todo auxílio e amizade, agradeço.

Ao querido estagiário, Bruno Badialle, por toda ajuda na execução das brassagens e das análises deste projeto. Estagiário, sem sua ajuda, eu não teria terminado a tempo!

Aos queridos Eduardo, Ricardo e Milena, agradeço imensamente por todos os momentos de descontração, pelas cervejas e açaís. Agradeço por toda ajuda na retirada das amostras, nos ensaios de hidrólise e por sempre estarem dispostos a me auxiliar, especialmente no tempo que não pude estar em Lorena. Vocês são demais! Vocês me emocionam!

Ao amigo Orerves, agradeço por todas as discussões sobre o trabalho, pela troca de ideias e experiências, pelo auxílio na produção da cerveja em escala piloto. Muito obrigada!

Ao técnico da cervejaria, o Waldir, por toda ajuda e por estar sempre disposto a correr atrás do necessário para que nossos experimentos pudessem ser realizados. Muito obrigada!

À Raquel Aizemberg e Diogo Hendges, obrigada pelas sugestões para melhoria deste trabalho.

Aos amigos da cervejaria: Larissa, Raquel Almeida, Matheus e Yanet, obrigada pelos momentos de descontração. Aos amigos do laboratório de enzimologia: Germano, Felipe, Mayara, Paula, Dani e Cecéu, obrigada a todos vocês pela ajuda com as análises no HPLC. Aos amigos Rafael e Túlio, obrigada pelas dicas e pela ajuda nas análises deste trabalho.

Ao André e Nadir, da secretaria de pós-graduação, por toda gentileza e por serem sempre solícitos a me ajudar.

Às meninas da república, Bruna, Miriam, Bianca e em especial a Karina, por todos os momentos de diversão e risadas.

Aos motoristas da EEL por trazerem de Cruzeiro os lotes de permeado utilizados neste trabalho.

Agradeço ao meu esposo, Leonardo, por todo amor, apoio, incentivo, carinho e compressão durante este tempo. Agradeço por partilhar comigo a maior emoção da minha vida, o nascimento da nossa Olivia, que chegou no meio deste mestrado.

À Olivia, minha queridinha, obrigada por me mostrar que sou mais forte do que sequer imaginei!

Agradeço à minha sogra, Rosa, por todas as vezes que se dispôs a sair de sua casa e vir para SJC passar semanas com a gente, auxiliando nos cuidados da casa, da roupa, da comida e da Olivia para que eu pudesse terminar de escrever este trabalho. Rosa, você é demais e tem minha eterna gratidão!

Agradeço às enfermeiras obstetras Patrícia, Tereza e Aline, por todos os ensinamentos e por todo apoio antes e após o nascimento da Olivia.

Agradeço à Josefa Fonseca, pelo carinho e apoio incondicionais, para que amamentar fosse possível, mesmo com a dificuldade em conciliar os cuidados com a Olivia e a finalização deste trabalho. Obrigada por não desistir de nós!

Agradeço a minha mãe, Cristina e às minhas irmãs, Estefânia e Sofia, por todo carinho e incentivo, e principalmente por fazerem mais leves e felizes os dias que passamos juntas ao longo destes dois anos. Agradeço a Estefânia pelos dias que passou com a gente, também ajudando a cuidar da Olivia para que eu pudesse escrever este trabalho.

Agradeço ao meu sogro, Cido, e aos cunhados Denise e Christopher, pelas conversas e discussões sobre a vida acadêmica.

Aos confrades da Confraria de Cervejeiros do Vale do Paraíbas (Concervap), por todos os encontros mensais e pelo imenso aprendizado sobre o mundo cervejeiro.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa.

Agradeço a todos que de uma forma ou outra contribuíram para este trabalho. Gratidão a todos vocês!

“Nem sempre as coisas são como sonhamos...
Mas adequamos nossos sonhos à realidade em que vivemos.”
Josefa Fonseca
(enfermeira especialista em amamentação)

RESUMO

SANTOS, B.B. **Utilização do permeado de leite como adjunto na produção de cerveja de alta fermentação (*ale*)**. 2015. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

O Brasil ocupa o 3º lugar entre os maiores produtores mundiais de cerveja e o mercado consumidor vem aumentando progressivamente. Tendo em vista que o consumidor brasileiro está em busca de novos sabores e aromas para a cerveja, uma alternativa para a redução de custos explorando tais características reside no uso de adjuntos não convencionais que possam agregar valor à bebida, principalmente na obtenção de boas características sensoriais. Ainda, visando à sustentabilidade, estes adjuntos podem ser coprodutos do processamento de alimentos. O permeado concentrado de leite, um coproduto dos laticínios, é obtido através da ultrafiltração do leite, sendo composto por água, lactose e sais. Neste trabalho foi desenvolvido um processo para a produção de uma cerveja de alta fermentação (*ale)*, utilizando o permeado concentrado de leite como adjunto de fabricação. Foram obtidas cervejas *ale* com a proporção malte/permeado de 55/45 e 90/10, utilizando para isso, permeado hidrolisado pela enzima β-galactosidase e permeado não hidrolisado. A caracterização do permeado revelou que este possui três vezes mais lactose que o soro de queijo. A melhor condição de hidrólise enzimática da lactose presente no permeado foi obtida empregando-se 2,0 mL/L de β-galactosidase em 90 minutos, alcançando 92,5% de hidrólise. Nas cervejas com permeado hidrolisado observou-se que a presença de galactose aumentou o tempo de fermentação para 168h e a atenuação real de fermentação dos mostos também foi maior em comparação as cervejas com permeado não hidrolisado, nos quais a lactose não foi fermentada. As cervejas 90/10 com permeado hidrolisado e não hidrolisado receberam as maiores notas na análise sensorial, tendo boa aceitação entre os provadores. Como não houve diferença estatística entre as duas, foi possível reduzir custo e tempo na produção da cerveja 90/10 em escala piloto (120L) por não ser necessário o processo de hidrólise enzimática. O permeado concentrado de leite mostrou-se um excelente adjunto na produção de cervejas *ale* e quando empregado em baixa concentração, produziu cervejas com boa aceitação sensorial.

Palavras-chave: Cerveja, Permeado de leite, Fermentação, Adjunto.

ABSTRACT

SANTOS, B.B. **Utilization of milk permeate as adjunct on the production of ale beer.** 2015. 109 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

Brazil ranks 3rd among the largest world producers of beer and the consumer market is increasing steadily. Considering that the Brazilian consumer is looking for new flavors and aromas to the beer, a possible solution for costs reduction exploring such characteristics is using unconventional adjuncts that can increase quality of the beverage, especially in getting good sensory characteristics. In addition, aiming at sustainability, such adjuncts can be coproducts of processing foods. The concentrated milk permeate, which is a dairy factory coproduct, is obtained by milk ultrafiltration, comprising water, lactose and salts. In this work it was development a process for the production of an ale beer using concentrated milk permeate as adjunct. Ale beers were obtained from the proportion malt/permeate 55/45 and 90/10, using both permeate hydrolyzed by β - galactosidase enzyme and permeate not hydrolyzed. The characterization of the permeate revealed that it has three times more lactose than cheese whey. The best condition of enzymatic hydrolysis of lactose present in the permeate was obtained using 2.0 mL/L of β-galactosidase within 90 minutes, reaching 92.5 % of hydrolysis. It was observed that the presence of galactose in beers wort with hydrolysed permeate increased fermentation time to 168 h and the real attenuation of fermentation were also higher compared with non-hydrolysed permeate beers, in which lactose is not fermented. The beers 90/10 with hydrolyzed and non-hydrolyzed permeate received the highest scores in sensory analysis, meaning a good acceptance among the tasters. Once there was no statistical difference between them, it was possible to reduce costs and time in beer 90/10 production on a pilot scale (120L) for not being necessary the enzymatic hydrolysis process. The concentrated milk permeate has proved to be an excellent adjunct in the production of ale beers. It produced ale beers with good sensory acceptance when used in low concentration.

Keywords: Beer. Milk Permeate. Ale Fermentation. Adjunct.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do grão de cevada. 24

Figura 2 - Estrutura dos β e α-ácidos do lúpulo. 26

Figura 3 - Fluxograma de fabricação de queijos e obtenção de caseína, concentrado proteico de soro (CPS) e permeado de soro. 32

Figura 4 - Fluxograma de obtenção do permeado de leite e permeado concentrado de leite. 34

Figura 5 - Fluxograma de produção das cervejas. 56

Figura 6 - Programação de tempo e temperatura no processo de mosturação. ... 57

Figura 7 – Armazenamento dos ensaios com permeado concentrado de leite para determinar sua vida de prateleira. 62

Figura 8 – Aparência dos ensaios com 10 ppm de α-ácidos (A) e do permeado pasteurizado (B), no 15º dia de experimento. 63

Figura 9 – Aparência dos ensaios com 5 ppm de α-ácidos (C) e 10 ppm de α-ácidos (D) após agitação do líquido, no 15º dia de experimento. 64

Figura 10 - Perfil de hidrólise da lactose com 1,0 mL/L de enzima, pH 6,5 e 40 ºC. 68

Figura 11 - Perfil de hidrólise da lactose com 1,0 mL/L de enzima, 40 ppm de α-ácidos, pH 6,5 e 40 ºC. 69

Figura 12 - Perfil de hidrólise da lactose com 1,5 mL/L de enzima, pH 6,5 e 40 ºC. 70

Figura 13 - Perfil de hidrólise da lactose com 2,0 mL/L de enzima, pH 6,5 e 40 ºC. 71

Figura 14 - Perfil de hidrólise da lactose com 3,5 mL/L de enzima, pH 6,5 e 40 ºC. 72

Figura 15 - Perfil de fermentação da cerveja puro malte. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL). 76

Figura 16 - Perfil de fermentação da cerveja 55/45 com permeado não hidrolisado. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL). 78

Figura 17 - Perfil de fermentação da cerveja 90/10 com permeado não hidrolisado. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL). 79

Figura 18 - Perfil de fermentação da cerveja 55/45 com permeado hidrolisado em pH 6,5, 40 ºC, 90 minutos e 2,0 mL/L de β-Galactosidase. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL). 80

Figura 19 - Perfil de fermentação da cerveja 90/10 com permeado hidrolisado em pH 6,5, 40 ºC, 90 minutos e 2,0 mL/L de β-Galactosidase. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL). 81

Figura 20 - Aparência das cervejas produzidas com diferentes proporções de malte/permeado concentrado de leite. 83

Figura 21 - Distribuição dos provadores por sexo e ocupação. 84

Figura 22 - Distribuição dos provadores quanto à frequencia de consumo de cerveja. 84

Figura 23 - Conhecimento e preferência dos provadores por cervejas de alta fermentação (ale). 85

Figura 24 – Distribuição dos provadores por faixa etária. 85

Figura 25 - Preferência por lager ou ale, por faixa etária dos provadores. 86

Figura 26 - Frequencia de consumo de cerveja, por faixa etária dos provadores. 87

Figura 27 – Estilos de cerveja preferidos pelos provadores. 87

Figura 28 - Perfil de fermentação do mosto 90/10 com permeado não hidrolisado, produzido em escala piloto. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL). 90

Figura 29 - Comparação no consumo de extrato aparente dos mostos 90/10 com permeado não hidrolisado, em escala de bancada (10L) (●) e escala piloto (120L) (■). 91

Figura 30 - Comparação na produção de etanol dos mostos 90/10 com permeado não hidrolisado, em escala de bancada (10L) (●) e escala piloto (120L) (■). 92

Figura 31 - Comparação do perfil de células em suspensão dos mostos 90/10 com permeado não hidrolisado, em escala de bancada (10L) (●) e escala piloto (120L) (■). 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais países produtores de cerveja de 2010 a 2012. 21

Tabela 2 - Volume de produção dos dez maiores grupos cervejeiros mundiais em 2014. 21

Tabela 3 - População, PIB, produção e consumo per capita de cerveja na América Latina no ano de 2012. 22

Tabela 4 - Composição química (mg/L) de águas cervejeiras famosas. 28

Tabela 5 - Composição do permeado de soro, soro doce e CPS (base seca) 32

Tabela 6 - Temperatura e pH ótimos das enzimas na mosturação. 41

Tabela 7 - Subprodutos de fermentação com respectivos sabor/aroma que conferem à cerveja. 45

Tabela 8 - Laudo do malte tipo Pilsen. 49

Tabela 9 - Ensaios para estudo da vida de prateleira do permeado. 52

Tabela 10 - Condições testadas da hidrólise enzimática da lactose por β-Galactosidase, em pH 6,5 e 40 ºC. 54

Tabela 11 - Composição centesimal do soro de queijo e do permeado concentrado de leite. 61

Tabela 12 - Composição do permeado de leite e permeado de leite em pó por diferentes autores. 62

Tabela 13 - Variação de pH nos ensaios com permeado in natura, pasteurizado e com 40 ppm de α-ácidos. 64

Tabela 14 - Variação de pH nos ensaios com permeado adicionado de 30, 20, 10 e 5 ppm de α-ácidos. 65

Tabela 15 - Variação da acidez nos ensaios com permeado in natura, pasteurizado e com 40 ppm de α-ácidos. 66

Tabela 16 – Variação da acidez nos ensaios com permeado adicionado de 30, 20, 10 e 5 ppm de α-ácidos. 66

Tabela 17 - Contagem de bactérias dos ensaios com permeado, no meio PCA. 67

Tabela 18 - Grau de hidrólise da lactose (%) durante os ensaios com diferentes concentrações de β-galactosidase. 73

Tabela 19 - Concentração de glicose e galactose (g/L) durante os ensaios com diferentes concentrações de β-galactosidase. 73

Tabela 20 - Concentração de lactose (g/L) no permeado durante a hidrólise com diferentes concentrações de β-galactosidase. 74

Tabela 21 – Concentração de lactose (g/L) no permeado com 90 minutos de hidrólise em diferentes concentrações de β-galactosidase. 75

Tabela 22 - Análise físico-química da cerveja puro malte e das cervejas com permeado concentrado de leite, em diferentes proporções. 81

Tabela 23 - Notas dos atributos sensoriais e intenção de compra da análise sensorial das diferentes cervejas. 88

Tabela 24 – Produtividade e tempo de fermentação das cervejas produzidas com diferentes proporções de malte/permeado. 93

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DA LITERATURA 19
2.1 A CERVEJA NO BRASIL 19
2.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA 22
2.3 MATÉRIAS-PRIMAS 23
2.3.1 Malte 23
2.3.2 Lúpulo 25
2.3.3 Água 27
2.4 ADJUNTOS 29
2.4.1 Permeado de leite 30
2.4.2 Soro de queijo como adjunto na fabricação de cerveja 34
2.5 LEVEDURA 36
2.5.1 *Saccharomyces cerevisiae* 36
2.6 ENZIMA β-GALACTOSIDASE 38
2.7 O PROCESSO CERVEJEIRO 39
2.7.1 Moagem 39
2.7.2 Mosturação 40
2.7.3 Filtração ou clarificação 42
2.7.4 Fervura e lupulagem 42
2.7.5 Separação do *trub* e resfriamento do mosto 43
2.7.6 Fermentação 43
2.7.7 Maturação 45
2.7.8 Filtração 46
2.7.9 Envase 47
2.8 ANÁLISE SENSORIAL 47
3 OBJETIVOS 48
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 48
4. MATERIAL E MÉTODOS 49
4.1 MATERIAIS 49
4.1.1 Água 49
4.1.2 Malte 49
4.1.3 Lúpulo 50

4.1.4 Levedura *ale* 50
4.1.5 Permeado Concentrado de leite 50
4.1.6 Enzima β-galactosidase 50
4.1.7 Extrato de lúpulo 51
4.2 MÉTODOS 51
4.2.1 Caracterização do permeado concentrado de leite 51
4.2.2 Estudo da vida de prateleira do permeado concentrado de leite 52
4.2.3 Determinação da condição de hidrólise enzimática da lactose 53
4.2.4 Produção das cervejas 55
4.2.5 Produção em escala piloto 59
4.2.6 Análise sensorial 59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 61
5.1 Caracterização do soro de queijo e do permeado 61
5.2 Análises da vida de prateleira do permeado 62
5.2.1 pH 63
5.2.2 Acidez titulável 65
5.2.3 Contagem padrão em placas 67
5.3 Hidrólise enzimática da lactose 68
5.4 Parâmetros de fermentação 75
5.5 Análise Sensorial 83
5.6 Produção em escala piloto 90
5.7 Produtividade em etanol 93
6. CONCLUSÕES 95
REFERÊNCIAS 97
APÊNDICE A 105
APÊNDICE B 108

1 INTRODUÇÃO

A história da cerveja mistura-se à história da humanidade e relatos apontam que o surgimento da bebida se deu na Mesopotâmia. Há também evidências de que a cerveja já era fabricada na Babilônia em 6000 a.C (ALMEIDA e SILVA, 2005).

Os egípcios fizeram a cerveja se tornar conhecida por outros povos fazendo com que chegasse à Europa, e a partir daí espalhou-se para o resto do mundo (ALMEIDA e SILVA, 2005).

Atualmente o Brasil aparece em 3º lugar entre os produtores mundiais de cerveja (OLIVEIRA, 2013).

Entende-se por cerveja a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (BRASIL, 2009).

Com a expansão e divulgação da cultura cervejeira no país, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, órgão responsável pela regulamentação do setor, estuda a possibilidade de alterar a legislação e permitir a utilização, como adjuntos cervejeiros, de produtos de origem animal como leite, mel, ou que contenha ingredientes de origem animal, como o chocolate, além de ingredientes como frutas, ervas, vegetais e flores no processo de fabricação de cerveja (REIS, 2013).

Tais ingredientes são sugestões do setor cervejeiro que busca aumentar a concorrência do produto brasileiro com cervejas importadas, nas quais o uso de tais ingredientes já é permitido em seus países de origem, e também ofertar ao consumidor brasileiro novas possibilidades de aromas e sabores para a bebida.

Segundo a legislação brasileira, adjuntos podem ser utilizados em substituição parcial ao malte de cevada na fabricação da cerveja, desde que não excedam 45% em relação ao extrato primitivo, para que a bebida ainda possa ser denominada “cerveja” (BRASIL, 2001).

Os adjuntos atualmente utilizados pelas grandes cervejarias são outros cereais, como milho e arroz, pois são fontes mais baratas de açúcares em relação ao malte de cevada. Contudo, principalmente as microcervejarias, têm procurado

por novos adjuntos que possam agregar valor à bebida, principalmente na obtenção de boas características sensoriais.

O permeado de leite é um coproduto da indústria de laticínios obtido através do processo de ultrafiltração do leite e possui elevada concentração de lactose.

A lactose, por ser um açúcar, pode contribuir como extrato fermentável (quando submetida à hidrólise enzimática para quebra em glicose e galactose) na produção de cerveja e ainda como extrato não fermentável, deixando um residual doce e agregando sabor à bebida.

Tendo em vista que o permeado de leite contém três vezes mais lactose do que o soro de queijo e que ainda possui cerca de 82% de água em sua composição, sua utilização como um novo adjunto na fabricação de cerveja torna-se uma alternativa inovadora para o desenvolvimento de uma bebida com alto valor agregado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A CERVEJA NO BRASIL

Embora já conhecida e consumida em outras partes do mundo, a cerveja só chegou ao Brasil no século XVII junto com os holandeses, trazida pela Companhia das Índias Orientais. Em 1654 os holandeses deixaram o país e a cerveja desapareceu, reaparecendo apenas com a chegada da Família Real portuguesa que desembarcou no Brasil Colônia em 1808 (MORADO, 2009).

Nesta época a bebida alcoólica mais consumida era a cachaça, além de vinhos e licores importados da França e de Portugal para atender à nobreza.

Em 1830 as famílias de imigrantes começaram a produzir cerveja, mas apenas para seu próprio consumo. Até 1870 as cervejas inglesas dominaram o mercado brasileiro devido à influência que a Inglaterra exercia sobre Portugal, nesta época. Contudo, no século XIX o governo quadruplicou os impostos de modo a impossibilitar a entrada de produtos estrangeiros no país. Até este momento a produção de cerveja no país se fazia artesanalmente e com muitas dificuldades devido à falta de matérias-primas importadas como a cevada e o lúpulo, e principalmente por problemas como a refrigeração, pois se trata de um país tropical e as máquinas a vapor para resfriamento da bebida eram raras e caras (MORADO, 2009).

Pequenas cervejarias surgiram no Rio de Janeiro, em São Paulo e no Sul do país antes de 1850 e algumas conseguiram alcançar a escala industrial de produção, como a cervejaria Henrique Kremer de Petrópolis/RJ em 1854, que passou a se chamar Imperial Fábrica de Cerveja Nacional em 1876 e que em 1898 mudou seu nome para Cervejaria Bohemia. Um ano antes surgiram também duas cervejarias que fariam história no país: a Cia. Cervejaria Brahma e a Cia. Antarctica Paulista (MORADO, 2009).

No início do século XX houve o surgimento de várias microcervejarias, o início da industrialização e a chegada de muitos imigrantes europeus ao Brasil. Mas com o advento de duas Grandes Guerras o cenário mudou, pois houve

impacto direto na produção da bebida devido à escassez de matérias-primas, o que levou a uma drástica diminuição na produção de cerveja (MORADO, 2009).

Vale destacar a fusão entre a Cia. Antarctica Paulista e a Cervejaria Brahma, em 1999, originando a AmBev – Companhia de Bebida das Américas. A criação da AmBev e sua posterior fusão com a belga Interbrew, originando a InBev, foram os dois fatos mais marcantes da história da cerveja brasileira e mundial. A partir de 2004 passou a ser denominada de AB InBev, pela fusão com a Anheuser-Busch (MORADO, 2009), e a nova empresa tornou-se a maior produtora de cerveja do mundo cuja produção em milhões de hectolitros correspondeu a 21,0% da produção mundial no ano de 2014. (BARTH-HAAS GROUP, 2015).

Em 2015, a AB InBev adquiriu a segunda cervejaria de maior volume de produção do mundo, a britânica SABMiller e ambas agora representam 30,5% do mercado mundial de cervejas. A compra foi anunciada como a terceira maior fusão empresarial da história (CERVEJARIAS..., 2015).

O mercado consumidor de cerveja apresenta-se fiel e crescente, sendo a cerveja o principal produto do setor de bebidas. O mercado é afetado pela sazonalidade, com aumento no volume de vendas no quarto trimestre do ano, por causa da estação do ano e das festividades do período (ROSA et al., 2006).

Nos últimos anos, no setor cervejeiro brasileiro observa-se a produção de novos estilos da bebida (OLIVEIRA, 2013).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com intuito de adequar os avanços tecnológicos e promover a igualdade de condições e competitividade frente aos produtos importados, está atualizando os padrões de qualidade da bebida. Segundo dados do Sistema Integrado de Produtos e Estabelecimentos (SIPE/MAPA), 232 cervejarias e 1.110 tipos de cervejas estão registrados no Brasil (OLIVEIRA, 2013).

Nos anos de 2010 a 2012 o Brasil ocupou o terceiro lugar entre os países produtores de cerveja no mundo, com uma produção de 132.800 milhões de hectolitros da bebida em 2012. Em primeiro lugar está a China e em segundo os Estados Unidos. Os demais países produtores com suas respectivas produções encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais países produtores de cerveja de 2010 a 2012.

		Produção de cervejas em milhões de hectolitros		
	País	**2010**	**2011**	**2012**
1	CHINA	448.304	489.880	490.200
2	EUA	228.982	226.480	229.314
3	BRASIL	128.700	133.000	132.800
4	RÚSSIA	102.930	98.140	97.400
5	ALEMANHA	95.683	95.545	94.618
6	MÉXICO	79.889	81.500	82.500*
7	JAPÃO	58.100	56.000	55.465
8	REINO UNIDO	44.997	45.694	42.049
9	POLÔNIA	36.000	36.000	37.800
10	ESPANHA	33.375	33.573	33.000
11	ÁFRICA DO SUL	29.600	30.870	31.500
12	UCRÂNIA	31.000	30.510	30.050
13	VIETNAM	26.500	27.800	29.800
14	HOLANDA	23.936	23.647	24.272
15	NIGERIA	17.600	19.596	24.000*
16	TAILÂNDIA	19.950	20.600	23.700
17	COLÔMBIA	20.500	21.000	22.550
18	VENEZUELA	20.000	23.500	21.470
19	CANADÁ	19.647	19.515	19.525
20	ÍNDIA	15.600	18.500	19.500*
	* Estimado			

Fonte: Adaptado (BARTH-HAAS GROUP, 2013).

Na Tabela 2 relacionam-se os dez maiores grupos cervejeiros mundiais em 2014, dados anteriores à fusão da AB Inbev com a SABMiller.

Tabela 2 - Volume de produção dos dez maiores grupos cervejeiros mundiais em 2014.

Posição	**Cervejaria**	**País**	**Volume de produção em milhões de hectolitros**	**Porcentagem da produção mundial de cerveja**
1	AB InBev	Bélgica	411,5	21,0%
2	SABMiller	Reino Unido	187,8	9,6%
3	Heineken	Holanda	181,3	9,3%
4	Carlsberg	Dinamarca	122,8	6,3%
5	China Res. Snow Breweries	China	118,4	6,0%
6	Tsingtao Brewery Group	China	76,2	3,9%
7	Molson-Coors	EUA/Canadá	59,0	3,0%
8	Yanjing	China	53,1	2,7%
9	Kirin	Japão	46,6	2,4%
10	BGI / Groupe Castel	França	31,7	1,6%

Fonte: Adaptado (BARTH-HAAS GROUP, 2015).

Segundo relatório do Barth-Haas Group (2013) a produção de cerveja nas Américas (Tabela 3) foi de 571,1 milhões de hectolitros em 2012, sendo 5,8 milhões de hectolitros a mais que no ano de 2011. O Brasil mantém-se como o maior produtor na América Latina e seu consumo per capita de 62L perde apenas para a Venezuela, com 75L per capita. A Ambev detém 69% da parcela de mercado no país, sendo seguida pelo grupo Brasil Kirin e Heineken (BARTH-HAAS GROUP, 2013).

Tabela 3 - População, PIB, produção e consumo per capita de cerveja na América Latina no ano de 2012.

País	População em milhões de habitantes	PIB em bilhões de dólares	Produção de cerveja em milhões de hectolitros	Consumo de cerveja per capita em litros
Brasil	196.7	2449.8	132.800	62
Colômbia	46.9	378.7	22.500	43
Venezuela	29.3	337.5	21.470	75
Argentina	40.8	472.8	16.700	44
Peru	29.4	184.9	13.200	49
Chile	17.3	272.1	6.000	40
Equador	14.7	72.5	5.925	40

Fonte: Adaptado (BARTH-HAAS GROUP, 2013).

2.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

Segundo o Decreto 6.871/2009 (BRASIL, 2009), que ainda encontra-se em vigor, “cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”.

Parte do malte de cevada pode ser substituída por adjuntos cervejeiros, desde que respeitado o limite de 45% em relação ao extrato primitivo. Quando se tratarem de açúcares vegetais diferentes dos provenientes de cereais a quantidade máxima de açúcar empregada em relação ao extrato primitivo será menor ou igual

a 10% em peso para cerveja clara e menor ou igual a 10% do extrato primitivo para cerveja extra (BRASIL, 2009).

As cervejas brasileiras são classificadas de acordo com cinco critérios (BRASIL, 2009):

- *quanto ao extrato primitivo*: em cerveja leve, cerveja ou cerveja comum, cerveja extra e cerveja forte;

- *quanto à cor:* em cerveja clara, cerveja escura e cerveja colorida;

- *quanto ao teor alcoólico*: cerveja sem álcool e cerveja com álcool;

- *quanto à proporção de malte de cevada*: cerveja puro malte (composta por 100% malte de cevada, em peso), cerveja (a que possuir proporção de malte de cevada maior ou igual a 55%, em peso) e cerveja de..., seguida do nome do vegetal predominante, como por exemplo “cerveja de trigo” (quando a proporção de malte de cevada for maior que 20% e menor que 55%, em peso);

- *quanto à fermentação*: de alta ou baixa fermentação.

No Brasil, diferentemente da legislação de outros países, faz-se uma distinção entre a cerveja que não foi submetida a processo de pasteurização para consumo, sendo denominada de Chope ou Chopp. Ressalta-se que a palavra chope vem de *schoppe*, originária do dialeto alemão, que significa “copo de meio litro” (medida de volume utilizada pelos bares antigamente) (MORADO, 2009).

2.3 MATÉRIAS-PRIMAS

2.3.1 Malte

Malte é o produto obtido pela germinação e secagem da cevada, devendo o malte de outros cereais ter a designação acrescida do nome do cereal de sua origem (BRASIL, 2009). A cevada maltada é o cereal mais utilizado no mundo para fabricação de cerveja (PALMER, 2006a).

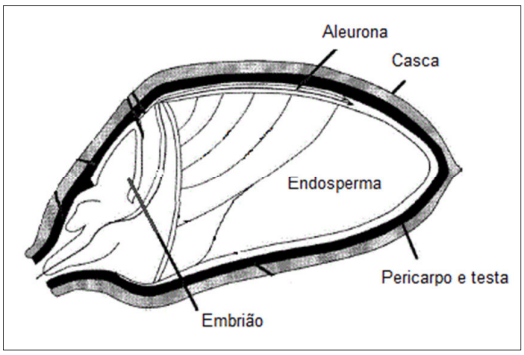
Embora a cevada de 6 fileiras contenha mais grãos por espiga estes são muito pequenos para fins de maltagem, apresentam menor teor de amido, maior riqueza proteica e mais cascas (PALMER, 2006a). A cevada de 2 fileiras, de haste curta e de verão, é a melhor para fins cervejeiros devido à uniformidade do tamanho dos grãos, o que implica em maior teor de amido (extrato fermentável).

Apresenta também adequado equilíbrio entre quantidade e qualidade de proteínas que são suficientes para nutrição das leveduras durante a fermentação e para a formação de espuma no produto final (TSCHOPE, 2001).

O grão de cevada é constituído por uma casca externa (10-12%), pericarpo e testa (2-3%), camada de aleurona (4-5%), endosperma amiláceo (77-82%) e embrião (2-3%), conforme apresentado na Figura 1.

A casca é constituída de material celulósico, proteínas, resina e taninos em menor quantidade, e apresenta importância tecnológica, pois é o elemento filtrante na etapa de filtração do mosto. A casca tem por função proteger o grão e quando lesada expõe o embrião à presença de micro-organismos, como fungos e bactérias, naturalmente presentes na matéria-prima, implicando na diminuição da qualidade do produto (PALMER, 2006a).

Figura 1 - Estrutura do grão de cevada.



Fonte: (PALMER, 2006a) - adaptado e traduzido pelo autor.

O endosperma amiláceo é um tecido de reserva que acumula amido no interior de suas células. O amido é composto por cerca de 30% de amilose (de cadeia linear) e 70% de amilopectina (de cadeia ramificada e elevado peso molecular), que quando hidrolisadas comporão o extrato fermentável do mosto (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001).

Maltagem

A finalidade fundamental da maltagem é elevar o conteúdo enzimático dos grãos de cevada ou de outros cereais, como milho, trigo e arroz, através da síntese de enzimas, aumentando assim o seu poder diastático, ou seja, seu potencial de

hidrolisar o amido. As enzimas geradas são de extrema importância para a fase de mosturação, pois catalisarão a quebra de macromoléculas em componentes solúveis no mosto (PALMER, 2006a).

As etapas básicas de maltagem são a maceração, germinação e secagem ou torrefação (ALMEIDA e SILVA, 2005). Nesta última etapa incorpora-se a maior parte do sabor característico do grão, determina-se a cor (quanto mais torrado o malte, mais escura a cerveja) e o aroma (caramelo, chocolate, café, etc..) (MORADO, 2009).

Segundo Reinold (2015) os maltes são classificados como maltes base e maltes especiais. Os maltes base são os responsáveis por fornecer a maior parte das enzimas necessárias à transformação do amido em açúcares fermentáveis (possuem maior poder diastático que os maltes especiais). São considerados maltes base o malte Pilsen (cor até 2 EBC[1]) e o malte *ale* (cor até 5 EBC) (PALMER, 2006a).

Segundo Palmer (2006a) os maltes especiais são produzidos a partir do malte pale, que é aquecido a diferentes temperaturas de secagem e torrefação para produzir os tipos distintos de malte. Este autor cita como exemplos: malte amber, sabor/aroma de nozes e biscoito, coloração de 100 a 140 EBC; malte chocolate, sabor/aroma de melaço e chocolate, coloração de 900 a 1100 EBC.

Os maltes especiais são utilizados em menor proporção nas receitas, podendo-se combinar diferentes tipos e quantidades de acordo com o estilo de cerveja que será produzido (REINOLD, 2015). Contribuem com características únicas para a cerveja como sabor, cor, proteínas de médio peso molecular que auxiliam na estabilidade da espuma e corpo, entre outras (REINOLD, 2015).

2.3.2 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é a flor cônica de plantas trepadeiras nativas das regiões temperadas da América do Norte, Europa e Ásia. Sua utilização se dá desde a Idade Média no processo de produção de cervejas com a função de conservante natural, pois como o processo de fermentação não era controlado, e a produção de cerveja nos meses muito quentes tornava-se difícil devido ao

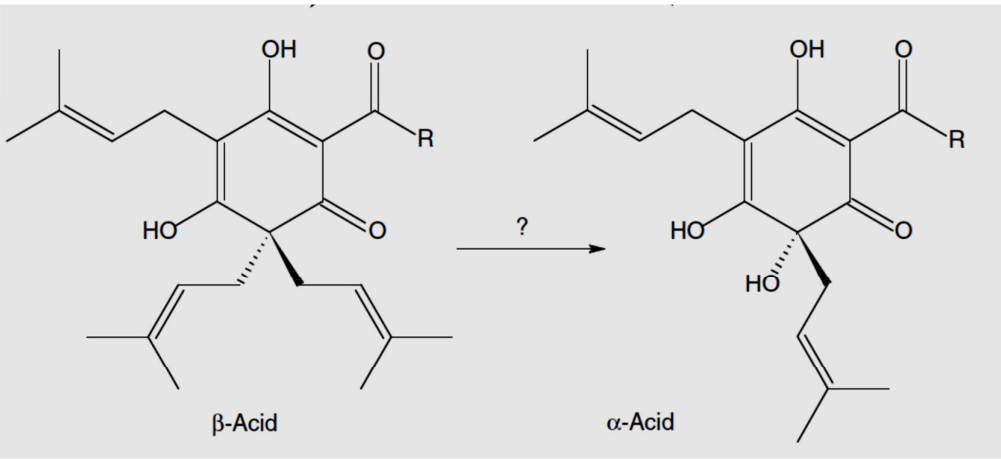
[1] EBC são unidades de cor adotadas como referência na Europa, e podem se referir à cor do malte ou à cor do mosto.

desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes (MORADO, 2009). O lúpulo apresenta ação antisséptica, pois os iso-α-ácidos são bacteriostáticos e contribuem para a estabilidade do sabor e da espuma da cerveja (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001).

Segundo Silva e Faria (2008) o lúpulo se constitui de óleos essenciais (0,2-3,0%), β-ácidos ou lupulonas (1,5-9,5%) e de α-ácidos ou humulonas (2,0-16,0%). As proporções de cada um destes compostos dependem da variedade da planta, podendo contribuir com mais ou menos amargor e aroma da bebida.

Os β-ácidos contribuem em menor intensidade para o amargor e possuem ação bactericida sobre bactérias gram positivas, agindo no transporte de metabólitos na membrana celular e alterando o pH intracelular, inibindo fortemente o crescimento bacteriano (SILVA; FARIA, 2008).

Figura 2 - Estrutura dos β e α-ácidos do lúpulo.



Fonte: (ROBERTS; WILSON, 2006).

Em pesquisa realizada por Almeida e Silva et al. (2014), avaliando o potencial de α e β-ácidos do lúpulo no controle biocida do processo fermentativo verificou-se que o uso de α-ácido na concentração de 40 ppm propiciou redução das células vivas das bactérias *L. casei* e *L. plantarum*, de 10^8 UFC/mL para 10^5 UFC/mL. Quando testada a mesma concentração de α-ácido na presença de *Saccharomyces cerevisiae*, observou-se que não houve influência sobre o cultivo desta levedura em condição de aerobiose e com agitação (120rpm) em meio sintético Sabouraud na temperatura de 25°C.

O amargor proporcionado pelo lúpulo equilibra a doçura dos açúcares do malte e proporciona um final refrescante, sendo uma característica marcante em alguns estilos de cerveja (MORADO, 2009). O principal agente do amargor é uma resina chamada de α-ácido, que é insolúvel em água, mas quando submetida às elevadas temperaturas da fervura do mosto sofre isomerização, convertendo-se em iso-α-ácidos, que são solúveis em água. Quanto maior o tempo de ebulição, maior o percentual de isomerização e mais amarga a cerveja será (ROBERTS; WILSON, 2006).

O amargor da cerveja acabada é mensurado pelo sistema Internacional de Unidades de Amargor (International Bitterness Unit – IBU). IBU é a medida da concentração de iso-α-ácidos na cerveja, sendo que 1 IBU corresponde a 1mg de iso-α-ácido por litro de cerveja (DANIELS, 2000).

Há muitas variedades de lúpulo, mas estes podem ser divididos em duas categorias gerais (PALMER, 2006b):

- Amargor: são ricos em α-ácidos (cerca de 10% de seu peso) e são acrescentados no início da ebulição e fervidos durante cerca de uma hora;

- Aroma: possuem baixo teor de α-ácidos e maiores proporções de β-ácidos e são acrescentados no final da fervura e normalmente fervidos por 15 minutos ou menos, para retenção do aroma.

2.3.3 Água

A água é o principal componente da cerveja e corresponde a aproximadamente de 92 a 95% de seu peso (ALMEIDA e SILVA, 2005).

Para ser utilizada na brassagem não pode apenas satisfazer os requisitos de água potável, mas deve apresentar as seguintes características:

- assegurar o pH durante a mosturação;

- promover a extração dos componentes aromáticos e amargos do lúpulo;

- proporcionar uma boa coagulação do *trub* durante a fervura do mosto;

- permitir a fermentação asséptica;

- desenvolver cor, aroma e sabor característico do estilo de cerveja a ser fabricado (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001).

Historicamente as cervejarias originaram-se em locais que possuíam suprimentos particulares de água de qualidade. Os dados da Tabela 4 indicam

como determinados centros cervejeiros tornaram-se famosos por determinados tipos de cerveja, em consequência da composição da água (TAYLOR, 2006).

Tabela 4 - Composição química (mg/L) de águas cervejeiras famosas.

	Burton	**Munich**	**Londres**	**Pilsen**
Ca^{2+}	268	80	90	7
Mg^{2+}	62	19	4	1
Na^{+}	30	1	24	3
HCO_3^{-}	141	164	123	9
SO_4^{2-}	638	5	58	6
Cl^{-}	36	1	18	5
NO_3^{-}	31	3	3	0

Fonte: (TAYLOR , 2006).

Uma maneira de caracterizar a água utilizada nos processos cervejeiros é através da quantificação da sua dureza, que é determinada pelo conteúdo de sais de cálcio e magnésio (TAYLOR, 2006).

A “água dura” contém elevadas concentrações de sais de cálcio e de magnésio em solução, na forma de bicarbonatos, possui sabor mais intenso e é considerada mais palatável e benéfica para consumo. A “água mole” tem o teor mineral reduzido, geralmente sais de sódio e de potássio, tais como bicarbonatos, sulfatos, cloretos, fluoretos ou nitratos. O sabor da água mole tende a ser um pouco mais saponáceo (TAYLOR, 2006).

Segundo Almeida e Silva (2005), a água cervejeira para produção de cervejas tipo Pilsen deve apresentar alcalinidade menor ou igual a 50mg/L (preferencialmente 25mg/L) e possuir concentração de cálcio ao redor de 50mg/L.

Na fabricação da cerveja, a água é utilizada na produção do mosto e na padronização do teor alcoólico; na limpeza e esterilização de tinas e tubulações, sendo para isso necessário ter baixa dureza; nas etapas de pasteurização e no resfriamento; na limpeza em geral da fábrica; e para alimentação das caldeiras (TAYLOR, 2006).

2.4 ADJUNTOS

A principal razão para o uso de adjuntos é econômica, pois apresentam menor custo na produção de extrato. Além disso, quando não utilizados em grandes proporções, reduzem o teor de nitrogênio solúvel no mosto, diminuindo a possibilidade do desenvolvimento de bactérias láticas na cerveja, melhorando a estabilidade coloidal, e consequentemente, aumentando a vida de prateleira do produto (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001).

Os adjuntos cervejeiros usualmente utilizados são: cevada, trigo, milho, arroz, sorgo, aveia, batata, mandioca e centeio que podem se apresentar na forma de cereais crus, *grits*, flocos, torrados, farinhas/amidos, xaropes e cereais maltados (STEWART, 2006).

Estudos têm sido feitos para melhorar o desempenho de vários adjuntos e examinar sua contribuição para as características da cerveja (STEWART, 2006).

Carvalho (2009) estudou a produção de cervejas com banana como adjunto de malte. As cervejas de banana foram analisadas sensorialmente e mostram-se estatisticamente preferidas em comparação às amostras do mercado.

Santos (2011) desenvolveu uma cerveja utilizando 45% de quirera de arroz preto como adjunto, obtendo bom rendimento no processo e resultando em uma bebida de sabor agradável e intenso.

Embora ainda não contemplado na legislação brasileira (que está sendo revisada, com publicação prevista para o ano de 2016) pesquisas com ingredientes de origem animal na produção de bebidas alcoólicas existem, bem como a fabricação e comercialização destas bebidas em âmbito internacional.

O uso do mel na produção de bebidas é antigo, sendo o hidromel a bebida fermentada mais conhecida. Alguns países como Inglaterra, Canadá, Estados Unidos e Argentina comercializam cervejas com mel na sua composição (BRUNELLI, 2012). No Brasil, a Cervejaria Colorado, de Ribeirão Preto, foi a primeira a produzir uma cerveja utilizando mel de laranjeiras combinado com malte de trigo e cevada (CERVEJARIA COLORADO, 2014).

Brunelli (2012) produziu e fez a caracterização físico-química, energética e sensorial de cervejas elaboradas com mel. A autora concluiu que a presença de mel como matéria prima cervejeira aumenta a fermentabilidade dos mostos, além

de favorecer a formação de CO_2 e elevar a formação de espuma. A análise sensorial mostrou que as cervejas fortes, produzidas com 15°Brix de extrato original e com mel em sua composição obtiveram maior aceitação dos provadores.

Hendges (2014) estudou a produção de cervejas de baixo teor alcoólico utilizando quinoa malteada como adjunto de malte nas proporções de 10, 20, 30 e 45%. Concluiu que a utilização de quinoa em diferentes proporções possibilitou a obtenção de características físico-químicas semelhantes à de uma cerveja produzida somente com malte. As cervejas produzidas com quinoa proporcionaram maiores concentrações de aminoácidos livres no mosto e a aceitação das cervejas foi semelhante às da amostra da cerveja puro malte e da amostra de cerveja comercial.

As pesquisas envolvendo a utilização do soro de queijo na produção de bebidas alcoólicas são datadas desde 1969, com o trabalho de Yoo e Mattick (1969) que pesquisaram o uso do soro doce e do soro ácido para produção de vinho. Parrondo et al. (2000) também estudaram a produção de uma bebida fermentada com baixo teor alcoólico a partir do permeado de soro. Dragone et al. (2009) estudou a produção e caracterização de uma nova bebida alcoólica por meio da fermentação descontínua do soro de queijo e posterior destilação do produto fermentado e concluiu ser possível obter uma bebida destilada com aroma e sabor agradáveis a partir da fermentação do soro de queijo.

2.4.1 Permeado de leite

Atualmente, o queijo é o produto lácteo que consome maior volume de leite em sua fabricação, e consequentemente o responsável pela produção de grande volume de soro no país (CARVALHO et al., 2013). Em média são gerados cerca de 10L de soro para cada quilograma de queijo produzido (GIROTO; PAELOWSKY, 2001).

Historicamente, este coproduto é utilizado na produção de bebidas lácteas, doce de leite, soro em pó e ricota e, principalmente, destinado à alimentação animal (CARVALHO et al., 2013).

O grande problema relacionado ao descarte do soro de queijo é seu potencial poluente, apresentando Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) entre

30.000 – 50.000 mg/L, que é aproximadamente 100 vezes maior que o do esgoto doméstico (FARRO 2003[2] *apud* ZACARCHENCO et al., 2013).

O soro contém cerca de 50% do teor de sólidos do leite e a lactose representa cerca de 75% do total de sólidos do soro e assim contribui em grande parte com o seu potencial poluente (ZACARCHENCO et al., 2012).

A lactose é o principal carboidrato presente no leite e no soro. É um dissacarídeo com baixo poder adoçante e solubilidade relativamente baixa, que não é digerido facilmente por uma fração significativa da população mundial (CARRARA; RUBIOLO, 1994).

Algumas das bebidas notáveis produzidas com soro de queijo são o "Milone", obtido por fermentação com cultura kefir, e o soro de leite espumante "Serwovit" produzido na Polônia (JELIČIĆ et al., 2008).

Visando aproveitar a maior parte das proteínas presentes no soro e reduzir o volume gerado, os laticínios têm investido no processo de ultrafiltração, que permite o aproveitamento das proteínas presentes no soro, para obtenção, por exemplo, de concentrado proteico e de permeado (ZACARCHENCO et al., 2012).

Os processos de separação por membranas como a ultrafiltração, osmose reversa, microfiltração, diálise, eletrodiálise e pervaporação já são utilizados por diversos países há várias décadas (ZACARCHENCO et al., 2012).

A ultrafiltração é um processo efetivo para concentração ou fracionamento de macromoléculas ou quando se deseja um permeado ultracristalino, livre de quaisquer partículas em suspensão (PETRUS[3], 1997 *apud* CARMINATTI, 2001).

Além da obtenção do concentrado proteico de soro (CPS) a ultrafiltração também é empregada para separação da fase lipoproteica do soro, na concentração da fase lipoproteica do leite, para fabricação de queijos e iogurtes, na concentração de sucos, entre outras aplicações (ZACARCHENCO et al., 2012).

O permeado de soro é mais comumente obtido quando o soro doce é processado por ultrafiltração (Figura 2). As proteínas do soro ficam retidas na

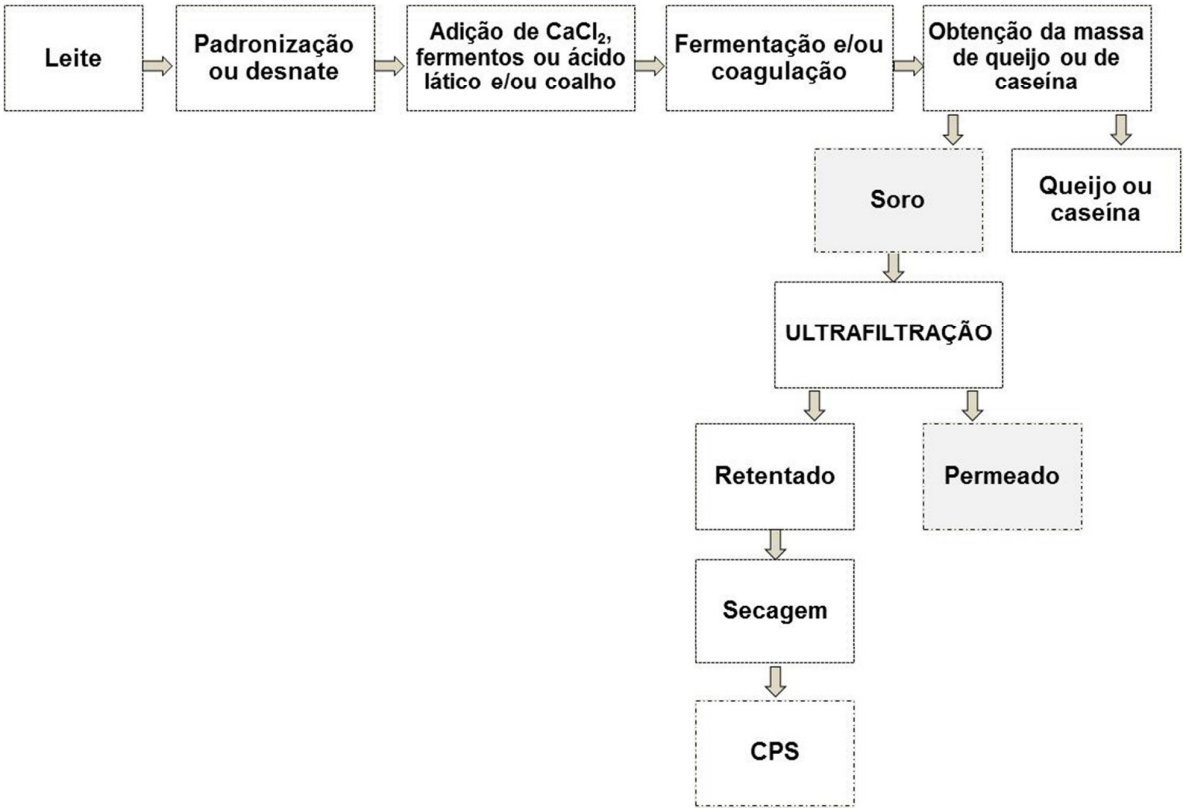
---

[2] FARRO, PCA. **Utilização do soro de queijo Minas frescal pré-tratado e microfiltrado: efeitos da vazão volumétrica e da pressão transmembrana no fluxo de permeado**. 2003. 187 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), UNICAMP, Campinas.

[3] PETRUS, J.C.C. **Preparação, modificação e caracterização de membranas assimetricas para clarificação de suco de fruta.** 1997. 139 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), UNICAMP, Campinas.

membrana, enquanto pequenas moléculas como lactose e sais minerais passam através da membrana, originando o permeado de soro (ZACARCHENCO et al., 2012).

Figura 3 - Fluxograma de fabricação de queijos e obtenção de caseína, concentrado proteico de soro (CPS) e permeado de soro.



Fonte: Adaptado (ZACARCHENCO et al., 2012).

A composição do permeado de soro, soro doce e CPS apresentam-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição do permeado de soro, soro doce e CPS (base seca).

	Permeado de soro	**Soro Doce**	**CPS**
Proteína (%)	3,0 – 8,0	11 – 14,5	34 – 36
Carboidrato (%)	68 – 85	63 - 75	48 – 52
Lipídeos (%)	1,5	1,0 – 1,5	3,0 – 4,5
Minerais (cinzas) (%)	8,0 - 20	8,2 – 8,8	6,5 – 8,0

Fonte: Adaptado (STOLIAR, 2009).

Dentre as vantagens relatadas para uso do permeado de soro estão: fonte de cálcio e de outros minerais do leite; incremento de cor em produtos de panificação; potencial substituto do sal; realçador de sabor; funcionalidades adicionais pelo alto conteúdo de lactose (STOLIAR, 2009); produção de bebidas não alcoólicas (com e sem hidrólise da lactose e em bebidas de frutas); produção de bebidas alcoólicas (como "vinho de permeado"); melhora da retenção de umidade nos produtos de panificação; aplicação na indústria farmacêutica e de alimentos pelo isolamento de compostos bioativos, em especial os galactoligossacarídeos obtidos por reação enzimática a partir da lactose e os não oligossacarídeos naturalmente presentes no leite (ZACARCHENCO et al., 2012).

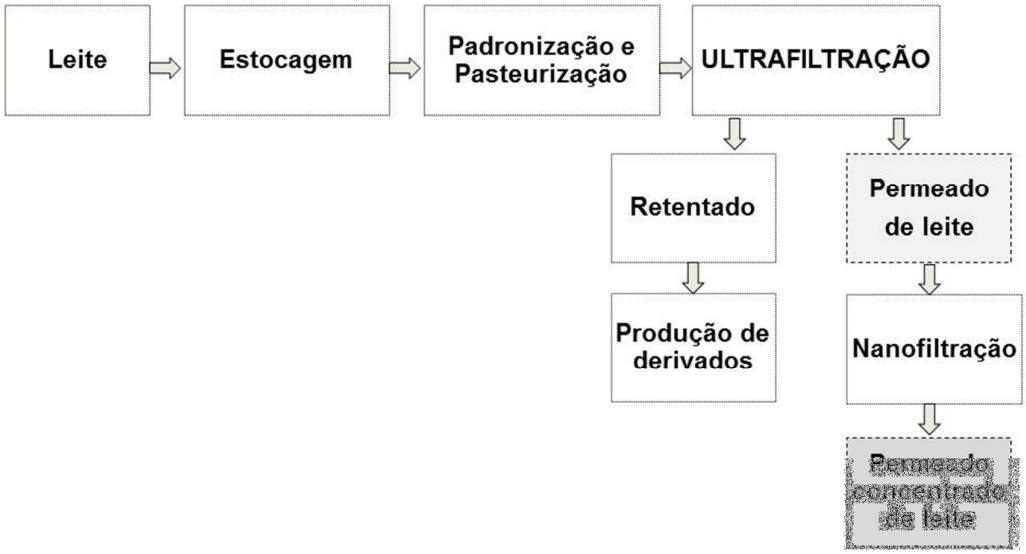
Segundo Talabardon et al. (2000), na Suíça, grandes quantidades de lactose são geradas pelos laticínios na forma de permeado de soro e permeado de leite. Neste país, o processo de ultrafiltração é frequentemente utilizado para a concentração do leite empregado na fabricação de produtos lácteos especiais, como o queijo Feta, por exemplo.

No Brasil, grandes empresas do setor de lácteos, como por exemplo, a DanVigor Indústria e Comércio de Laticínios Ltda, tem aplicado o processo de ultrafiltração diretamente no leite, conseguindo maior rendimento proteico e redução nas etapas do processamento do leite, ao invés de ter que recuperar, por ultrafiltração, as proteínas do soro de queijo.

As proteínas retidas são utilizadas na fabricação dos chamados "Queijos Frescal Ultrafiltrados", cujo principal benefício da ultrafiltração do leite é a maior retenção das proteínas, além de evitar o dessoramento comum neste tipo queijo e também de iogurtes e outros derivados (DANUBIO, 2014).

O produto resultante da separação molecular dos componentes do leite através do processo de ultrafiltração é chamado de permeado de leite (Figura 3). Quando concentrado através do processo de nanofiltração, que preserva as características do produto e o torna concentrado em lactose passa a ser chamado de permeado concentrado de leite (DANUBIO, 2014).

Figura 4 - Fluxograma de obtenção do permeado de leite e permeado concentrado de leite.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Segundo Costa (1995) é possível extrair lactose do permeado de leite e do permeado de soro, e em função do processamento adotado a composição da lactose em pó obtida pode ser bem distinta.

Talabardon et al. (2000) estudaram a produção de ácido acético através da fermentação do permeado de leite empregando culturas termofílicas.

Beucler et al. (2005) produziram e avaliaram sensorialmente bebidas não alcóolicas produzidas com diferentes concentrações de permeado de leite. Verificaram que as bebidas produzidas com 25 e 50% de permeado de leite, hidrolisado ou não hidrolisado, ficaram mais semelhantes às bebidas comerciais no sabor e aparência do que as bebidas produzidas com 75 e 100% de permeado.

Fontes et al. (2015) também estudaram a aplicação do permeado de leite na fabricação de bebidas. Concluíram que pelas características osmolíticas e pela presença de sais minerais o permeado pode ser empregado, em larga escala, na produção de bebida para a reposição de eletrólitos após atividade física.

2.4.2 Soro de queijo como adjunto na fabricação de cerveja

A lactose presente no soro (cerca de 70% do teor de sólidos) torna-o matéria-prima de interesse para produção de bebidas alcoólicas (JELIČIĆ et al., 2008).

A cerveja com soro de queijo tem sido produzida desde 1940. O soro sustenta esta produção devido às seguintes razões (WENDORF, 2008):

- o conteúdo proteico do soro e a quantidade de minerais em estado coloidal formam a base para um elevado grau de ligação do CO_2;

- apresenta, assim como o mosto, um elevado conteúdo mineral;

- proporciona o desenvolvimento de um sabor de caramelo, semelhante ao proveniente do malte torrado, principalmente como uma consequência da reação de escurecimento de lactose;

- a lactose é ligeiramente doce e não altera o sabor final da cerveja (SIENKIEWICZ; RIEDEL[4], 1990 *apud* WENDORF, 2008).

A cerveja de soro com baixo teor alcoólico (menor que 1,5%) é produzida através da desproteinização do soro, concentração, fermentação da lactose (usualmente pelas leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*) ou adição de sacarose até atingir o conteúdo requerido de álcool. Entretanto, certa parcela de lactose é transformada em ácido lático o que confere um sabor ácido e refrescante ao produto final (JELIČIĆ et al., 2008).

Segundo Jeličić et al. (2008) a cerveja de soro pode ser produzida com ou sem a adição de malte, ser fortificada com minerais, hidrolisados de amido ou vitaminas.

Contudo, possíveis problemas na fabricação de cerveja advindos da utilização do soro podem ocorrer como:

- contaminação por micro-organismos presentes no soro;

- o conteúdo lipídico pode interferir na formação de espuma da cerveja;

- surgimento de sabor levemente salgado;

- sabor e aroma indesejáveis pela baixa solubilidade das proteínas do soro;

- inabilidade das leveduras cervejeiras em fermentar a lactose. (SIENKIEWICZ; RIEDEL[4], 1990 *apud* WENDORF, 2008; JELIČIĆ, et al. 2008).

[4] SIENKIEWICZ, T.; RIEDEL, C.L. **Whey and whey utilization**. 2nd ed., Gelsenkirchen-Buer: Verlag Th. Mann, Alemanha, 1990.

2.5 LEVEDURA

Leveduras são micro-organismos anaeróbios facultativos que podem usar tanto a via respiratória quanto a fermentativa. Este grupo é adicionalmente subdividido de acordo com a proporção de açúcares catabolizados em condições aeróbias (BRIGGS et al., 2004).

Leveduras fermentativas são caracterizadas por altas taxas de metabolismo do açúcar, dos quais 10% ou menos é catabolizada pela respiração. *Saccharomyces* (incluindo todas as cepas cervejeiras), *Brettanomyces* e *Schizosaccharomyces* pertencem a esta categoria. Já os tipos respiratórios são predominantes e consomem 70% ou mais de açúcares por meio da respiração. Estes incluem *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* e *Pichia* (BRIGGS et al., 2004).

2.5.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é um micro-organismos unicelular do Reino Fungi especialmente utilizado na produção de bebidas alcoólicas fermentadas e destiladas e na panificação. Por sua característica de anaeróbio facultativo, depende da disponibilidade de oxigênio e da concentração e fontes de carboidratos. Seu metabolismo pode ser aeróbico e oxidativo ou fermentativo (BRIGGS et al., 2004; RUSSEL, 2006).

As reações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação representam os efeitos cumulativos do crescimento da levedura no mosto. O consumo de nutrientes e a formação de álcool, dióxido de carbono e outros metabólitos, que em conjunto contribuem para a formação da cerveja, são todos subprodutos do crescimento da levedura (BRIGGS et al., 2004).

O trabalho de Hansen do Laboratório Carlsberg na Dinamarca na década de 80 foi o primeiro a classificar a *S. cerevisiae* como levedura de alta fermentação (*ale*) e *S. carlsbergensis* como de baixa fermentação (*lager*). As duas cepas se distinguiam taxonomicamente pela habilidade da levedura *lager* fermentar o dissacarídeo melibiose (glicose-galactose), pela presença do gene

MEL que produz a enzima extracelular α-galactosidase (CARVALHO et al., 2006; RUSSEL, 2006).

Pesquisas taxonômicas realizadas mais tarde, por volta de 1990, reposicionaram a *S. uvarum* (antiga *carlbergensis*) como parte da família *S. cerevisiae.* (RUSSEL, 2006). Atualmente, todas as leveduras cervejeiras tradicionalmente utilizadas na produção de cervejas *ale* e *lager* são cepas de *S. cerevisiae* que representam em totalidade, um grupo diversificado de microrganismos (CARVALHO et al., 2006).

Geralmente leveduras tipo *ale* preferem altas temperaturas de fermentação (18-22ºC) comparadas com as do tipo *lager* (8-15ºC). Estas temperaturas são normalmente adotadas, pois propiciam a produção de compostos derivados da levedura e de sabores desejáveis para a cerveja (BRIGGS et al., 2004). Quando em temperaturas diferentes desta faixa há possibilidade da produção de compostos de sabor altamente indesejáveis para a bebida. Já o aumento da temperatura de fermentação leva a um aumento das concentrações de álcoois superiores e seus ésteres (BRIGGS et al., 2004).

Saccharomyces é capaz de metabolizar diferentes tipos de açúcares como glicose, frutose, galactose, manose, sacarose, maltose e maltotriose produzindo etanol como produto de fermentação. Contudo não é capaz de fermentar lactose, maltotrealose e dextrinas (WALKER, 1998).

Uma alternativa interessante para fermentação da lactose consiste na hidrólise por β-galactosidase e posterior fermentação por *S. cerevisiae* (GONZÁLEZ SISO, 1996). Este processo pode ser desenvolvido em duas etapas ou num único passo com culturas mistas ou com a enzima e levedura co-imobilizadas. No entanto, quando *S. cerevisiae* utiliza a mistura de glicose e galactose como fonte de carbono, manifesta-se o crescimento diáuxico [5] e rendimentos mais baixos na produção de etanol, até mesmo para as estirpes anteriormente adaptado à galactose (GONZÁLEZ SISO, 1996).

[5] Crescimento diáuxico: comportamento apresentado por micro-organismos na presença de uma mistura de dois substratos. Há uma fase *lag* inicial, seguida pelo consumo do substrato mais facilmente assimilável. Ocorre então uma segunda fase *lag* de adaptação ao segundo substrato acompanhada pelo consumo do mesmo.

2.6 ENZIMA β-GALACTOSIDASE

A enzima β-galactosidase (EC. 3.2.1.23), popularmente conhecida como lactase, é uma das hidrolases mais comumente estudadas (WHITAKER, 1994), sendo responsável por catalisar o resíduo terminal β-galactopiranosil da lactose para formar glicose e galactose (SANTIAGO et al., 2004). É uma enzima de interesse para a área de alimentos, pois a hidrólise da lactose produz açúcares mais doces; como a lactose tem solubilidade limitada e tende a precipitar em alimentos congelados, conferindo textura arenosa, a hidrólise parcial da molécula previne esta alteração de textura; é utilizada para produção de leite com baixo teor de lactose destinado a pessoas com deficiência da enzima (WHITAKER, 1994).

As β-galactosidases podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais (como amêndoas, pêssego, damasco, maçã) e em órgãos de animais (como intestino, cérebro, testículos, placenta) (JURADO et al., 2002). São produzidas comercialmente por fungos e leveduras, como *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e por bactéria como *Escherichia coli* (COURI et al., 2008).

A hidrólise da lactose pode ser realizada por via ácida ou enzimática. A hidrólise enzimática é mais adequada que a hidrólise ácida, quando se trata de alimentos, pois permite condições moderadas de temperatura e pH durante o processo, sem gerar subprodutos responsáveis pelo sabor, odor ou cor desagradáveis, que são comuns nos métodos ácidos. Além disso, a hidrólise enzimática não altera as propriedades nutricionais dos produtos lácteos (LADERO et al., 2002).

Carminatti (2001) estudou a hidrólise da lactose presente no permeado de soro de leite na concentração de 4,0% em reator de membrana, utilizando lactase proveniente de *Kluyveromyces lactis.* Empregou diferentes condições de temperaturas (30 a 50 ºC), pH (de 4,0-7,0) e concentração de enzima (de 400 a 2000 $mg.L^{-1}$) . Observou que as melhores conversões, 90% e 100%, se deram nas temperaturas de 30ºC e 40ºC, respectivamente, ambas em pH 6,0 e na concentração de enzima de 1250 $mg.L^{-1}$.

A hidrólise da lactose a partir do permeado obtido do processo de

ultrafiltração do leite foi estudada por Tremarin (2007). A hidrólise foi conduzida em reatores utilizando dois tipos de membranas e dois tipos de enzimas comerciais β-galactosidase provenientes de *Kluyveromyces lactis*. Em relação à atividade enzimática a autora observou que a maior atividade da enzima Lactozym se deu na concentração de 0,4 $g.L^{-1}$, a 40ºC e pH 6,8 e a melhor atividade da enzima Maxilact, na concentração de 0,2 $g.L^{-1}$, a 35ºC e pH 6,8.

Matioli et al. (2001) caracterizou a enzima β-galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* durante a hidrólise da lactose presente em leite em pó desnatado de uma marca comercial. Concluiu que embora a enzima tenha apresentado alta atividade a 45ºC e pH 6,5 os resultados obtidos apontam para um melhor aproveitamento da atividade enzimática quando se trabalha em temperatura menor ou igual a 40ºC.

2.7 O PROCESSO CERVEJEIRO

A fabricação da cerveja é composta pelas seguintes etapas: moagem, mosturação, filtração ou clarificação do mosto, fervura e lupulagem, separação do *trub* e resfriamento do mosto, fermentação, maturação, filtração e envase, que serão abordadas a seguir com mais detalhes.

2.7.1 Moagem

Consiste em quebrar os grãos de malte e de outros cereais com objetivo de expor o amido contido em seu interior, melhorar o contato entre as enzimas e substratos e aumentar a velocidade das reações (TSCHOPE, 2001; MORADO, 2009). De acordo com Tschope (2001) em casos de moagem inadequada, como a moagem muito grossa, estes objetivos não são alcançados e quando há moagem excessiva a quantidade de farinha gerada ocasiona curta duração da sacarificação e alta quantidade de maltose, prejudicando também a etapa de filtração do mosto. Segundo este autor, o ideal é utilizar moinho de dois rolos com distância de 0,7mm entre os rolos.

2.7.2 Mosturação

A mosturação consiste em adicionar água ao malte moído e submeter esta mistura a diferentes patamares de temperatura para ação das diferentes enzimas (Tabela 6), variando de acordo com o estilo de cerveja a ser produzido (TSCHOPE, 2001; MORADO, 2009).

O objetivo da mosturação é obter máxima produtividade de açúcares fermentáveis e limitada concentração de dextrinas não fermentáveis, para fornecer qualidade sensorial à cerveja (BRANDAM et al., 2003).

A reação mais importante na produção de cerveja certamente é a hidrólise do amido, pois esta determina a quantidade de carboidratos fermentáveis no mosto e a graduação alcoólica final da bebida (BRANDAM et al., 2003).

Na produção de cerveja, a etapa de mosturação está estritamente ligada a uma série de reações enzimáticas onde enzimas e substratos são recuperados do grão de malte. As três principais reações enzimáticas que acontecem são:

1. Hidrólise do amido gelatinizado em carboidratos fermentáveis;
2. Hidrólise de proteínas em aminoácidos livres;
3. Degradação das cadeias de β-glucano (BRANDAM et.al., 2003).

Para atingir os patamares de temperatura de cada enzima, a mosturação é usualmente operada com sucessivos aumentos de temperatura. Brandam et.al. (2003) sugerem um primeiro descanso para desproteinização e hidrólise de β-glucanos a 50ºC, sacarificação em 65ºC e aumento final da temperatura para 76ºC para assegurar a dissolução final de pequenos grãos de amido.

As enzimas β e α-amilases são as mais importantes do processo devido à ação na hidrólise do amido e dos adjuntos amiláceos, convertendo-os em açúcares fermentescíveis e dextrinas não fermentescíveis (KROTTENTHALER et. al, 2009).

Segundo Krottenthaler et al., (2009), a β-amilase é uma enzima que fica 60% inativa depois do mosto permanecer 10 minutos a 65ºC. De acordo com esses autores usualmente adota-se um descanso a 62ºC, pois assim é possível aumentar a concentração de maltose, contudo apenas depois de 20 minutos. A α-amilase é mais termorresistente e continua apresentando 30% de atividade

mesmo depois de 10 minutos a 80ºC.

Tabela 6 - Temperatura e pH ótimos das enzimas na mosturação.

Enzima	Temperatura ótima na mosturação (°C)	pH ótimo na mosturação	Substrato	Produto
Endopeptidases	45-50	3.9-5.5	Proteínas	Peptídeos e aminoácidos livres
Exopeptidase	40-50	5.2-8.2	Proteínas	Aminoácidos livres
Carboxipeptidases	50	4.8-4.6	Proteínas e peptídeos	Aminoácidos livres
α-amilase	65-75	5.6-5.8	α-glucanos de baixo e alto peso molecular	Dextrinas
β-amilase	60-65	5.4-5.6	α-glucanos	Maltose
Maltase	35-40	6.0	Maltose	Glicose
Dextinase limite	55-65	5.1	Dextrina limite	Dextrina
Hemicelulase	40-45	4.5-4.7	Hemicelulose	Glucanos

Fonte: Adaptado (TSCHOPE, 2001; KROTTENTHALER et. al, 2009).

Na mosturação utiliza-se a água primária, que é àquela necessária para maceração do malte moído, originando o mosto primário (TSCHOPE, 2001).

Independente do estilo, ao final da etapa de sacarificação o controle da degradação do amido é aferido através do teste de iodo (solução a 0,2N). Para isso uma amostra de mosto deve ser recolhida, sem a presença de cascas, resfriada e adicionada de gotas da solução de iodo, cuja coloração varia de amarelo até azul escuro, sendo que o azul escuro resultante é o indicativo de sacarificação incompleta (TSCHOPE, 2001).

2.7.3 Filtração ou clarificação

O principal objetivo da filtração é produzir um mosto clarificado e obter a quantidade máxima de açúcares (extrato) a partir dos materiais sólidos residuais (EATON, 2006). Nesta etapa faz-se a separação do mosto primário do bagaço de malte.

O procedimento é realizado em filtro de placas, no caso das grandes cervejarias, ou em tinas de clarificação, em cervejarias de menor porte. Em tinas de clarificação utiliza-se um fundo falso que serve para a sustentação dos elementos filtrantes, no caso as próprias cascas de malte (MORADO, 2009).

Uma quantidade de água secundária é utilizada para lavagem do bagaço, para extrair parte do mosto primário que nele ficou retido. A temperatura da água não pode ser maior que 80ºC a fim de evitar a extração excessiva de polifenóis, que podem prejudicar o sabor da cerveja (MORADO, 2009). A proporção entre malte e água é importante, pois resultará na concentração desejada do mosto.

Segundo Tschope (2001) uma clarificação bem sucedida tem as seguintes vantagens:

- tempo de brassagem mais curto, reduzindo custos operacionais;
- otimização do rendimento do extrato, pressupondo custo mais baixo pelo melhor aproveitamento da matéria-prima;
- evitar a produção de um mosto excessivamente turvo.

2.7.4 Fervura e lupulagem

Na etapa de fervura ocorre a evaporação da água secundária excedente, tornando o mosto mais concentrado; coagulação do excesso de proteínas e taninos dissolvidos contribuindo para melhorar a turbidez da bebida e separação do *trub*; e, transferência dos compostos amargos e aromáticos do lúpulo, que é adicionado do início da fervura para conferir amargor e ao final da mesma, para conferir aroma (TSCHOPE, 2001; EATON, 2006).

A fervura deve ser intensa, pois atua como tratamento térmico do mosto antes da inoculação da levedura, eliminando microrganismos indesejáveis que poderiam competir por nutrientes e gerar sabores indesejáveis (*off-flavours*). Além

disso, é necessário que os vapores gerados na fervura sejam dissipados de modo a permitir a liberação de aromas indesejáveis como o dimetil sulfeto (DMS), considerado indesejável na bebida por conferir sabor de vegetais cozidos (MORADO, 2009; EATON, 2006). O DMS é gerado no mosto durante a fervura pela redução do S-metil-metionina (SMM), que é um composto produzido durante a malteação da cevada (PALMER, 2006b).

A formação de compostos responsáveis pelo sabor, aroma e coloração da cerveja também se desenvolve nesta etapa pelas reações de caramelização e reação entre açúcares e aminoácidos contidos no mosto, chamada reação de Maillard (TSCHOPE, 2001; MORADO, 2009).

2.7.5 Separação do *trub* e resfriamento do mosto

Segundo Palmer (2006b) o termo *trub* refere-se ao sedimento depositado no fundo do fermentador, que é composto pelo "*trub* quente", "*trub* frio", material residual insolúvel do lúpulo, e eventualmente levedura inativa. O "*trub* quente" é um aglutinado composto pelo lúpulo adicionado na fervura e por proteínas e taninos que coagularam também durante esta etapa (EATON, 2006). O "*trub* frio" é um aglutinado de pequenas partículas que coagularam após o resfriamento do mosto até 60ºC (PALMERb, 2006; EATON, 2006).

O processo mais utilizado para separação do *trub* é o de sedimentação. O mosto é bombeado para um tanque cilíndrico (*whirlpool*) construído por entradas laterais tangenciais, de modo que o *trub* se concentre no fundo do mesmo pela ação da força centrípeta, com saída do mosto clarificado pelas saídas laterais (MORADO, 2009; TSCHOPE, 2001).

No resfriamento, normalmente são empregados trocadores de calor do tipo placas. Deve-se resfriar o mais rapidamente possível a fim de evitar a formação de aromas indesejáveis, como o DMS, e contaminação. O mosto resfriado é então aerado, com difusor de material poroso, para que a levedura tenha oxigênio disponível para multiplicação celular (TSCHOPE, 2001).

2.7.6 Fermentação

O processo básico de fermentação consiste no fato de a levedura utilizar os açúcares contidos no mosto para produzir álcool, dióxido de carbono (CO_2), massa celular e compostos de aroma (BRIGGS et al., 2004; EATON, 2006).

Durante a fermentação, o objetivo primordial da levedura é gerar energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) que será empregada na realização de atividades fisiológicas e biossínteses, necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. O etanol e o CO_2 resultantes se constituem tão somente de produtos de excreção, sem utilidade metabólica (CARVALHO et al., 2007).

A fermentação dos mostos cervejeiros pode ser influenciada por vários fatores como: composição do mosto, temperatura de fermentação, nível de oxigênio inicial, concentração e viabilidade celular e concentração de etanol (CARVALHO et al., 2007).

A quantidade de levedura utilizada no processo fermentativo, segundo Venturini Filho e Cereda (2001) deve ser tal que resulte numa concentração de 5 a 15 milhões de células de levedura por mililitro de mosto. Segundo Almeida e Silva (2005), embora a composição dos mostos seja variável e diferentes cepas sejam utilizadas, uma fermentação requererá 1,0 ppm de oxigênio dissolvido e 10^6 cel/mL por cada 1 ºP de extrato no mosto.

Cervejas *ale* são fermentadas com leveduras de alta fermentação, inoculadas em um mosto resfriado a 16ºC e fermentadas de 15-20ºC por um período de 2 a 3 dias (BRIGGS et al., 2004).

No início da fermentação, após inoculação, as leveduras possuem baixa atividade (fase *lag*). Conforme consomem oxigênio disponível para sua multiplicação celular tornam o ambiente anaeróbio, propício ao transporte de açúcares para o meio intracelular, onde piruvato será metabolizado a etanol e CO_2 (EATON, 2006).

Além de etanol e CO_2 também são subprodutos da fermentação o diacetil, alcoóis superiores, aldeídos, ésteres e ácidos carboxílicos, como disposto na Tabela 7. Obviamente a formação de tais compostos depende do tipo de levedura utilizada, da quantidade de inóculo, da temperatura e duração da fermentação (TSCHOPE, 2001).

Alguns compostos são indesejáveis e precisam ser removidos durante a fermentação ou maturação, como o diacetil, que proporciona um sabor/aroma de

manteiga (EATON, 2006). O diacetil é o mais crítico, pois apresenta baixo limiar de percepção na faixa de 0,1 ppm.

Tabela 7 - Subprodutos de fermentação com respectivos sabor/aroma que conferem à cerveja.

Subprodutos	Composto	Limiar de percepção (ppm)	Sabor/Aroma
Álcoois superiores	Isobutanol	10 – 60	Álcool
	3-metil-butanol	30 – 70	Solvente, banana
	2-fenil-etanol	28 – 125	Rosas, remédio
Dicetonas Vicinais	Diacetil	0,1 – 0,15	Manteiga
	2,3 - pentanodiona	1,0	Mel
Ésteres	Acetato de etila	25 – 30	Solvente, açúcar refinado
	Acetato de isoamila	1,0 – 1,6	Frutas, banana
	Dodecanato de etila	3,5	Gordura
Ácidos Orgânicos	Ácido butírico	1,2 – 2,2	Queijo ranço
	Ácido octanóico	10 – 13	Óleo, gordura
	Ácido dodecanóico	6,0	Gordura

Fonte: Adaptado (TSCHOPE, 2001).

Ao fim da fermentação, as leveduras começam a flocular, sedimentando ou flutuando no fermentador. Uma boa separação da levedura é importante para se obter uma bebida de sabor agradável e clarificada. Facilita também as etapas seguintes do processo e a recuperação da levedura para utilização em fermentações posteriores (EATON, 2006).

2.7.7 Maturação

Segundo Almeida e Silva (2005), a etapa de maturação tem por objetivos:

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 aroma 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.

Segundo Venturini Filho e Cereda (2001), a maturação é conduzida a baixa temperatura, normalmente 0ºC para cervejas *lager*, por um período que varia de duas a quatro semanas.

Durante a maturação desenvolvem-se reações físico-químicas que transformam a bebida, aperfeiçoando seu paladar pela produção de sabores e aromas acompanhados pela reabsorção do diacetil pela levedura e da carbonatação natural da bebida (EATON, 2006).

2.7.8 Filtração

A filtração produz uma cerveja brilhante e translúcida, pela remoção de pequenas partículas e células de levedura, contribuindo para estabilidade da bebida durante sua vida de prateleira (EATON, 2006). .

O filtro é geralmente a última oportunidade de fazer correções na cerveja antes da embalagem final. Normalmente, os ajustes podem ser feitos no nível de carbonatação, adicionando ou removendo CO_2, correção da cor pelo uso de corantes como caramelo, adição de produtos do lúpulo para corrigir amargor, melhorar a espuma ou evitar a oxidação pela luz e adição de água de-aerada para correção do teor de álcool (EATON, 2006).

Segundo Morado (2009), o método mais utilizado é a filtração com uso de terra diatomácea ou diatomita, um mineral rico em sílica constituído da carapaça de algas diatomáceas. A terra diatomácea é dosada de acordo com o volume de cerveja e forma uma camada filtrante nos suportes metálicos dos filtros. Algumas empresas fazem uso adicional de centrífugas para reduzir a quantidade de células em suspensão, aumentando a eficiência do processo.

2.7.9 Envase

O envase pode ser feito diretamente em barris, latas ou garrafas e neste ponto especial cuidados com assepsia dos recipientes e instalações deve ser tomado para evitar a contaminação da bebida (EATON, 2006).

Para permitir o consumo em casa e em locais de difícil acesso, a bebida envasada em latas e garrafas deve passar pelo processo de pasteurização já que a cerveja é de rápida deterioração. A pasteurização proporciona a estabilidade microbiológica da bebida (MORADO, 2009).

2.8 ANÁLISE SENSORIAL

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993) a análise sensorial é a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição.

A qualidade da cerveja é usualmente baseada na reação do consumidor a uma mistura complexa de expectativas, como: estilo da cerveja, a marca e publicidade, cor, translucidez, espuma, sabor e aroma, temperatura, copo em que é/será servida, carbonatação e sensação na boca (PHILLISKIRK, 2006).

A análise sensorial é uma ferramenta valiosa no monitoramento e controle de qualidade da cerveja (PHILLISKIRK, 2006). É comumente é realizada por uma equipe treinada ou não que foi montada para analisar determinadas características de um produto como, por exemplo, seleção de uma nova matéria-prima, efeito da mudança no processamento, a qualidade de textura, o sabor, a aprovação do consumidor, entre outros (TEIXEIRA, 2009).

Dentre os métodos empregados para análise sensorial destacam-se os Métodos Afetivos que objetivam verificar a aceitabilidade do mercado consumidor. Através do Teste de Preferência obtém-se a preferência e o grau de satisfação do consumidor com um novo produto e/ou pelo Teste de Aceitação a probabilidade de adquirir o produto testado (TEIXEIRA, 2009).

A escala hedônica é aplicada quando se deseja medir graus de satisfação. As escalas hedônicas expressam o grau de “gostar ou desgostar” através da descrição das apreciações (que depois são convertidas em pontos), possuindo sempre um ponto central de indiferença; logo, apresentando número impar de classificações, variando, geralmente, entre três e nove (TEIXEIRA, 2009).

Segundo Teixeira (2009) “*a qualidade sensorial do alimento e a manutenção da mesma favorecem a fidelidade do consumidor a um produto específico em um mercado cada vez mais exigente*”.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver um processo para a produção de uma cerveja de alta fermentação, utilizando o permeado concentrado de leite como adjunto de fabricação, e avaliar a aceitação sensorial.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o permeado concentrado de leite;
- Realizar estudo da vida de prateleira do permeado concentrado de leite;
- Determinar a melhor condição para hidrólise da lactose presente no permeado concentrado de leite;
- Obter cervejas com a proporção malte/permeado de 55/45 e 90/10, utilizando para tanto o permeado hidrolisado e não hidrolisado;
- Efetuar o estudo cinético da fermentação dos diferentes mostos;
- Avaliar sensorialmente as bebidas e sua aceitação pelo consumidor;
- Produzir em escala piloto da cerveja mais aceita na análise sensorial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Água

A água empregada na elaboração dos mostos cervejeiros foi obtida do poço artesiano da Faculdade de Engenharia de Lorena, Campus I, e filtrada em dois filtros de partículas em série. Segundo Aizemberg, 2012, que realizou análise física e química desta água, sua composição tem as seguintes características: pH 6,66, dureza total 26 mg/L, e cloretos 1,2mg/L.

4.1.2 Malte

Para produção dos mostos utilizou-se o malte tipo Pilsen, gentilmente doado pela Malteria do Vale S/A. As características do malte encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Laudo do malte tipo Pilsen.

Análises	Resultados	Análises	Resultados
Aspecto, Cor e Odor do malte	Normais	Aroma do mosto	Normal
Turvação - Aspecto do mosto	> 4,5 - Opalescente	Umidade (%)	4,0
Extrato M.F. i.a. (%)	81,5	Diferença de Extrato (%)	1,6
Cor do mosto (EBC)	3,8	Cor do mosto após fervura (EBC)	6,0
Sacarificação (min)	< 10	Viscosidade 8,6 ºP (m.Pa.s)	1,55
Nitrogênio Solúvel Malte s.s. (mg/100g)	655	Proteína Total s.s. (%)	10,0
Poder diastásico (WK)	268	Amino Nitrogênio Livre FAN (mg /100 g)	136
pH do mosto	6,05	Beta glucanos no mosto (mg/L)	165

Fonte: MALTERIA DO VALE S/A

4.1.3 Lúpulo

Utilizou-se o lúpulo da variedade Zeus com 13,9% de α-ácidos, na forma de *pellets.* O lúpulo foi gentilmente doado pela Malteria do Vale S/A.

4.1.4 Levedura *ale*

A levedura utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação, Safale-US-05® gentilmente doada pela Fermentis através de seu representante WE Consultoria.

Trata-se de uma levedura *ale* americana, indicada para produzir cervejas com baixo teor de diacetil em temperatura de fermentação que varia de 12-25ºC.

4.1.5 Permeado Concentrado de leite

O permeado concentrado de leite, obtido através da ultra e nanofiltração do leite, conforme descrito na Figura 4, foi gentilmente doado pela DanVigor Indústria e Comércio de Laticínios Ltda, situada na cidade de Cruzeiro, SP.

Foram utilizados 5 lotes do permeado concentrado de leite, a saber:

- um lote para caracterização do produto e estudo da vida de prateleira;
- um para determinação da melhor condição de hidrólise enzimática da lactose;
- um para produção da cerveja com permeado não hidrolisado;
- um para produção da cerveja com permeado hidrolisado;
- e um para produção em escala piloto da cerveja mais aceita na análise sensorial.

4.1.6 Enzima β-galactosidase

A enzima lactase (β-galactosidase comercial) foi gentilmente doada pela Prozyn Biosolutions. Trata-se de uma enzima, na forma líquida, produzida por fermentação de uma cepa específica de *Kluyveromyces lactis,* que contém 5000 NLU/g. Foi mantida em geladeira a 4ºC, em sua embalagem original. Segundo a

ficha técnica do produto as condições ótimas de operação da enzima são: pH 6,0 – 7,0 e temperatura de 40 ºC.

4.1.7 Extrato de lúpulo

Utilizou-se “Extrato de Lúpulo” contendo α-ácidos, β-ácidos, óleos essenciais e diluente, que foi cedido por S.S. Steiner (Estados Unidos), com concentração de α-ácidos de 51,6%.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização do permeado concentrado de leite

A caracterização do permeado concentrado de leite, bem como de uma amostra de soro de queijo obtido através do processamento de queijo minas padrão (gentilmente doado pela Cooperativa de Laticínios de São José dos Campos) foi realizada pelo Centro de Tecnologia de Laticínios – TECNOLAT / ITAL. Julgou-se necessário caracterizar o soro de queijo para explicitar as diferenças na composição em relação ao permeado concentrado de leite. As análises realizadas foram:

- Teor de Nitrogênio Total - método de Kjeldahl (BRASIL, 2006; INTERNACIONAL DAIRY FEDERATION, 1964);
- Lipídios totais (BRASIL, 2006);
- Extrato seco total (BRASIL, 2006; INTERNACIONAL DAIRY FEDERATION, 1982);
- Cinzas (HORTWITZ, 2000);
- pH (BRASIL, 2006; INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2005a);
- Acidez titulável (BRASIL, 2006);
- Determinação de lactose (ACTON, 1977);
- Umidade.

4.2.2 Estudo da vida de prateleira do permeado concentrado de leite

O estudo da vida de prateleira do permeado concentrado de leite foi realizado visando determinar sua validade para situações que pudessem requerer armazenamento prolongado.

A escolha dos α-ácidos do lúpulo como método de conservação justifica-se pelos estudos encontrados na literatura (ALMEIDA e SILVA et al., 2014; SILVA; FARIA, 2008) relatando seu efeito antimicrobiano frente a bactérias láticas, em especial *Lactobacillus*, pelo fato de ser um tratamento com grande facilidade de aplicação e pelo lúpulo ser ingrediente de importância no processo cervejeiro.

Escolheu-se também empregar a pasteurização a 65º/30min pelo amplo uso como método de conservação de alimentos.

O permeado concentrado de leite utilizado foi proveniente de um mesmo lote do produto e após recebimento distribuiu-se 1L de permeado em 14 *Erlenmeyers* estéreis com capacidade para 2L.

Foram realizados 7 ensaios, em duplicata, conforme tratamentos dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 - Ensaios para estudo da vida de prateleira do permeado.

Ensaio	Permeado
1	*in natura*
2	Permeado pasteurizado
3	Permeado *in natura* com 40 ppm de α-ácido
4	Permeado *in natura* com 30 ppm de α-ácido
5	Permeado *in natura* com 20 ppm de α-ácido
6	Permeado *in natura* com 10 ppm de α-ácido
7	Permeado *in natura* com 5 ppm de α-ácido

No ensaio 2, fez-se a pasteurização do permeado a 65ºC por 30 minutos no próprio *Erlenmeyer*, seguido de resfriamento rápido.

Para os ensaios com adição de α-ácidos preparou-se uma solução do "Extrato de Lúpulo" diluída em álcool etílico absoluto. Diferentes volumes desta solução foram adicionados ao permeado para obter concentrações de 40, 30, 20, 10 e 5 ppm de α-ácidos.

Todos os ensaios foram mantidos na temperatura de 5±2ºC. Foram retirados 10 mL de amostras ao longo de até 31 dias de experimento. As amostras foram analisadas quanto à acidez titulável (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2005b) e pH (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2005a).

Uma amostra adicional de 30 mL dos ensaios com permeado *in natura*, pasteurizado e com 40 ppm de α-ácidos, retiradas no 22º dia do experimento, foram submetidas à contagem em placas de bactérias láticas.

As amostras de permeado *in natura*, pasteurizado e com 40 ppm de α-ácidos foram diluídas a 10^{-5}, 10^{-3} e 10^{-1} em solução salina estéril (água destilada e 1,0% de cloreto de sódio).

Foram utilizados dois tipos de meios de cultura. O meio PCA (Plate Count Agar) composto por 0,5 g/L de triptona, 2,5 g/L de extrato de levedura, 1,0g/L de glicose e 9,0g/L de ágar. E o meio MacConkey Agar composto por 20g/L de peptona, 10g/L de lactose, 1,5g/L sal de bile, 5,0g/L de cloreto de sódio, 0,03g/L vermelho neutro, 0,001g/L de cristal violeta e 15g/L de Agar. Os meios foram preparados nas concentrações de 17,5g/L para PCA e 51,5g/L para o ágar, conforme orientação do fabricante.

O meio MacConkey é utilizado na identificação de bacilos gram negativos e permite verificar se houve ou não a fermentação da lactose.

Os meios foram autoclavados a 121ºC por 15 minutos e em seguida distribuídos em placas de Petri esterilizadas descartáveis. Fez-se o plaqueamento das amostras em duplicata.

As placas de Petri foram incubadas em estufa a 37ºC por 48h. Após o período de incubação, com o auxílio do contador, efetuou-se a contagem em placas cujas diluições apresentavam entre 10 e 300 unidades formadoras de colônias (UFC). O resultado foi expresso em UFC por mililitro, sendo calculado pelo número de colônias multiplicado pela diluição da amostra e pelo volume plaqueado.

4.2.3 Determinação da condição de hidrólise enzimática da lactose

Pelo fato de *Saccharomyces cerevisiae* não ser capaz de fermentar a lactose, mas apta a fermentar glicose e galactose, determinou-se a melhor condição de hidrólise da lactose presente no permeado concentrado de leite

realizando 5 ensaios, em duplicata. Adotou-se o pH 6,5 e a temperatura de 40ºC como padrão para todos os ensaios, variando-se apenas a concentração de β-galactosidase utilizada (Tabela 10).

O pH do permeado foi ajustado com ácido lático 0,1M ou hidróxido de sódio 50%, conforme necessidade.

Tabela 10 - Condições testadas da hidrólise enzimática da lactose por β-Galactosidase, em pH 6,5 e 40ºC.

Ensaio	Concentração de β-Galactosidase (mL/L)
1	1,0
2	1,0 + 40 ppm de α-ácidos
3	1,5
4	2,0
5	3,5

A hidrólise enzimática da lactose foi conduzida em banho-maria regulado para promover 60 agitações por minuto utilizando para isso *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 125 mL de permeado.

Quando o permeado atingiu a temperatura de 40ºC a enzima foi adicionada nos ensaios 1, 2, 3, 4 e 5 sendo que no ensaio 2 adicionou-se também a solução de “Extrato de Lúpulo” diluída em álcool etílico absoluto para fornecer 40 ppm de α-ácidos. O tempo de ensaio começou a ser contado quando se fez a adição da enzima. Durante os 180 minutos de duração, amostras de 1,0 mL foram retiradas a cada 15 minutos. Todas as amostras, assim que retiradas, foram colocadas em banho-maria a 100ºC por 5 minutos para inativação da enzima.

As amostras inativadas foram centrifugadas por 10 minutos a 12000rpm e os sobrenadantes guardados em tubos *ependorff* a -18ºC para posterior análise.

Depois de estabelecida a melhor condição para hidrólise da lactose presente no permeado, um novo lote de permeado foi hidrolisado, seguindo a metodologia já descrita, para ser utilizado na produção dos mostos.

Nos trabalhos envolvendo a hidrólise da lactose presente no soro de queijo e permeado de soro normalmente utiliza-se um kit enzimático para determinação da glicose. Contudo, no estudo feito por Tremarin (2007) verificou-se que as peptonas presentes do permeado interferem nesta determinação pela ação sobre

os reagentes do kit. Por este motivo, as concentrações de açúcares foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

As concentrações de lactose, glicose e galactose foram determinadas por HPLC com detector de índice de refração, coluna HPX87H, temperatura de 45ºC, ácido sulfúrico 5mmol/L como eluente em um fluxo de 0,6 mL/min e volume de amostra de 20µl. Antes de serem injetadas, as amostras foram diluídas 10 vezes com água deionizada. As concentrações de lactose, glicose e galactose foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas com soluções padrão.

4.2.4 Produção das cervejas

4.2.4.1 Preparação dos mostos

Neste trabalho foram produzidas cervejas com 5 mostos distintos:

- Mosto Puro Malte, 100/0 malte/permeado;
- Mosto com 55/45, malte/permeado **não** hidrolisado;
- Mosto com 90/10, malte/permeado **não** hidrolisado;
- Mosto com 55/45, malte/permeado hidrolisado;
- Mosto com 90/10, malte/permeado hidrolisado.

Os ensaios foram feitos em duplicatas, exceto a cerveja puro malte, que foi feita em triplicata.

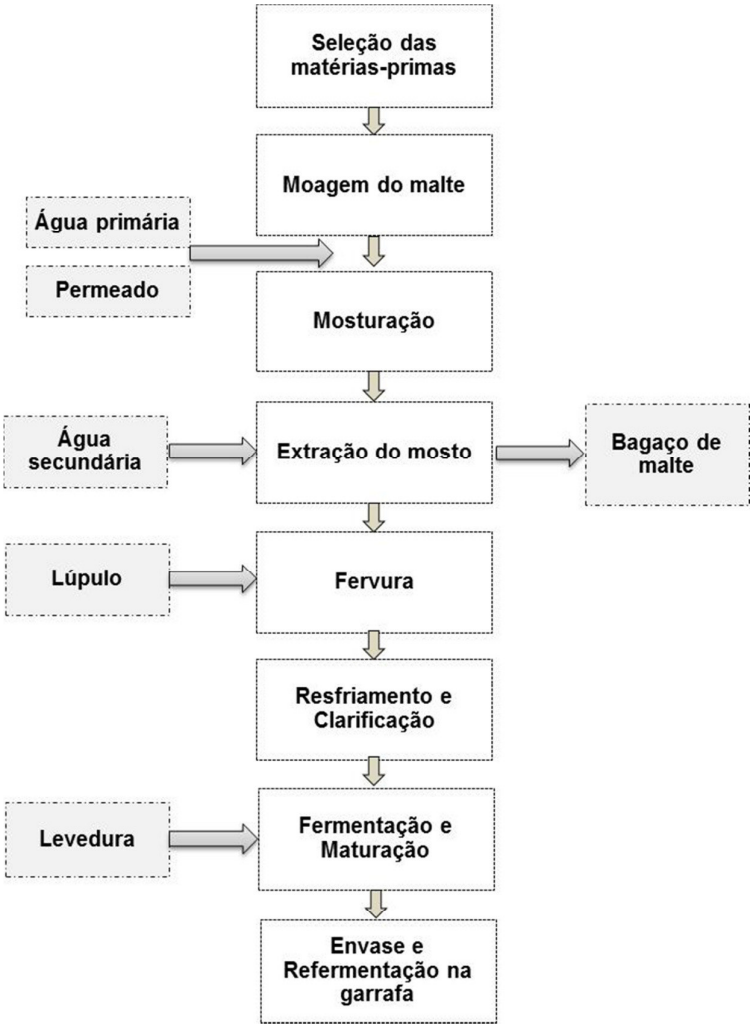
A relação malte/permeado de 55/45 se justifica pela legislação permitir a substituição de até 45% do malte de cevada por adjuntos para que a bebida continue recebendo a denominação de cerveja. E, como não existe um padrão para substituição do malte por adjuntos de origem animal, nos mostos 90/10 optou-se por seguir a indicação da legislação para açúcares vegetais diferentes dos provenientes de cereais, onde a quantidade máxima de açúcar empregada em relação ao extrato primitivo deve ser menor ou igual a 10%.

Padronizou-se produzir um volume de 8,0L de mosto para a escala de bancada, com 12ºP e 20 IBU. Os cálculos de malte, permeado concentrado de leite, água primária e lúpulo encontram-se no Apêndice A.

A produção das cervejas seguiu as etapas descritas na Figura 5. Ressalta-se que para o mosto puro malte não houve adição de permeado, apenas água

primária. Para os outros mostos a adição de permeado tanto hidrolisado como não hidrolisado foi feita juntamente com a água primária.

Figura 5 - Fluxograma de produção das cervejas.



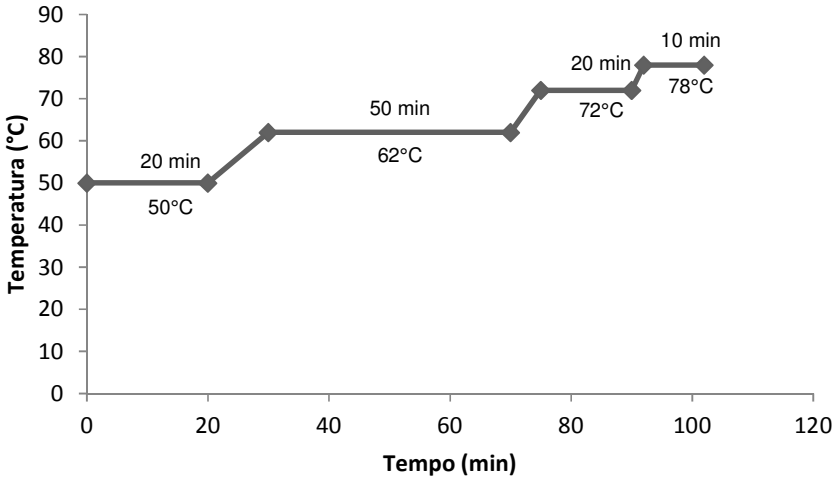
Fonte: Próprio autor.

Foram separadas as quantidades de água primária, malte e lúpulo para a produção do mosto puro malte, e as mesmas matérias-primas e permeado para a produção dos mostos 55/45 e 90/10. A moagem do malte Pilsen foi feita a seco em moinho de 2 rolos com distância de 0,7mm (marca Mec Bier).

A mosturação foi realizada pelo processo de infusão. Transferiu-se a água, do mosto puro malte, e água e permeado, dos outros mostos, para uma tina de mostura dotada de um filtro tipo *bazooka*. A mistura foi aquecida até 55ºC para permitir que, após a adição do malte, a temperatura diminuísse para 50ºC,

atingindo a temperatura ótima de atuação das proteases. Os tempos e temperaturas adotados no processo estão demonstrados na Figura 6. Ao fim da rampa de 72ºC foi feito o teste de sacarificação do amido através do Teste de Iodo 0,2N, sendo confirmada a completa hidrólise, pela ausência da coloração roxo-azulada. O mosto foi aquecido a 78ºC para inativação das enzimas.

Figura 6 - Programação de tempo e temperatura no processo de mosturação.



Fonte: Próprio autor.

Na tina de mostura, o mosto primário foi clarificado por recirculação, sendo a própria torta de bagaço, usada como elemento filtrante, e separado do bagaço do malte. O mosto primário foi escoado e transferido para a tina de fervura e a torta de bagaço foi lavada com a água secundária a 78ºC para remoção do extrato aderido ao bagaço até o mosto secundário atingir 4 a 5ºBrix. O mosto secundário também foi adicionado à tina de fervura.

O mosto resultante foi fervido durante 60 minutos. No início da fervura fez-se a adição de 70% do total de lúpulo, faltando 15 minutos para o término da fervura adicionou-se mais 20% do lúpulo e faltando 5 minutos para o término da fervura adicionou-se os 10% restantes. Terminada a fervura do mosto o mesmo foi resfriado utilizando uma serpentina de cobre imersa no líquido até atingir a temperatura de 30ºC. Foi feito o procedimento de rodamoinho (*whirlpool*), por 2 minutos. O mosto foi deixado em repouso por 20 minutos para ocorrer a separação do *trub*, por decantação.

Para o cálculo da quantidade de leveduras necessárias à fermentação empregou-se como base 10^6 cel/mL por cada 1 ºP de extrato no mosto segundo Almeida e Silva (2005). Uma vez definida a massa de levedura US-05 liofilizada necessária, o inóculo foi preparado adicionando-as no próprio mosto, em um volume equivalente a 10 vezes seu peso. Após hidratação esperou-se 30 minutos para inocular o mosto.

O mosto resfriado foi transferido para o fermentador com diferencial de altura para incorporar oxigênio ao líquido.

Com o mosto no fermentador fez-se a adição da levedura hidratada e agitou-se a mistura por 5 minutos. O fermentador foi fechado hermeticamente e uma válvula airlock colocada em sua tampa para dissipar os gases da fermentação. O fermentador foi mantido na temperatura de 18ºC. Terminada a fermentação primária, a cerveja foi transferida para câmara fria a 5ºC e mantida por 15 dias para maturação.

Ao término da maturação, as cervejas foram engarrafadas com uma solução de 5g/L de açúcar cristal para refermentação na garrafa e deixadas em repouso por 20 dias em temperatura ambiente.

Devido ao pequeno volume produzido na escala de bancada não foi possível filtrar as cervejas em terra diatomácea. Pela presença de leveduras na bebida a mesma não foi pasteurizada para evitar autólise, que interferiria no sabor e aparência da cerveja.

Amostras de 20 mL foram retiradas do fermentador a cada 12h e congeladas para posterior análise. Para determinação da concentração celular utilizou-se 1,0 mL da amostra para contagem de células na Câmara de Neubauer, expressa em células/mililitro.

Os 19 mL restantes da amostra foram preparados de acordo com o descritivo constante no manual do equipamento Beer Analyser 2. Quantificou-se o Teor alcoólico, Extrato real, Extrato original, Extrato aparente, Atenuação Real de Fermentação, Atenuação Aparente de Fermentação e Densidade (Beer Analyser 2, ANTON-PAAR®, Áustria).

A produtividade foi determinada segundo Hiss (2001) pela equação (1).

- Produtividade em etanol (g/L.h)

$$Qp = \frac{\Delta P}{tf} \quad (1)$$

Onde:

ΔP = diferença entre a concentração final e inicial de etanol (g/L)

t_f = diferença entre o tempo final e inicial da fermentação (h)

A conversão de %v/v para g/L foi feita segundo Carvalho (2009), considerando a densidade do etanol a 20ºC.

4.2.5 Produção em escala piloto

Após análise sensorial, a cerveja que apresentou melhor aceitação foi produzida em escala piloto de 120L, como descrito no item 4.2.4.1, na planta piloto de bebidas da EEL/USP.

4.2.6 Análise sensorial

As cervejas obtidas com cinco tipos diferentes de mostos, em escala de bancada, foram analisadas sensorialmente através dos Testes de Aceitação para identificação da cerveja preferida e intenção de compra pelo consumidor.

A análise sensorial foi realizada nas cabines da Análise Sensorial da Planta Piloto de Bebidas da EEL/USP com público universitário acima de 18 anos, de ambos os sexos, que não tinham restrição ao consumo de leite e lactose e que manifestaram seu consentimento em participar da pesquisa.

Em um primeiro momento, para manifestar seu consentimento, cada provador recebeu um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em duas vias, uma para ele e outra para o pesquisador, que foram devidamente assinadas. Neste termo consta um resumo da pesquisa, riscos e benefícios associados e privacidade quanto às informações do provador.

Após consentimento em participar, juntamente com a ficha de análise sensorial cada provador recebeu um questionário (APÊNDICE B) a fim de

caracterizá-los quanto à idade e sexo, conhecimento sobre cervejas de alta fermentação e frequência de consumo.

Aos provadores ofereceram-se, simultaneamente, cinco amostras de 30 mL de cada bebida na temperatura de consumo, codificadas com números aleatórios de três dígitos, juntamente com um copo de água e um biscoito sem sal para limpar o paladar entre uma amostra e outra.

O modelo de ficha utilizada para a análise sensorial encontra-se disposto no Apêndice B.

Para cada parâmetro pesquisado foi feita análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do soro de queijo e do permeado

A caracterização do soro e permeado foi feita no Centro de Tecnologia de Laticínios – TECNOLAT / ITAL. Os resultados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Composição centesimal do soro de queijo e do permeado concentrado de leite.

Determinações	Resultados	
	Soro de queijo	**Permeado concentrado de leite**
Gordura (g/100mL)	0,6	0,00
Proteína (g/100mL)	0,99	0,71
Extrato seco (g/100mL)	6,82	17,30
Cinzas (g/100mL)	0,53	0,94
Acidez (% ácido lático m/v)	0,10	0,27
pH	6,66	6,56
Teor de lactose (g/100mL)	4,78	12,19
Umidade (%)	93,18	82,70

Observa-se que em relação ao soro de queijo o permeado apresenta maior concentração de extrato seco, cinzas, lactose e acidez. A diminuição da concentração de proteínas e a ausência de gordura no permeado podem ser explicadas pelo tipo de processo pelo qual o leite é submetido. Como já citado por Zacarchenco et al. (2012) o objetivo da ultrafiltração é o fracionamento de macromoléculas, permitindo maior recuperação de proteínas e a separação da fase lipoproteica do leite.

Na literatura foram encontrados poucos trabalhos sobre a composição do permeado de leite (Tabela 12), sendo mais comum encontrar a composição do permeado de soro. A composição do permeado difere pela composição inicial do leite que será ultrafiltrado (BURRINGTON, 2011).

Para o processamento de cervejas, objetivo deste trabalho, o permeado concentrado de leite é uma alternativa mais atrativa do que o soro de queijo, tendo em vista a ausência de gordura e a elevada concentração de lactose, que proporcionará mais extrato fermentável após a hidrólise enzimática. E, segundo Bravi et al. (2009) os lipídios podem afetar negativamente a qualidade da cerveja,

em particular, a estabilidade do aroma e da espuma, sendo estes parâmetros muito importantes no processo cervejeiro.

Tabela 12 - Composição do permeado de leite e permeado de leite em pó por diferentes autores.

	Suaréz et al. (2006) **Permeado de leite**	Burrington (2011) **Permeado de leite**	USDEC (2004) **Permeado de leite em pó**
Proteína (%)	-	3,5	3,0 – 5,0
Extrato seco (%)	5,27 – 5,36	-	-
Cinzas (%)	0,44 - 0,47	8,5	8,0 – 20,0
Acidez (% m/v)	0,4 – 0,85	-	0,10-0,15
pH	6,4 - 6,77	-	-
Lactose	4,58 – 4,81%	-	-
Carboidratos (%) (como lactose)	-	82,0	65,0 – 85,0
Gordura	-	-	0,0 – 1,5%

5.2 Análises da vida de prateleira do permeado

Na Figura 7 observam-se as fotos dos *Erlenmeyers* contendo permeado *in natura*, pasteurizado e com as diferentes concentrações dos α-ácidos do lúpulo, armazenados a 5±2ºC.

Figura 7 – Armazenamento dos ensaios com permeado concentrado de leite para determinar sua vida de prateleira.

Fonte: Acervo pessoal.

O estudo da vida de prateleira do permeado concentrado de leite foi realizado através das análises de pH, acidez titulável e contagem de células, que serão apresentadas a seguir.

5.2.1 pH

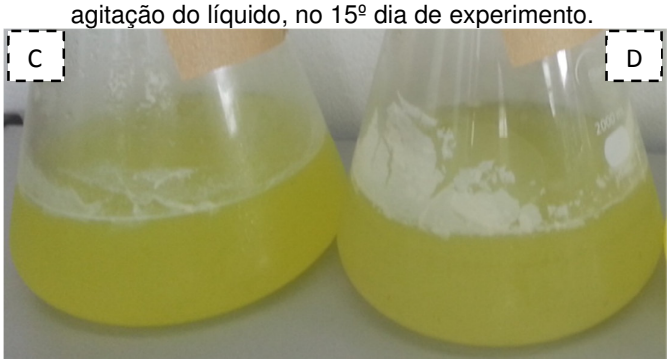
Segundo Santos e Fonseca (2007) o leite é um produto ligeiramente ácido e sua acidez natural tem origem na albumina, citratos, dióxido de carbono, caseínas e fosfatos que o compõem. Contudo, quando o leite é obtido e processado em condições inadequadas de higiene e refrigeração, ocorre o aumento de ácidos orgânicos, em especial o ácido lático, produzido por microrganismos fermentadores de lactose, resultando no aumento da acidez.

Os experimentos para avaliar a vida de prateira do permeado duraram até 31 dias. Em alguns tratamentos observou-se a descaracterização do produto em poucos dias. Notou-se o aparecimento de uma película branca na superfície do permeado, a alteração do seu aroma e viscosidade, sendo que estes três parâmetros foram observados visualmente (Figuras 8 e 9). Assim, os ensaios com permeado adicionado de 30, 20, 10 e 5 ppm de α-ácido duraram apenas 15 dias, em virtude da descaracterização do permeado. O permeado *in natura* também apresentou a mesma descaracterização, e foi mantido por 31 dias apenas como ensaio controle.

Figura 8 – Aparência dos ensaios com 10 ppm de α-ácidos (A) e do permeado pasteurizado (B), no 15º dia de experimento.

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 9 – Aparência dos ensaios com 5 ppm de α-ácidos (C) e 10 ppm de α-ácidos (D) após agitação do líquido, no 15º dia de experimento.



Fonte: Acervo pessoal.

Sabe-se que dentre os metabólitos produzidos pelas bactérias, como produto final de sua síntese, destaca-se a produção de ácidos orgânicos (CARVALHO; MONTEIRO, 2011).

Como observado nas Tabelas 13 e 14, a diferença entre os valores iniciais e finais de pH não foram relevantes. De acordo com Mizubuti (1994) os valores de pH do soro doce estão entre 5,8 e 6,6 e de acordo com USDEC (2004) entre 5,8 e 6,5. Os valores encontrados neste trabalho estão entre a faixa estabelecida por estes autores.

Tabela 13 - Variação de pH nos ensaios com permeado *in natura*, pasteurizado e com 40 ppm de α-ácidos.

Ensaio	Permeado	pH inicial	pH final	Total de dias
1	*in natura*	6,50a	5,95a	31
2	pasteurizado	6,26a	6,15a	31
3	com 40 ppm de α-ácido	6,50a	6,06a	22

*As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se que não houve diferença estatística entre os valores de pH encontrados para os diferentes tratamentos (Tabelas 13 e 14).

Tabela 14 - Variação de pH nos ensaios com permeado adicionado de 30, 20, 10 e 5ppm de α-ácidos.

Ensaio	Permeado	pH inicial	pH final	Total de dias
4	com 30 ppm de α-ácido	6,50a	6,17a	15
5	com 20 ppm de α-ácido	6,50a	6,15a	15
6	com 10 ppm de α-ácido	6,50a	6,22a	15
7	com 5 ppm de α-ácido	6,50a	6,18a	15

*As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A adição de α-ácidos do lúpulo pode ter sido responsável pela manutenção nos valores de pH, pela inibição do crescimento de microrganismos, pois como já relatado por Almeida e Silva et al. (2014) possuem efeito biocida.

Pela descaracterização do permeado ter ocorrido em tempos diferentes nos ensaios, fica evidente que a maior concentração de α-ácidos está relacionada com este comportamento. Almeida e Silva et al. (2014) relataram que a concentração de 40 ppm de α-ácidos é suficiente para proporcionar redução das células vivas de bactérias láticas. Contudo, o ensaio com essa concentração de α-ácidos demorou 7 dias a mais para apresentar a mesma descaracterização já observada nos ensaios com concentração inferior. Porém, os microrganismos avaliados por Almeida e Silva et al. (2014) foram apenas *L. casei* e *L. plantarum* cultivados em mosto preparado com caldo de cana, enquanto que neste trabalho o meio de cultura foi o permeado de leite, que deve conter outros microrganismos mais resistentes a esta concentração de α-ácidos testada.

O permeado pasteurizado foi o que melhor manteve suas características ao longo dos 31 dias de experimento. O ensaio com permeado *in natura*, apesar de ser mantido até o fim do experimento como ensaio padrão, também apresentou as alterações de aparência, aroma e viscosidade, como observadas nos outros ensaios.

5.2.2 Acidez titulável

Uma das características das bactérias do grupo “ácido láticas” é a formação de ácido lático como produto final do metabolismo de açúcares (INÊS et al., 2008). A avaliação da acidez do leite (Tabelas 15 e 16) tem por objetivo

detectar aumentos na concentração de ácido lático, formado durante a fermentação da lactose por bactérias. Todavia, a acidez não é determinada somente pela presença do ácido lático e sim de outros componentes do leite como os citratos, fosfatos e proteínas (SANTOS; FONSECA, 2007).

Nas Tabelas 15 e 16 relacionam-se os valores de acidez ao longo dos dias de experimento para os diferentes ensaios.

Tabela 15 - Variação da acidez nos ensaios com permeado *in natura*, pasteurizado e com 40 ppm de α-ácidos.

Ensaio	Permeado	Acidez inicial (% ácido lático m/v)	Acidez final (% ácido lático m/v)	Total de dias
1	*in natura*	0,34a	0,42a	31
2	pasteurizado	0,30b	0,31a	31
3	com 40 ppm de α-ácido	0,30b	0,38a	22

*As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se que não houve diferença significativa ao nível de 5% entre os valores finais de acidez para os sete ensaios realizados.

Tabela 16 – Variação da acidez nos ensaios com permeado adicionado de 30, 20, 10 e 5 ppm de α-ácidos.

Ensaio	Permeado	Acidez inicial (% ácido lático m/v)	Acidez final (% ácido lático m/v)	Total de dias
4	com 30 ppm de α-ácido	0,30b	0,36a	15
5	com 20 ppm de α-ácido	0,30b	0,36a	15
6	com 10 ppm de α-ácido	0,31b	0,36a	15
7	com 5 ppm de α-ácido	0,33a	0,36a	15

*As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A lesgislação brasileira não contempla um padrão de identidade e qualidade para o permeado de leite, não sendo possível compará-lo com outro produto, como o leite ou iogurte, por exemplo, pois tratam-se de produtos diferentes.

O permeado utilizado neste trabalho é concentrado, diferentemente do permeado estudado por outros autores (Tabela 12). Logo, pode-se explicar a discrepância entre os valores de acidez citados por Suaréz et al. (2006) e USDEC (2004) em relação aos valores encontrados neste trabalho.

Os ensaios com adição de 30, 20, 10 e 5 ppm α-ácidos apresentaram acidez semelhante apesar da diferença na concentração de α-ácidos entre eles. O ensaio com permeado *in natura* foi o que apresentou maior acidez inicial e final. O ensaio com permeado pasteurizado foi o que manteve a acidez praticamente constante ao longo de 31 dias de experimento, sendo o mais indicado para a conservação desta matéria prima.

5.2.3 Contagem padrão em placas

As bactérias incluídas no grupo “ácido láticas” são bacilos ou cocos gram positivos não móveis, ou raramente móveis, e que não formam endósporos, sendo comum sua presença em produtos de laticínio (INÊS et al., 2008).

As amostras dos ensaios com permeado *in natura*, pasteurizado e com adição de 40 ppm de α-ácidos, coletadas no 22º dia de experimento e submetidas às análises microbiológicas apresentaram os resultados da Tabela 17.

Ressalta-se que não houve crescimento de micro-organismos nas placas com meio McConkey.

Tabela 17 - Contagem de bactérias dos ensaios com permeado, no meio PCA.

Amostra	UFC/mL
Permeado *in natura*	$3{,}73 \times 10^7$
Permeado com adição de 40 ppm de α-ácidos	$3{,}60 \times 10^4$
Permeado pasteurizado	1,0

Observa-se que o ensaio contendo permeado com adição de 40 ppm de α-ácidos apresentou redução de 10^7 para 10^4 de UFC/mL quando comparado ao ensaio com permeado *in natura*. O ensaio submetido à pasteurização foi o que apresentou o melhor desempenho na inibição do crescimento microbiano com 22 dias de estocagem.

Ressalta-se que a pasteurização é o tratamento mais indicado para quando se deseja estocar o permeado por até 30 dias. A pasteurização não

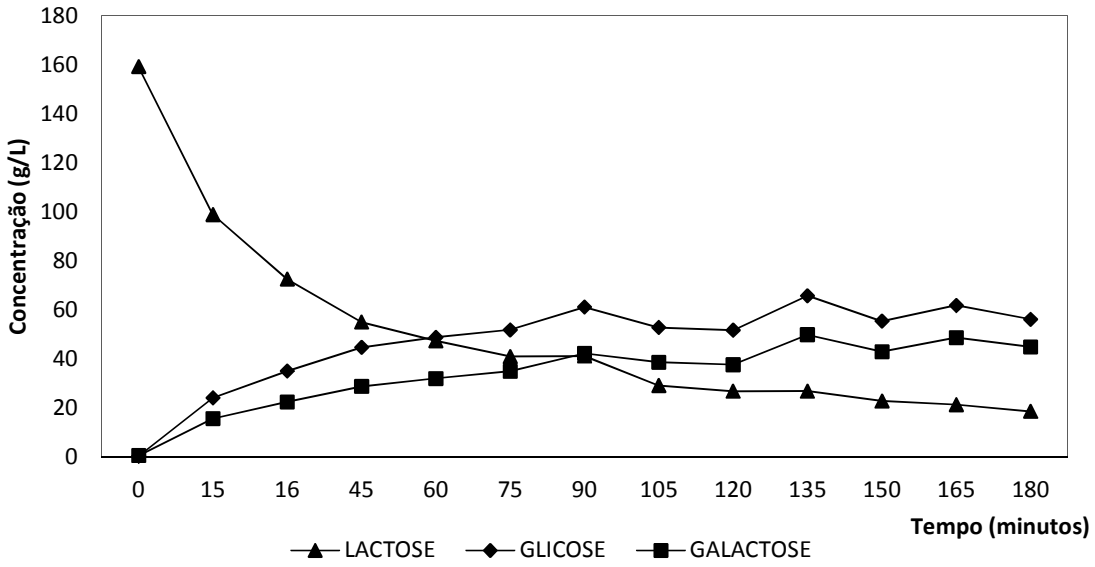
somente manteve as características sensoriais do permeado, como aparência, aroma e viscosidade, bem como foi eficaz na redução microbiana.

5.3 Hidrólise enzimática da lactose

O perfil da hidrólise enzimática da lactose para as diferentes concentrações de β-Galactosidase empregadas em pH 6,5 e temperatura de 40ºC pode ser observado nas Figuras 10 a 14. Em todos os ensaios partiu-se de uma concentração inicial de lactose de 159,1 g/L, valor ligeiramente superior ao encontrado na caracterização do permeado (Tabela 11), devido a diferenças de um lote para outro.

Empregando 1,0 mL/L de β-Galactosidase (Figura 10) observa-se que em 45 minutos 65% da lactose foi hidrolisada, e a partir de 105 minutos a velocidade de hidrólise diminui, passando de 29,1 g/L de lactose para 18,6 g/L ao final de 180 minutos.

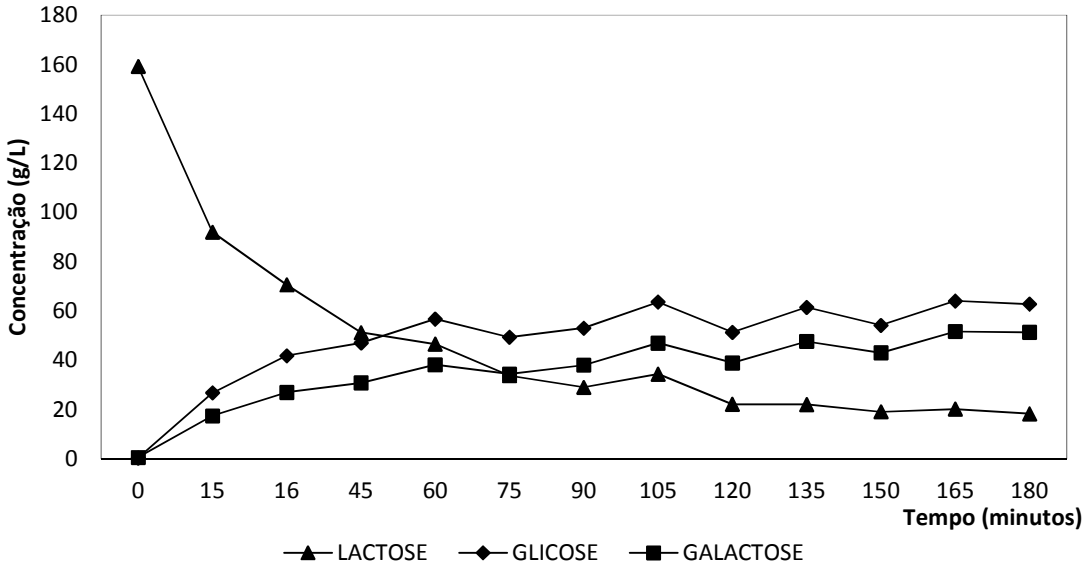
Figura 10 - Perfil de hidrólise da lactose com 1,0 mL/L de enzima, pH 6,5 e 40 ºC.



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 11 pode-se observar o perfil de hidrólise da lactose empregando 1,0 mL/L de β-Galactosidase juntamente com 40 ppm de α-ácidos do lúpulo.

Figura 11 - Perfil de hidrólise da lactose com 1,0 mL/L de enzima, 40 ppm de α-ácidos, pH 6,5 e 40 ºC.



Fonte: Próprio autor.

Combinando 1,0 mL/L de β-Galactosidase com 40 ppm de α-ácidos do lúpulo (Figura 11) observou-se que em 45 minutos, 70% da lactose já havia sido hidrolisada, porcentagem ligeiramente superior ao ensaio com a mesma concentração de enzima, mas sem os α-ácidos do lúpulo.

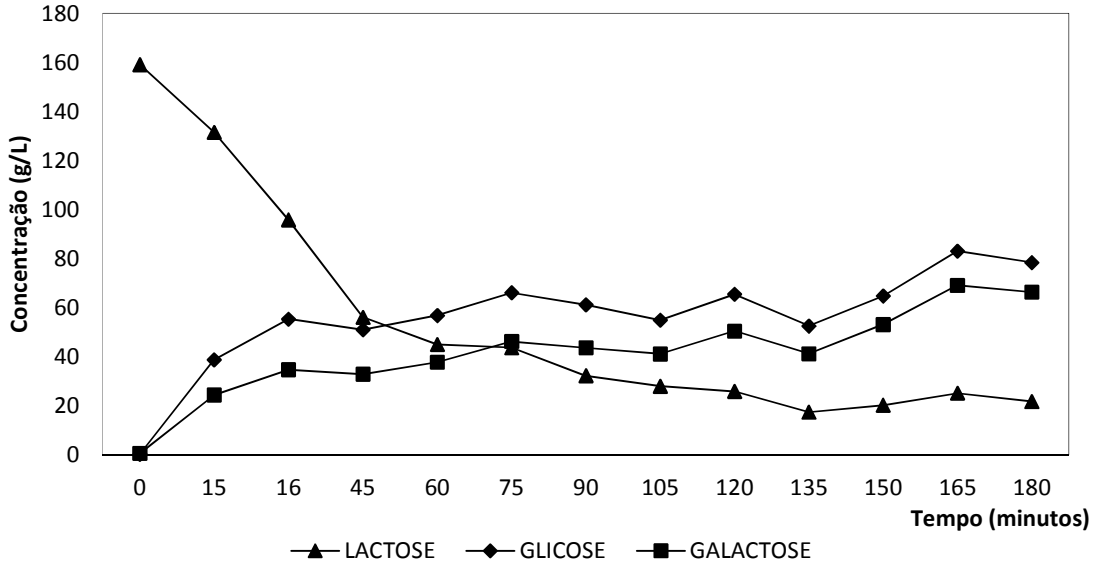
Na literatura não foram encontrados estudos sobre o efeito dos α-ácidos do lúpulo sobre a β-galactosidase.

Embora a combinação dos α-ácidos tenha sido feita com a menor concentração de enzima testada, observa-se que o perfil de hidrólise da lactose assemelhou-se mais ao ensaio que empregou 2,0 mL/L de β-galactosidase, conforme Figura 13. Observou-se um leve aumento no grau de hidrólise da lactose no ensaio que combinou β-galactosidase com 40 ppm de α-ácidos (Tabela 18), em relação ao ensaio que empregou 1,0 mL/L de β-galactosidase, bem como nas concentrações de glicose e galactose ao final de 180 minutos (Tabela 19).

Isso pode sugerir um possível efeito ativador dos α-ácidos sobre a atividade da β-galactosidase. Considerou-se que esse possível efeito ativador pudesse ser advindo de uma alteração do pH do meio pela adição dos α-ácidos. Contudo, como relatado na Tabela 14, a adição destes compostos, em diferentes concentrações, não alterou o pH do permeado. Estudos futuros serão necessários para melhor entendimento dos α-ácidos sobre a atividade da β-galactosidase.

Na Figura 12 observa-se o perfil de hidrólise da lactose para o ensaio com 1,5 mL/L de β-Galactosidase. Observam-se concentrações finais de glicose e galactose, de 78,4 g/L e 66,4 g/L respectivamente, as quais foram superiores às encontradas nos ensaios empregando menor concentração de enzima. No ensaio com 1,0 mL/L de β-Galactosidase com ou sem a presença de α-ácidos do lúpulo as concentrações ficaram na faixa de 59,5 g/L para glicose e 48,1 g/L para galactose, ao fim de 180 minutos de hidrólise.

Figura 12 - Perfil de hidrólise da lactose com 1,5 mL/L de enzima, pH 6,5 e 40ºC.



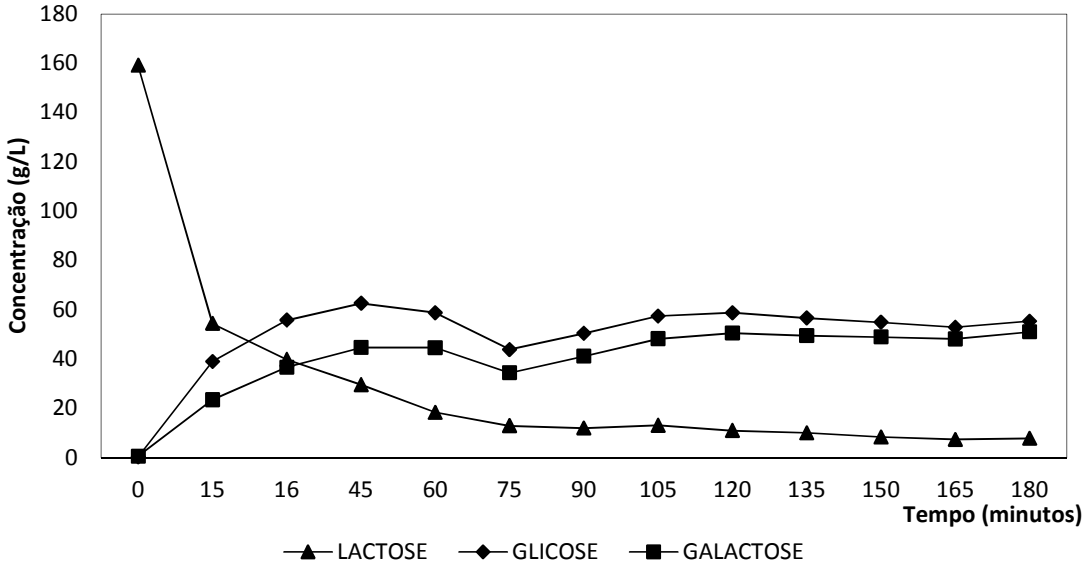
Fonte: Próprio autor.

Como era de se esperar, a partir do momento que houve um aumento na concentração de enzima, o tempo necessário para hidrólise diminui, pois há maior quantidade de sítios ativos disponíveis para o substrato. Na Figura 13, com emprego de 2,0 mL/L de β-Galactosidase, e com 15 minutos de experimento observa-se que grau de hidrólise da lactose foi de 65,8%. De 90 a 180 minutos a velocidade de hidrólise diminui, pelo fato de que, 92,5% do substrato já foram hidrolisados neste período. Na Tabela 18 estão relacionadas as porcentagens de hidrólise da lactose para todos os ensaios realizados, com diferentes concentrações de enzima.

Quando se utilizou 2,0 ml/L de β-Galactosidase (Figura 13) a diferença entre a concentração de glicose e galactose liberadas na hidrólise foi menor que a diferença encontrada para estes mesmos açúcares, nos outros ensaios que

empregaram menores concentrações de enzima (Figuras 10, 11 e 12). Na Tabela 19 estão relacionadas as concentrações de glicose e galactose (g/L) durante os ensaios com diferentes concentrações de β-galactosidase.

Figura 13 - Perfil de hidrólise da lactose com 2,0 mL/L de enzima, pH 6,5 e 40ºC.

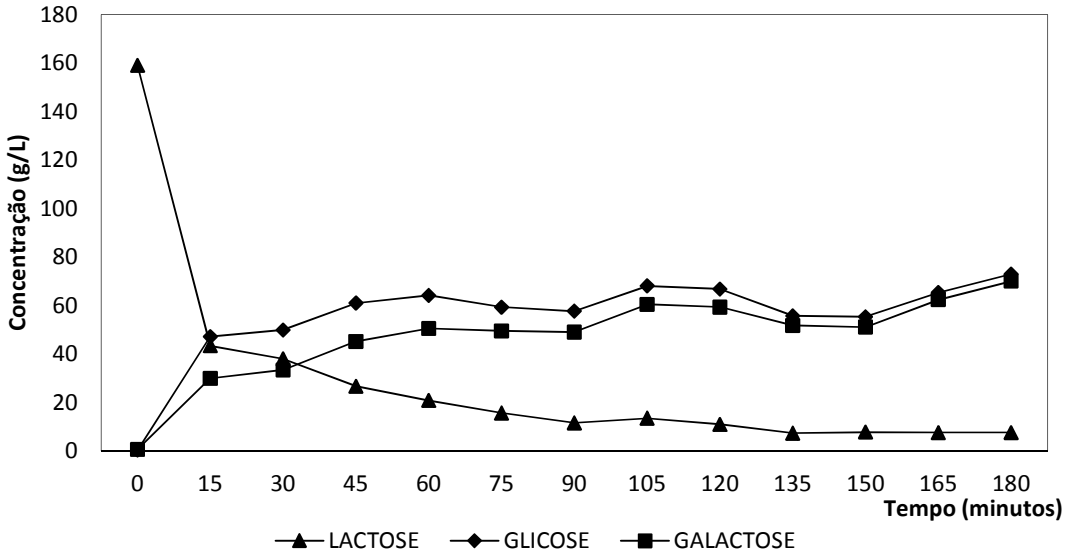


Fonte: Próprio autor.

Na Figura 14 observa-se o perfil de hidrólise da lactose quando se empregou a maior concentração de β-galactosidase, de 3,5 mL/L. Com 15 minutos 72,7% da lactose foi hidrolisada. Ao final de 180 minutos de hidrólise obteve-se pouca diferença entre as concentrações de glicose e galactose, respectivamente, 73,0g/L e 70,1/L, sendo estas as maiores concentrações alcançadas dentre todos os ensaios realizados.

Como pode ser observado nos gráficos apresentados para todos os ensaios (Figuras 10 a 14), a partir de 120 minutos, a concentração de lactose permanece praticamente constante, indicando declínio da atividade enzimática. Sendo assim, os ensaios podem ser realizados em menor tempo.

Figura 14 - Perfil de hidrólise da lactose com 3,5 mL/L de enzima, pH 6,5 e 40ºC.



Fonte: Próprio autor.

Na Tabela 18 é possível observar, para todos os ensaios, no tempo de 120 minutos, que o grau de hidrólise da lactose fica entre 83 e 93%, havendo pouco acréscimo nesta porcentagem até o final de 180 minutos. Estes resultados diferem de Carminatti (2001) que utilizou um permeado de soro com 4% de lactose, e obteve 82% de hidrólise em 60 minutos, em um reator em batelada. Entretanto, ressalta-se que o permeado utilizado neste trabalho possuía cerca de 15% de lactose, o que justifica utilizar um maior tempo para alcançar maiores conversões. Carminatti (2001) utilizou 1,25g/L de lactase comercial para alcançar 82% de hidrólise, e no presente trabalho, menores quantidades de enzima proporcionaram resultados semelhantes de conversões, mas com 90 minutos de hidrólise.

O grau de hidrólise alcançado com 90 minutos (Tabela 18), para as diferentes concentrações de β-galactosidase, também difere do encontrado por Tremarim (2007). Este autor alcançou 95% de hidrólise da lactose após 90 minutos de processo, utilizando reator a membrana e uma concentração de enzima de 0,2g/L na temperatura de 35ºC e pH 6,8, partindo de uma concentração inicial de lactose de 4,14g/100g no permeado de leite. Sabe-se que os processos utilizando reatores a membrana são mais indicados para a hidrólise, tendo em vista que são capazes de reter totalmente a enzima no reator e permitir

que o produto liberado seja retirado do sistema, e assim não cause possíveis efeitos de inibição sobre a enzima (TREMARIN, 2007).

Tabela 18 - Grau de hidrólise da lactose (%) durante os ensaios com diferentes concentrações de β-galactosidase.

	Grau de hidrólise da lactose (%)				
Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
90	74,1	81,8	79,7	92,5	92,7
120	83,1	86,1	83,7	93,1	93,1
150	85,6	88,0	87,3	94,7	95,1
180	88,3	88,5	86,3	95,1	95,2

Ensaios: (1) 1,0 mL/L β-Galactosidase; (2) 1,0 mL/L β-Galactosidase + 40 ppm de α-ácidos; (3) 1,5 mL/L β-Galactosidase; (4) 2,0 mL/L β-Galactosidase; (5) 3,5 mL/L β-Galactosidase;

Uma molécula de lactose é formada pela ligação de uma molécula de glicose e uma de galactose (SANTIAGO et al., 2004). Contudo, esta proporção 1:1 não foi observada nos perfis de hidrólise da lactose (Figuras de 10 a 14). Na Tabela 19 nota-se que a diferença nas concentrações de glicose e galactose é maior quando se utilizou menores concentrações de enzima.

Tabela 19 - Concentração de glicose e galactose (g/L) durante os ensaios com diferentes concentrações de β-galactosidase.

	Concentração de glicose e galactose (g/L)									
Tempo (min)	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4		Ensaio 5	
	Gli	Gal	Gli	Gal	Gli	Gal	Gli	Gal	Gli	Gal
90	61,1	42,3	53,1	38,0	61,2	43,7	50,4	41,2	57,7	49,1
120	51,7	37,7	51,3	38,9	65,5	50,5	58,7	50,5	66,8	59,3
150	55,4	43,0	54,1	43,0	64,8	53,2	54,9	49,0	55,4	51,1
180	56,2	44,9	62,7	51,3	78,4	66,4	55,3	51,0	73,0	70,1

Ensaios: (1) 1,0 mL/L β-Galactosidase; (2) 1,0 mL/L β-Galactosidase + 40 ppm de α-ácidos; (3) 1,5 mL/L β-Galactosidase; (4) 2,0 mL/L β-Galactosidase; (5) 3,5 mL/L β-Galactosidase.

Esta diferença já era esperada tendo em vista o conhecimento prévio sobre a formação de galactoligossacarídeos. Segundo López-Leiva e Guzmán (1995) oligossacarídeos são carboidratos poliméricos que consistem da ligação de 2 a 10 monômeros, e são formados durante a hidrólise enzimática da lactose. A formação de galactoligossacarídeos é influencia por diversos fatores como a concentração inicial de substrato, a concentração de enzima, pH, temperatura,

fonte da enzima e pela presença de minerais, que em determinados níveis podem retardar a atividade da enzima (RUSTOM et al., 1998).

Rustom et al. (1998) empregando concentração de enzimas de 0,05 a 0,1%, utilizando duas enzimas de fontes fúngicas diferentes e uma de fonte bacteriana, relatou que a concentração máxima de galactoligossacarídeos formada durante a hidrólise foi significativamente aumentada quando alterou a concentração inicial de lactose de 14 para 23%.

No presente trabalho, comportamento similar ao obtido por Rustom et al. (1998) foi observado, pois empregando concentrações de β-galactosidase de 1,0 a 1,5 mL/L encontraram-se maiores diferenças entre as concentrações de glicose e galactose, correspondendo à maior formação de galactoligossacarídeos.

Com objetivo de escolher a melhor condição de hidrólise, que para este trabalho seria aquela que empregasse menor quantidade de enzima, combinada com o menor tempo de tratamento, aplicou-se o Teste de Tukey para avaliar as concentrações de lactose de 90 a 180 minutos, em todos os ensaios. Os resultados encontram-se na Tabela 20. Observa-se que as menores concentrações de lactose (g/L) foram obtidas nos ensaios com maior concentração de enzima e o inverso também ocorreu.

Analisando os ensaios com 1,5 mL/L, 2,0 mL/L e 3,5 mL/L de β-galactosidase verifica-se que o tempo de hidrólise pode ser reduzido a 120 minutos, pois as concentrações de lactose são estatisticamente iguais ($p<0,05$) às concentrações obtidas com 180 minutos. Já o ensaio com 1,0 m/L de β-galactosidase poderia ser reduzido a 165 minutos, pelo mesmo motivo.

Tabela 20 - Concentração de lactose (g/L) no permeado durante a hidrólise com diferentes concentrações de β-galactosidase.

	Concentração lactose (g/L)				
Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
90	41,17a	28,99ab	32,25a	11,96ab	11,58a
105	29,15ab	34,38a	28,05a	13,15a	13,47a
120	26,84ab	22,08bc	25,91a	10,98abc	10,94a
135	26,90ab	19,07bc	17,42a	10,09abc	7,36a
150	22,86ab	20,14bc	20,24a	8,41bc	7,79a
165	21,35b	18,26bc	25,14a	7,40c	7,59a
180	18,60b	28,99c	21,76a	7,86c	7,61a

Ensaios: (1) 1,0 mL/L β-Galactosidase; (2) 1,0 mL/L β-Galactosidase + 40 ppm de α-ácidos; (3) 1,5 mL/L β-Galactosidase; (4) 2,0 mL/L β-Galactosidase; (5) 3,5 mL/L β-Galactosidase;

*As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Um novo Teste de Tukey foi aplicado para todos os ensaios, apenas com as concentrações de lactose em 120 minutos, e não houve diferença significativa entre eles. Considerando a premissa de melhor condição de hidrólise, o emprego de 2,0 ml/L de β-galactosidase mostrou-se mais indicado, com 93,1% de hidrólise em 120 minutos (Tabela 18). Ao analisar a Tabela 20 observa-se que a concentração de lactose em 120 e 90 minutos, para 2,0 ml/L de enzima, é estatisticamente igual ($p<0,05$). Com objetivo de reduzir para 90 minutos o tempo de hidrólise realizou-se novamente o Teste de Tukey, apenas com as concentrações de lactose em 90 minutos de hidrólise, dispostas na Tabela 21.

Tabela 21 – Concentração de lactose (g/L) no permeado com 90 minutos de hidrólise em diferentes concentrações de β-galactosidase.

	Concentração lactose (g/L)				
Tempo (min)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
90	41,17a	28,99a	32,25a	11,96b	11,58b

Ensaios: (1) 1,0 mL/L β-Galactosidase; (2) 1,0 mL/L β-Galactosidase + 40 ppm de α-ácidos; (3) 1,5 mL/L β-Galactosidase; (4) 2,0 mL/L β-Galactosidase; (5) 3,5 mL/L β-Galactosidase;

*As médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Embora os ensaios 4 e 5, com 2,0 mL/L e 3,5 mL/L de β-galactosidase, respectivamente, sejam estatisticamente iguais ($p<0,05$), a melhor condição de hidrólise escolhida, para o tratamento do permeado concentrado de leite a ser utilizado como adjunto na fabricação das cervejas, é aquela obtida com 90 minutos e com 2,0 mL/L de β-galactosidase, combinando menor concentração de enzima e menor tempo, e alcançando 92,5% de hidrólise.

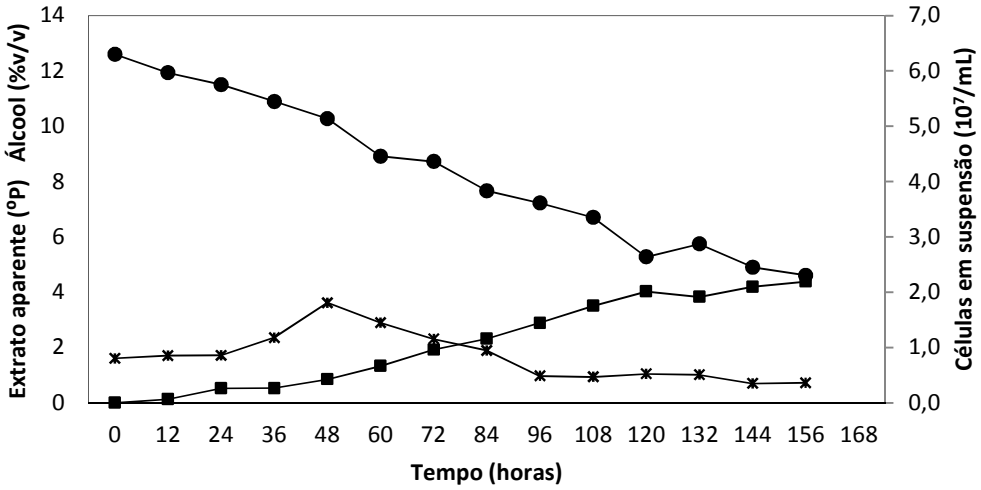
5.4 Parâmetros de fermentação

As cervejas obtidas com cinco tipos de mostos diferentes apresentaram distintos tempos de fermentação, sendo 120h para as cervejas com permeado não hidrolisado, 156h para a cerveja puro malte e 168h para as cervejas com permeado hidrolisado. A presença de galactose nos mostos com permeado hidrolisado pode ser a responsável pelo aumento no tempo de fermentação.

Nas Figuras de 15 a 19 podem ser vistos os perfis de fermentação para as diferentes cervejas produzidas e na Tabela 22 suas respectivas análises físico-químicas.

A cerveja puro malte foi produzida em triplicata devido ao fato que apresentou produção de etanol e fermentabilidade inferiores às cervejas que empregaram permeado concentrado de leite como adjunto. Contudo, o perfil de fermentação foi semelhante em todas as repetições, como observado na Figura 15.

Figura 15 - Perfil de fermentação da cerveja puro malte. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL).



Fonte: Próprio autor.

Para a cerveja puro malte observou-se uma fase lag de 36h e um curto período exponencial de crescimento da levedura, ao redor de 48h, acarretando na demora no consumo de extrato, bem como na formação de álcool. Duas variáveis podem ter contribuído para este comportamento: a quantidade de inóculo e a oxigenação do mosto no início da fermentação.

Segundo Graham (2015) um inóculo com quantidade inferior de células proporciona uma fase lag longa e pode dar oportunidade para fermentação bacteriana. O inóculo feito, em média, com 8,5 x 10^6 cel/mL, apresentou concentração de células inferior aos inóculos das outras cervejas produzidas, que se iniciaram com 1,0 x 10^7 cel/mL. O inóculo das triplicatas da cerveja puro malte foi preparado com leveduras liofilizadas oriundas de um mesmo lote, e pela

viabilidade da cepa estar sujeita a variações de um lote para outro, pode-se relacionar a este fato. As outras cervejas foram fermentadas com um lote diferente de leveduras. Ainda, segundo Graham (2015), um inóculo com quantidade de células inferior ou superior está relacionado ao surgimento de sabores/aromas indesejáveis na cerveja.

Pode-se relacionar uma longa fase lag a uma possível deficiência na oxigenação do mosto. De acordo com Russel (2006) a levedura cervejeira requer oxigênio molecular para sintetizar esteróis e ácidos graxos insaturados, que estão presentes no mosto, mas em quantidade reduzidas. A levedura é capaz de crescer em condições estritamente anaeróbias, contudo, apenas quando há uma fonte exógena destes compostos.

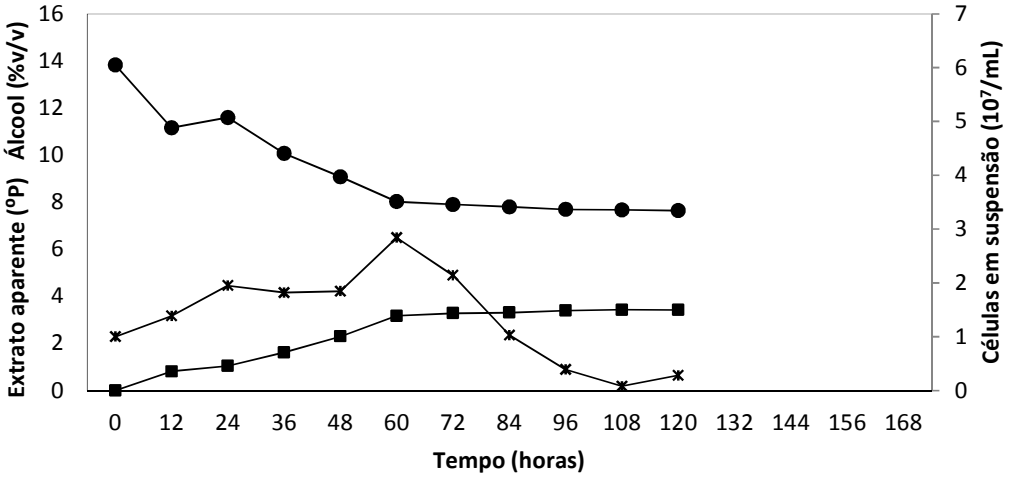
Na Tabela 22 podem-se observar os valores de álcool, extrato real e aparente e a atenuação real e aparente de fermentação para as cervejas produzidas com cincos mostos diferentes.

A cerveja puro malte alcançou um teor alcóolico de 4,38% (v/v) (Tabela 22). O teor alcóolico encontrado para a cerveja puro malte foi inferior ao valor encontrado para a cerveja 90/10 com permeado não hidrolisado, 5,08% (v/v) e para as cervejas 90/10 e 55/45 com permeado hidrolisado, 5,04 e 4,92% (v/v), respectivamente, porém estes valores não diferem estatisticamente ($p<0,05$).

Em condições normais as cepas de *S. cerevisiae* cervejeira são capazes de fermentar todos os açúcares naturalmente contidos no mosto como glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, nesta sequencia aproximadamente. E a maioria das cepas não fermenta maltotrealose e dextrinas (RUSSEL, 2006).

A lactose também não é um açúcar fermentescível por *S. cerevisiae* (WALKER, 1998), e por isso, para a cerveja 55/45 (Figura 16) produzida com permeado não hidrolisado observou-se um valor de extrato aparente mais elevado ao final da fermentação, de 7,64ºP, estatisticamente diferente ($p>0,05$) dos demais (Tabela 22). A lactose contribuiu para um valor menor de extrato fermentável no mosto com 45% de permeado, resultando em maior quantidade de extrato aparente residual ao final da fermentação.

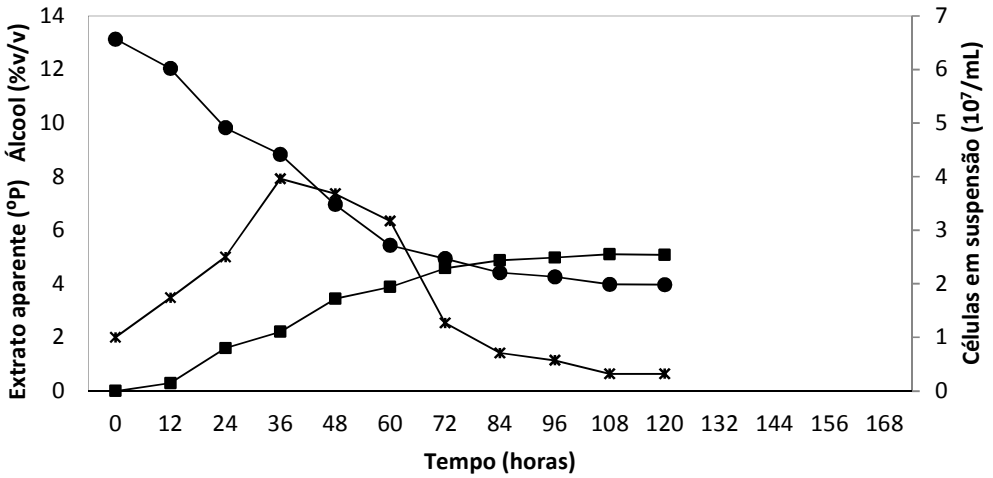
Figura 16 - Perfil de fermentação da cerveja 55/45 com permeado não hidrolisado. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL).



Fonte: Próprio autor.

Embora as porcentagens de permeado não hidrolisado empregadas sejam diferentes, perfis semelhantes de fermentação foram observados para as cervejas 55/45 e 90/10 (Figuras 16 e 17). Os teores de álcool finais foram de 3,42% (v/v) para a cerveja 55/45 e 5,08% (v/v) para a cerveja 90/10 (Tabela 22). Para ambas as cervejas observou-se ao uma fase lag de 12h, contra 36h da cerveja puro malte, e a partir das 96h houve declínio da concentração de leveduras em suspensão, perfil característico da fase final da fermentação. A floculação é uma das características das leveduras cervejeiras, comportamento que permite que a mesma seja separada da cerveja, clarificando a bebida. A floculação começa a ocorrer quando há uma diminuição na quantidade de substrato disponível para a fermentação (RUSSEL, 2006).

Figura 17 - Perfil de fermentação da cerveja 90/10 com permeado não hidrolisado. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL).



Fonte: Próprio autor.

Nas Figuras 18 e 19, observa-se o perfil de fermentação das cervejas produzidas com 55/45 e 90/10 de malte/permeado hidrolisado, respectivamente.

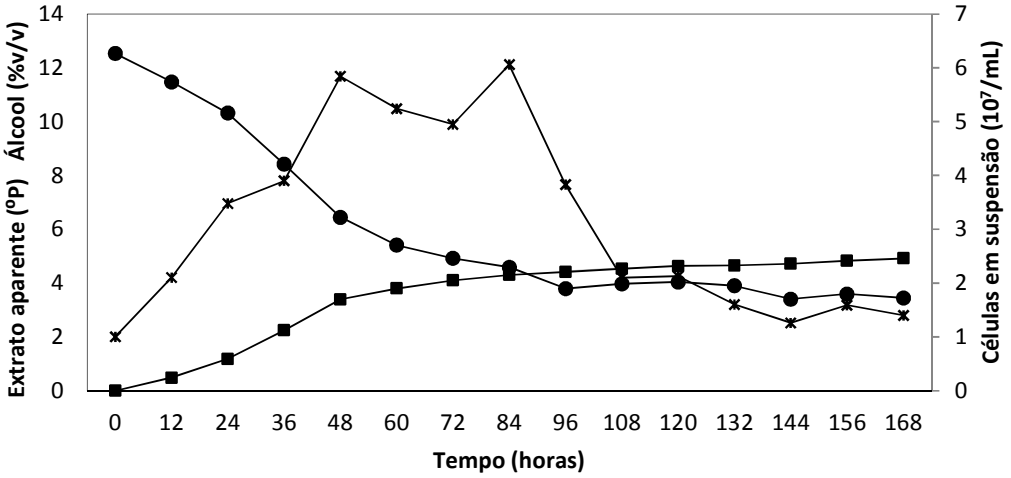
O passo inicial para a utilização de qualquer açúcar pela levedura é a passagem intacta deste açúcar através da membrana celular ou sua hidrólise extracelular para depois o carboidrato adentrar a membrana celular. Glicose e sacarose são sempre consumidas primeiro (RUSSEL, 2006). Quando estes açúcares estão presentes as enzimas requeridas para a utilização de fontes alternativas de carbono são sintetizadas com baixas taxas, fenômeno conhecido como repressão catabólica (GANCEDO, 1998). O catabolismo da galactose por *S. cerevisiae* é um exemplo de sistema enzimático induzido, onde as enzimas estão sendo sintetizadas. Quando há glicose no meio, a transcrição dos Genes GAL é reprimida mesmo se a galactose também estiver presente (GANCEDO, 1998).

O maior tempo de fermentação para as cervejas com permeado hidrolisado, contendo galactose como uma das fontes de carbono, pode estar associado ao efeito de repressão catabólica, pois o consumo de galactose só seria possível na ausência de glicose.

Segundo González Siso (1996) quando *S. cerevisiae* utiliza a mistura de glicose e galactose como fonte de carbono, manifesta-se o crescimento diáuxico até mesmo para as estirpes anteriormente adaptado à galactose. Contudo este comportamento não foi observado nas fermentações das cervejas 55/45 e 90/10 com permeado hidrolisado (Figuras 18 e 19), dado que não foi observada uma

nova fase lag no perfil de fermentação para ambas as cervejas. Souza et. al (2005), que estudou a fermentação, por *S. cerevisiae*, simultânea à hidrólise da lactose do soro de queijo, também não observou crescimento diáuxico.

Figura 18 - Perfil de fermentação da cerveja 55/45 com permeado hidrolisado em pH 6,5, 40ºC, 90 minutos e 2,0 mL/L de β-Galactosidase. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL).



Fonte: Próprio autor.

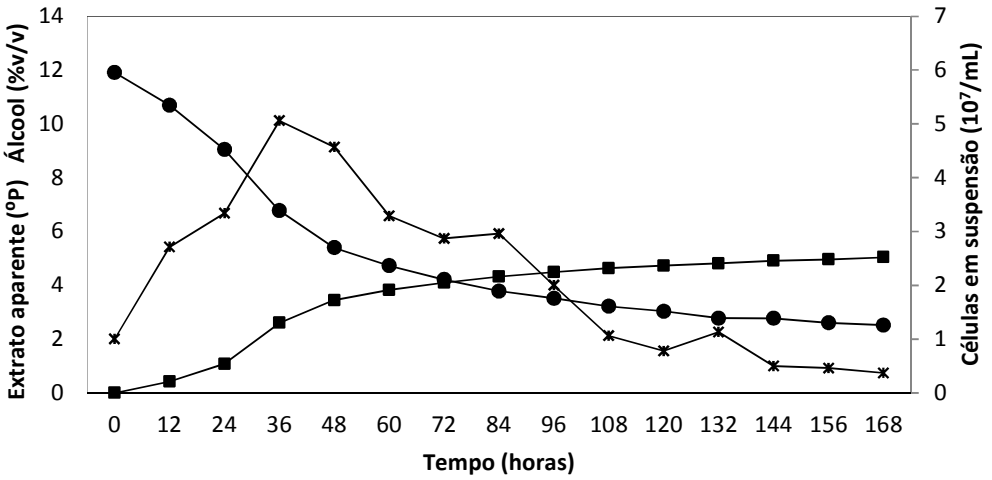
Diferentemente da afirmação citada por González Siso (1996) não foi observada baixa produção de etanol para cervejas produzidas com permeado hidrolisado, em que a levedura utilizou tanto glicose como galactose como fonte de carbono, além dos açúcares naturalmente presentes no mosto. Alcançou-se teores alcoólicos de 4,92% (v/v) para a cerveja 55/45 e 5,04% (v/v) para a cerveja 90/10 (Tabela 22) com permeado hidrolisado, valores que são estatisticamente iguais ($p<0,05$).

Brunelli (2012) obteve teores alcoólicos de 4,80% (v/v) para cerveja com 20% de mel e 4,52% (v/v) para cerveja com 40% de mel, partindo de um extrato inicial de 11ºBrix. Os teores alcóolicos encontrados por este autor são ligeiramente inferiores aos encontrados para as cervejas com diferentes proporções de permeado hidrolisado. Santos (2011) obteve teor alcóolico ligeiramente superior, de 5,35% (v/v), em média, para os três lotes de cerveja produzida com 45% de arroz preto.

Na Figura 19, que relaciona o perfil de fermentação da cerveja 90/10 com permeado hidrolisado, observa-se que 50% do extrato foiconsumido em 60h de

fermentação e que a partir de 108h de fermentação houve um declínio no número de células em suspensão, como também foi observado para a cerveja produzida com 55/45 de permeado hidrolisado.

Figura 19 - Perfil de fermentação da cerveja 90/10 com permeado hidrolisado em pH 6,5, 40ºC, 90 minutos e 2,0 mL/L de β-Galactosidase. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL).



Fonte: Próprio autor.

Na Tabela 22 podem-se observar os valores de álcool, extrato real e aparente e a atenuação real e aparente de fermentação para as cervejas produzidas com cincos mostos diferentes.

Tabela 22 - Análise físico-química da cerveja puro malte e das cervejas com permeado concentrado de leite, em diferentes proporções.

		Permeado não hidrolisado		**Permeado hidrolisado**	
	Puro malte	**55/45**	**90/10**	**55/45**	**90/10**
Álcool (%v/v)	4,38ab	3,43b	5,08a	4,92a	5,04a
Extrato real (% m/m)	6,15b	8,78a	5,70b	4,24c	4,26c
Extrato original (ºP)	12,60ab	13,83a	13,31ab	12,53ab	11,91b
Extrato aparente (ºP)	4,61b	7,64a	3,97bc	3,45bc	2,52c
Atenuação real (%)	54,30b	38,25c	58,91ab	60,72ab	65,72a
Atenuação aparente (%)	65,85b	44,75c	70,18b	72,52ab	78,85a
Densidade (g/cm^3)	1,016	1,028	1,014	1,012	1,008

*As médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Em processos cervejeiros a atenuação, também chamada de grau de fermentação, é a medida de conversão de extrato (açúcares) do mosto em álcool e CO_2. Denomina-se atenuação aparente o valor de conversão de extrato na presença de álcool, cuja densidade interfere na medição, diminuindo o valor encontrado. A atenuação real desconsidera a presença de álcool no mosto, correspondendo ao valor real de conversão.

O maior valor de extrato aparente e a menor atenuação foram obtidos com a cerveja 55/45 com permeado não hidrolisado, como já citado anteriormente devido à porcentagem de lactose não fermentada. A cerveja 55/45 com permeado não hidrolisado apresentou 38,25% de atenuação real e quando o permeado foi submetido à hidrólise enzimática a atenuação real da cerveja 55/45 alcançou 60,72%.

Como relatado anteriormente, a cerveja puro malte também apresentou baixa atenuação real, de 54,30%. Aizemberg (2015) obteve 68,19% de atenuação real na fermentação de uma cerveja puro malte tipo *ale*. Martínez (2014) e Hendges (2014) obtiveram 75,9% de atenuação aparente para uma cerveja puro malte *lage*r.

Para a cerveja 90/10 com permeado hidrolisado houve um ligeiro aumento na atenuação real em comparação à mesma proporção com permeado não hidrolisado. Alcançou-se 65,72% de atenuação real para cerveja 90/10 com permeado hidrolisado, o maior grau entre todas as cervejas produzidas, embora estatisticamente igual ($p<0,05$) às cervejas 55/45 com permeado hidrolisado e 90/10 com permeado não hidrolisado.

Aizemberg (2015) produziu em escala de bancada cervejas com diferentes proporções de malte/melado de cana e utilizou uma levedura *ale* na fermentação. O melado de cana apresenta fermentabilidade elevada por conter sacarose e esta autora encontrou, em todas as proporções testadas, valores acima de 68% de atenuação real.

Muniz et al. (2014) produzindo uma cerveja com 15% de suco misto de cajá como adjunto de malte obtiveram 73,9% de fermentabilidade. No presente trabalho, os valores das atenuações reais foram inferiores devido à maior presença de lactose nas cervejas com permeado não hidrolisado, e também ao residual de lactose nas cervejas que empregaram o permeado hidrolisado, uma vez que no processo enzimático não é possível obter 100% de hidrólise.

A aparência das cervejas produzidas com cinco tipos de mostos diferentes, empregando permeado hidrolisado e não hidrolisado por ser vista na Figura 20.

Figura 20 - Aparência das cervejas produzidas com diferentes proporções de malte/permeado concentrado de leite.

Legenda: 1 – Cerveja puro malte; 2 – Cerveja 90/10 com permeado não hidrolisado; 3 – Cerveja 55/45 com permeado não hidrolisado; 4 – Cerveja 90/10 com permeado hidrolisado; 5 – Cerveja 55/45 com permeado hidrolisado.
Fonte: Acervo pessoal.

Em relação à aparência nota-se que mesmo utilizando até 45% de permeado concentrado de leite na produção das bebidas houve pouca variação na coloração das mesmas. Observou-se também uma espuma densa com boa estabilidade.

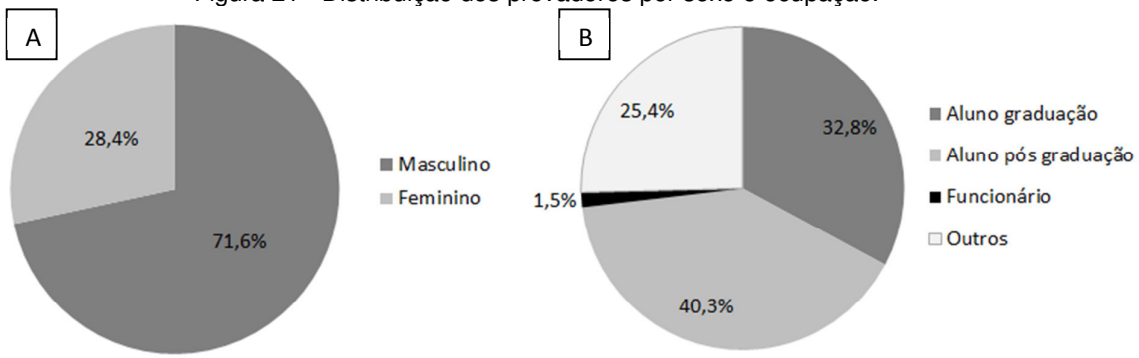
5.5 Análise Sensorial

A análise sensorial contou com a participação de estudantes, funcionários e outros (visitantes, prestadores de serviço, ex-alunos) da EEL/USP, com faixa etária de 18 a 63 anos.

A distribuição dos provadores por sexo e ocupação encontra-se na Figura 21. Nota-se a maior participação do sexo masculino, 71,6% contra 28,4% do sexo feminino, assim como o perfil relatado nos trabalhos de Aquilani et al. (2015) e

Castro et al. (2011), onde a participação do sexo masculino foi de 60,32% e 59%, respectivamente.

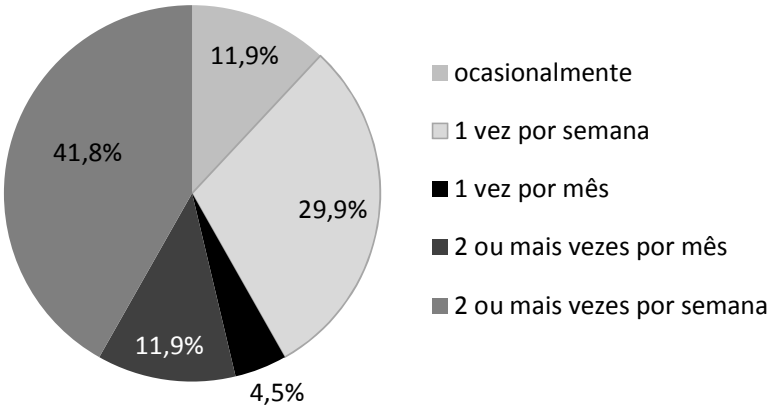
Figura 21 - Distribuição dos provadores por sexo e ocupação.



Fonte: Próprio autor.

Entre os entrevistados, 95,5% são consumidores regulares de cerveja e 41,8% consomem a bebida “duas ou mais vezes por semana” (Figura 22). Alquilani et al. (2015) encontrou resultados semelhantes, sendo 28,74% de consumo “uma ou duas vezes por semana”, para consumidores de cervejas populares. Quando estes autores estudaram o consumo de cervejas artesanais a mesma frequência de consumo caiu para 16,73%. Castro et al. (2011) estudando o consumo de bebidas alcóolicas relataram que 38% dos entrevistados consomem cervejas “2 ou 3 vezes por dia / por semana”, e esta é a bebida preferida de 54% dos entrevistados.

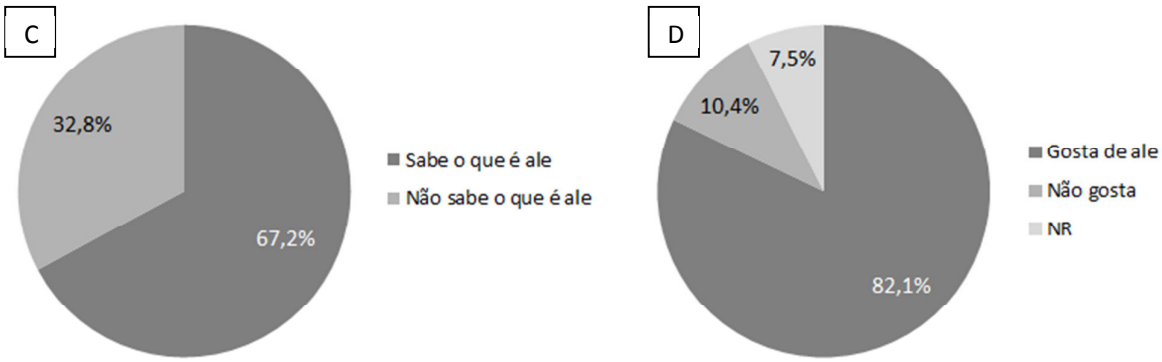
Figura 22 - Distribuição dos provadores quanto à frequencia de consumo de cerveja.



Fonte: Próprio autor.

Quando questionados sobre o conhecimento e preferência por cervejas *ale* (Figura 23), 67,2% sabem o que é uma cerveja tipo *ale* e 82,1% disseram ser apreciadores de estilos *ale*, como por exemplo: *weiss* (trigo), *pale ale*, *IPA (india pale ale)*, *blond ale*, *saison*, *tripel*, *stout*, *porter*.

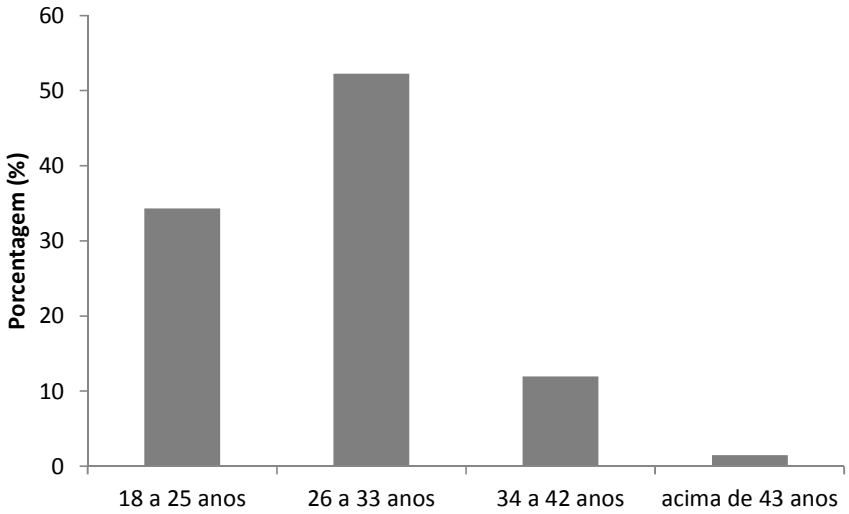
Figura 23 - Conhecimento e preferência dos provadores por cervejas de alta fermentação (*ale*).



Fonte: Próprio autor.

A distribuição etária, apresentada na Figura 24, mostra que 52,2% dos provadores possuem entre 26 e 33 anos.

Figura 24 – Distribuição dos provadores por faixa etária.

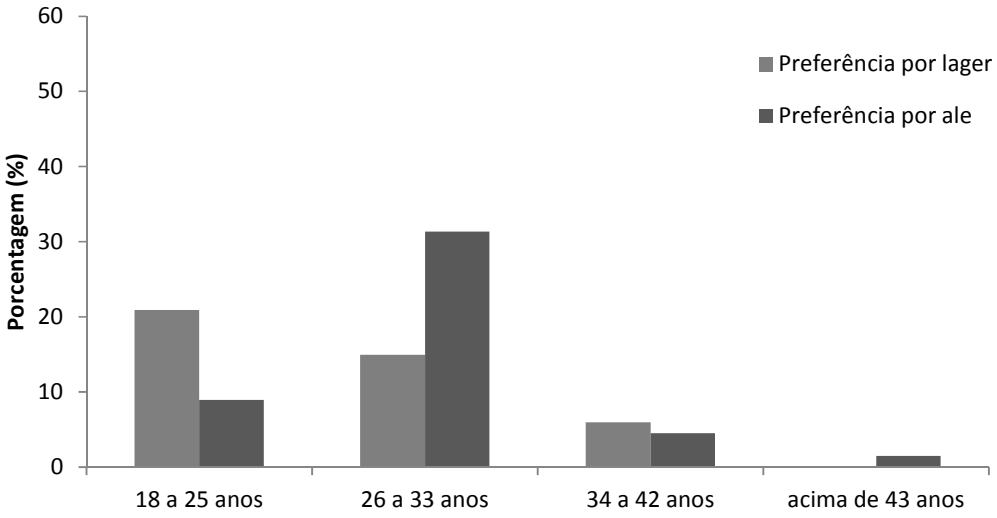


Fonte: Próprio autor.

A Figura 25 mostra a preferência por cerveja tipo *lager* ou *ale* de acordo com a faixa etária dos provadores. Nota-se que a preferência por cervejas *ale* é

maior na faixa etária de 26 a 33 anos, e a preferência por *lager* é maior na faixa etária mais jovem, de 18 a 25 anos. A preferência por cervejas *lager*, 98% da produção do Brasil (Pilsen..., 2012), pelos jovens universitários está associada ao poder aquisitivo e a facilidade de encontrar cervejas comerciais (mainstream).

Figura 25 - Preferência por *lager* ou *ale*, por faixa etária dos provadores.

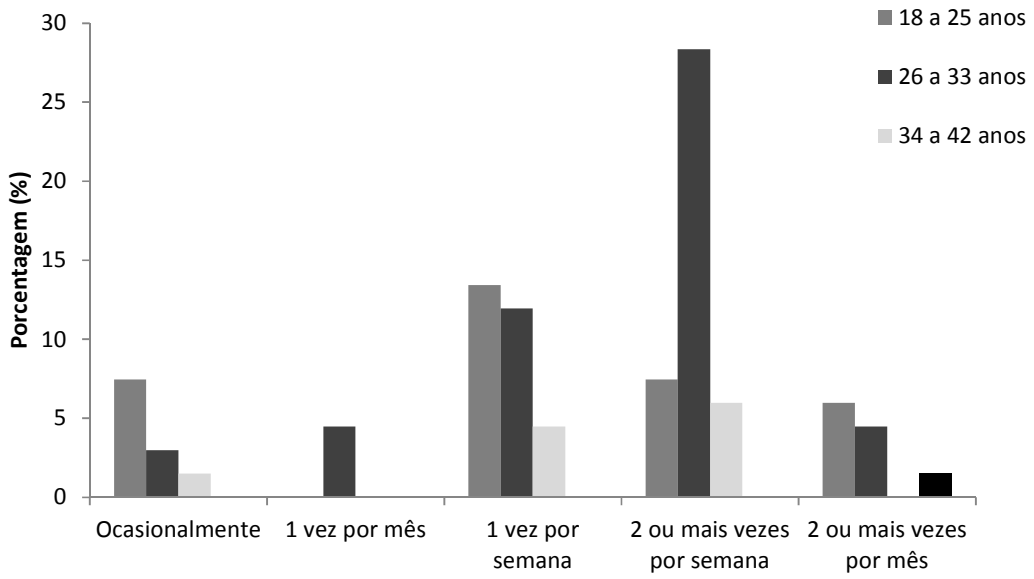


Fonte: Próprio autor.

Aquilani et al. (2015) observaram que consumidores entre 42 e 49 anos são mais propensos a beber cerveja artesanal do que os jovens entre 18 e 25 anos. Estes autores relataram que ser consumidor de cervejas comerciais e artesanais afeta significativamente a importância atribuída ao aroma, espuma, qualidade e carbonatação da cerveja.

A Figura 26 relaciona a frequencia de consumo de cerveja por faixa etária. Provadores na faixa etária de 26 a 33 anos apresentam maior frequencia de consumo de cerveja, de “duas ou mais vezes por semana”.

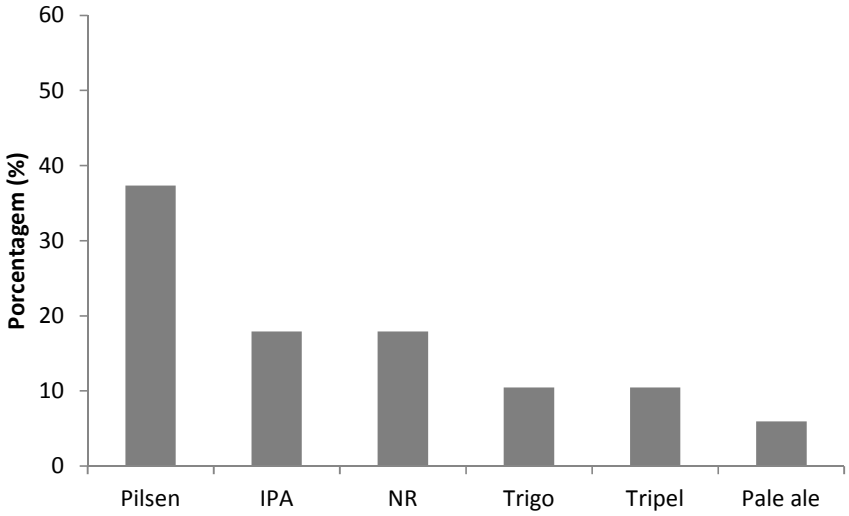
Figura 26 - Frequencia de consumo de cerveja, por faixa etária dos provadores.



Fonte: Próprio autor.

Os estilos preferidos pelos provadores podem ser vistos na Figura 27. Como era esperado, a cerveja Pilsen foi preferida de 37,3% dos provadores. O estilo é oriundo da cidade de Pils, na República Tcheca e a cerveja Pilsen (ou Pilsener) é a mais conhecida e consumida no mundo. No Brasil, sua participação chega a 98% do total comercializado (Pilsen..., 2012).

Figura 27 – Estilos de cerveja preferidos pelos provadores.



Fonte: Próprio autor.

Por possuir características bastante discrepantes em termos de amargor, pois o estilo Pilsen possui entre 22 a 40 IBU e o estilo IPA entre 40 e 60 IBU (BJPC, 2015) foi inusitado ter na segunda posição o estilo IPA, com 17,9% de preferência (Figura 27). Segundo Saorin (2010) é previsto que as cervejas especiais, importadas ou artesanais, no Brasil tenham uma taxa de crescimento maior, se comparada às taxas previstas para o mercado da tradicional Pilsen.

Ressalta-se que os estilos citados como preferidos pelos provadores, depois do estilo Pilsen, são todos estilos *ale*, demonstrando a preferência por cervejas de alta fermentação e reafirmando o disposto na Figura 27.

Na Tabela 23 relacionam-se todas as notas dos atributos sensoriais avaliados e intenção de compra das cervejas produzidas.

Tabela 23 - Notas dos atributos sensoriais e intenção de compra da análise sensorial das diferentes cervejas.

	Puro Malte	**90/10 permeado não hidrolisado**	**55/45 permeado não hidrolisado**	**90/10 permeado hidrolisado**	**55/45 permeado hidrolisado**
Impressão global	5,70 b	7,04 a	5,81 b	6,90 a	5,31 b
Cor	6,52 b	7,31 a	6,90 ab	7,00 ab	6,88 ab
Aroma	6,04 ab	6,82 a	5,54 b	6,67 a	5,28 b
Sabor	5,12 b	6,51 a	5,04 b	6,60 a	4,69 b
Aparência	6,76 ab	7,37 a	6,79 ab	7,12 ab	6,67 b
Intensão de compra	3,01 b	3,82 a	2,73 b	3,61 a	2,64 b

*As médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

As maiores notas obtidas para o atributo impressão global foram 7,04 e 6,90, respectivamente para a cerveja 90/10 com permeado não hidrolisado e para a cerveja 90/10 com permeado hidrolisado, sendo ambas estatisticamente iguais ($p<0,05$). As notas obtidas neste atributo correspondem a “gostei moderadamente”. As notas obtidas por Hendges (2014) quando utilizou as proporções de 90/10 e de 55/45 de malte/quinoa, foram 6,42 e 6,23, respectivamente, ambas correspondendo a “gostei ligeiramente”.

Santos (2011) avaliando o chope de arroz preto na proporção 55/45 malte/arroz preto obteve 6,29 para o atributo impressão global. Martinez (2014) obteve a nota 7,10 no atributo impressão global para sua cerveja 55/45 de malte/xarope de milho.

Para os atributos cor e aroma observa-se que as melhores notas foram para as proporções 90/10. Para o atributo sabor e aparência as notas obtidas para as cervejas 90/10 ficaram compreendidas em “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”, sendo também a proporção que recebeu as melhores notas.

Quanto à intensão de compra observa-se que para as cervejas 90/10 não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre o emprego de permeado hidrolisado ou não hidrolisado. Obteve-se 3,82 para a cerveja 90/10 com permeado não hidrolisado e 3,61 para a mesma proporção com permeado hidrolisado, e as notas ficaram compreendidas entre “eu provavelmente compraria este produto” e “eu tenho dúvidas se compraria ou não este produto”.

Hendges (2014) obteve a nota de 3,28 para a cerveja produzida com a proporção 90/10 malte/quinoa, e Martínez (2014) obteve 3,81 para sua cerveja produzida com a proporção 55/45 com malte/xarope de milho.

Neste trabalho as menores notas dos atributos sensoriais e intenção de compra foram para as cervejas 55/45, demonstrando que quanto maior a porcentagem de adjunto empregado, mais características do mesmo se sobressairão na bebida. Foi relatado por alguns provadores, que as cervejas 55/45, apresentam um leve aroma azedo, sendo este aroma característico do permeado concentrado de leite.

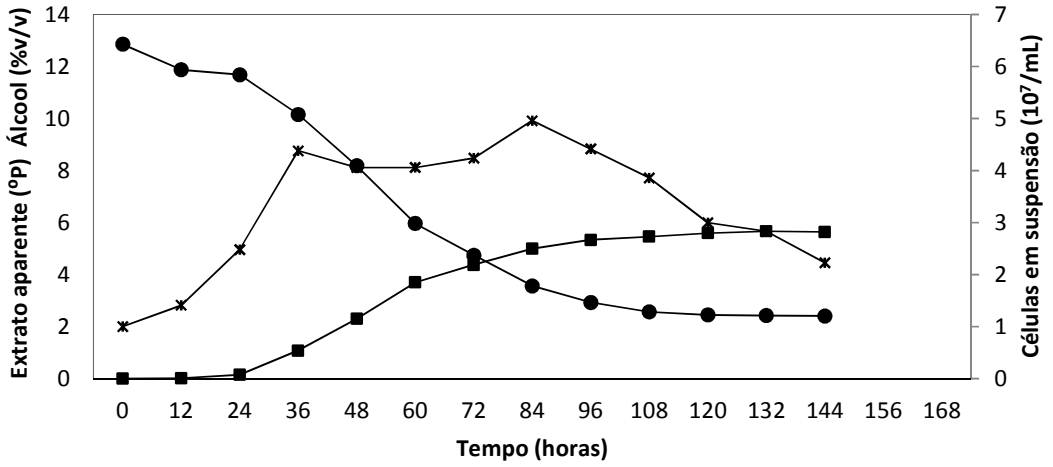
Para a cerveja puro malte também se obteve notas inferiores para todos os atributos avaliados, sendo em sua maioria estatisticamente iguais ($p<0,05$) as notas das cervejas 55/45. Hendges (2014), Martínez (2014) e Brunelli (2012) obtiveram notas mais altas para todos os atributos avaliados em cervejas puro malte. Pode-se sugerir que as notas baixas estejam relacionadas ao surgimento de sabores/aromas indesejáveis na cerveja, devido à concentração do inóculo com quantidade de células inferior ou um possível problema na oxigenação do mosto.

5.6 Produção em escala piloto

Considerando que as cervejas 90/10 foram avaliadas pela impressão global, o sabor e a intensão de compra, e que os resultados obtidos foram estatisticamente iguais ($p<0,05$) tanto para o emprego do permeado hidrolisado quanto do não hidrolisado, definiu-se para a produção em escala piloto a cerveja com proporção 90/10 malte/permeado não hidrolisado, devido ao menor custo e tempo de produção da cerveja, por não ser necessária a etapa de hidrólise enzimática.

O perfil de fermentação do mosto 90/10 com permeado não hidrolisado, em escala piloto, pode ser visto na Figura 28.

Figura 28 - Perfil de fermentação do mosto 90/10 com permeado não hidrolisado, produzido em escala piloto. (●) Extrato aparente (ºP); (■) Álcool (%v/v); (⁎) Células em suspensão (10^7/mL).



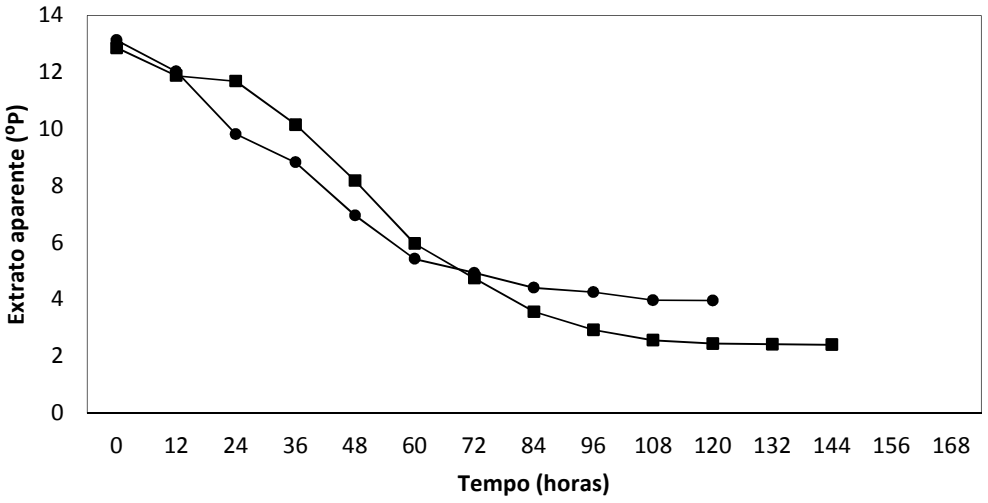
Fonte: Próprio autor.

A produção de etanol foi de 5,64% (v/v), superior ao relatado por Santos (2011) e Muniz et al. (2014) em escala piloto. Mesmo com o declínio no consumo de extrato a partir das 120h observou-se que as células em suspensão alcançaram a concentração celular de 2,23 x 10^7/mL, concentração menor que a relatada por Hendges (2014) ao fim da fermentação em escala piloto de uma cerveja com quinoa.

Na Figura 29 observa-se uma comparação no consumo de extrato aparente dos mostos 90/10 com permeado não hidrolisado. Tanto para a produção em escala piloto quanto para a produção em escala de bancada, o consumo de extrato foi semelhante, sendo que para ambas as condições com 60h de fermentação mais da metade do extrato havia sido consumido. Na escala piloto o consumo de extrato foi ligeiramente maior demandando um maior tempo de fermentação (144h) comparado à escala de bancada (120h). Os valores finais de extrato foram 2,41ºP para a escala piloto e 3,96ºP para a escala de bancada.

Hendges (2014) produzindo um mosto com 45% de quinoa malteada como adjunto, em escala piloto, relatou um tempo de fermentação de 204h, muito superior ao encontrado no presente trabalho.

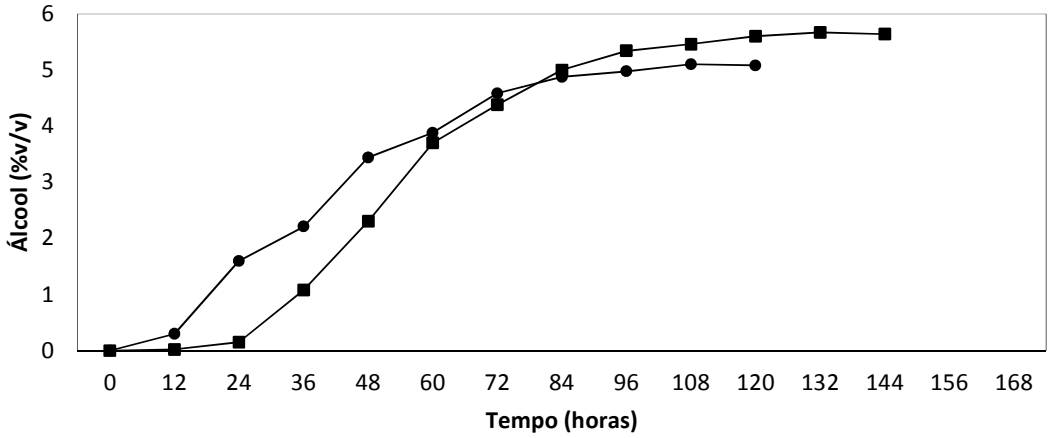
Figura 29 - Comparação no consumo de extrato aparente dos mostos 90/10 com permeado não hidrolisado, em escala de bancada (10L) (●) e escala piloto (120L) (■).



Fonte: Próprio autor.

A Figura 30 apresenta a comparação entre a produção de etanol na escala piloto e de bancada para a cerveja de proporção 90/10.

Figura 30 - Comparação na produção de etanol dos mostos 90/10 com permeado não hidrolisado, em escala de bancada (10L) (●) e escala piloto (120L) (■).

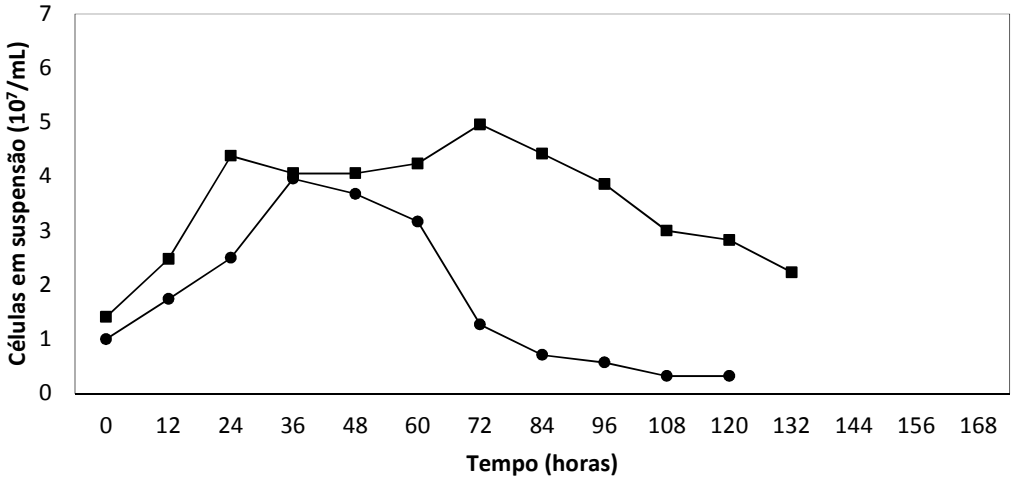


Fonte: Próprio autor.

Como já relatado, a produção de etanol alcançou 5,64% (v/v) para a escala piloto e 5,08% (v/v), obtido na escala de bancada. Como na escala piloto o processo de mostura foi conduzido numa tina dotada de agitação, e por ser possível um controle mais preciso de temperatura, através de sensores, atribui-se a estas duas variáveis uma melhor conversão do malte em açúcares fermentáveis, podendo explicar o valor ligeiramente maior no consumo de extrato e produção de etanol para a escala piloto.

O perfil de células em suspensão, para as cervejas de proporção 90/10 com permeado não hidrolisado, pode ser visto na Figura 31. Na escala de bancada o declínio das células em suspensão começou por volta das 72h de fermentação, e na fermentação em escala piloto a concentração de células manteve-se superior ao longo de toda a fermentação. A concentração máxima de células em suspensão foi de 3,96 x 10^7 cel/mL para a escala de bancada e 4,96 x 10^7 cel/mL para a escala piloto.

Figura 31 - Comparação do perfil de células em suspensão dos mostos 90/10 com permeado não hidrolisado, em escala de bancada (10L) (●) e escala piloto (120L) (■).



Fonte: Próprio autor.

5.7 Produtividade em etanol

Na Tabela 24 encontram-se a produtividade em etanol e o tempo de fermentação das cervejas produzidas com diferentes proporções de malte/permeado concentrado de leite, tanto em escala de bancada quanto em escala piloto.

Tabela 24 – Produtividade e tempo de fermentação das cervejas produzidas com diferentes proporções de malte/permeado.

Cerveja	Malte/Permeado	Q_p (g/L.h)	Tempo (h)
Puro malte	100/0	0,22	156
Permeado não hidrolisado	55/45	0,23	120
	90/10	0,33	120
Permeado hidrolisado	55/45	0,23	168
	90/10	0,24	168
Escala piloto (Permeado não hidrolisado)	90/10	0,31	144

Avaliando a Tabela 24 verifica-se que as produtividades ficaram entre 0,22 e 0,33 g/L.h as cervejas produzidas com cinco mostos distintos em escala de bancada e para a cerveja produzida em escala piloto.

Obteve-se 0,22 g/L.h de Qp para a cerveja puro malte, menor valor verificado neste trabalho.

Para a cerveja 90/10 com permeado não hidrolisado, na escala de bancada, verificou-se o maior Qp, de 0,33 g/L.h. Para a escala piloto o valor foi de 0,31 g/L.h, levemente inferior. Estes valores foram semelhantes ao encontrado por Santos (2001), que em escala piloto produzindo cerveja com 45% de arroz preto obteve um Qp de 0,32 g/L.h.

Carvalho (2009), produzindo cervejas com banana como adjunto, observou que os mostos com extrato original de 12 e 15ºP alcançaram um Qp de 0,68 g/L.h em 72h de fermentação.

Muniz et al. (2014) obtiveram seu valor máximo de produtividade volumétrica em etanol, de 1,07 g/L.h, em 12 horas de fermentação a 15ºC, com redução do valor de Qp após este tempo.

Aizemberg (2015) obteve o maior valor de Qp, de 0,86 g/L.h, na produção de cervejas nas proporções 75/25 e 50/50 malte/caldo de cana parcialmente clarificado.

6. CONCLUSÕES

No desenvolvimento do processo para produção de uma cerveja de alta fermentação (*ale*) utilizando o permeado concentrado de leite como adjunto, pôde-se concluir que este adjunto possui três vezes mais lactose que o soro de queijo comum, além de elevado teor de cinzas, de água e ausência de gordura.

A pasteurização mostrou-se o tratamento ideal reduzir a carga microbiana e preservar o pH e a acidez titulável do permeado concentrado de leite, possibilitando seu armazenamento a 5ºC, por até 31 dias.

A melhor condição de hidrólise enzimática da lactose presente no permeado, combinando menor concentração de enzima e menor tempo, foi obtida empregando 2,0 mL/L de β-galactosidase em 90 minutos, alcançando 92,5% de hidrólise.

As cervejas 55/45 e 90/10 com permeado hidrolisado e não hidrolisado apresentaram perfis semelhantes de fermentação. E a atenuação real de fermentação dos mostos aumentou com o emprego do permeado hidrolisado.

As cervejas 90/10 contendo permeado hidrolisado ou não hidrolisado foram as mais aceitas sensorialmente nos atributos “impressão global” e “sabor”, bem como na “intenção de compra” dos provadores, sendo ambas estatisticamente iguais ($p<0,05$).

O emprego de permeado hidrolisado na proporção 90/10 não alterou a aceitação da bebida em relação à mesma versão, mas sem hidrólise. Assim, na produção, em escala piloto, da cerveja com esta proporção de permeado, foi possível reduzir custo e tempo de produção, por não ser necessária a etapa de hidrólise enzimática.

Conclui-se que o permeado concentrado de leite pode ser utilizado como adjunto na fabricação de cervejas tipo *ale* em baixas concentrações produzindo uma bebida com boa aceitação sensorial.

Sugestões para trabalhos futuros

- Acompanhar, nos mostos contendo permeado hidrolisado ou não, o perfil de consumo dos açúcares ao longo de toda a fermentação e quantificá-los;

- Produzir cervejas, com permeado hidrolisado ou não, empregando diferentes leveduras *lager* e *ale*, buscando diferenças no perfil de consumo de açúcares pelas mesmas;

- Quantificar os teores de açúcares residuais presentes das cervejas;

- Investigar a presença de galactoligossacarídeos nas cervejas com permeado hidrolisado dado os estudos que associam seu consumo a efeitos benéficos à saúde;

- Produzir cervejas com permeado utilizando maltes especiais, como maltes torrados, buscando melhor aceitação das bebidas com maior proporção deste adjunto;

- Investigar o efeito dos α-ácidos do lúpulo sobre a atividade da β-Galactosidase.

REFERÊNCIAS

ACTON, G.H. The determination of lactose in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 32, n. 2, p. 111, 1977.

AIZEMBERG, R. Preliminary assessment of water quality to be used in the brewing process. In: BRAZILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOOD AND BEVERAGES, 2012, Araraquara-SP. **Anais…** Araraquara: UNESP, 2012. p. 70.

ALMEIDA e SILVA, J.B.; MEDEIROS, M.B.; BOLINI, H.M.A.; FERREIRA, F.B.; FURLAN, B.G.; GUSMÃO, F.P. **Avaliação sobre o potencial de alfa e de beta-ácido do lúpulo no controle biocida do processo fermentativo e sua influência no número de reciclagem na produção de cachaça.** Lorena, março de 2014. Relatório final do projeto de mesmo título, Processo FAPESP 2010/19912-1.

ALMEIDA e SILVA, JB. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, G. W. **Tecnologia de Bebidas**, São Paulo: Edgar Blücher, 2005. cap. 15, p.347-380.

AQUILANI, B.; LAURETI, T.; POPONI, S.; SECONDIET, L. Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. **Food Quality and Preference**, v. 41, p. 214–224, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT**. Análise sensorial dos alimentos e bebidas: terminologia.** 1993. 8 p.

BARTH-HAAS GROUP. **Beer production:** Market leadersand their challengers in the Top 40 Countries in 2012. Nuremberg: Joh. Barth & Sohn GmbH, 2013. Disponível em: <http://www.barthhaasgroup.com/johbarth/images/pdfs/report2013/Barth_Beilage_2013.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2014.

BARTH-HAAS GROUP. **The Barth report**: Hops 2014/2015. Nuremberg: Joh. Barth & Sohn GmbH, July 2015. Disponível em: <http://www.barthhaasgroup.com/images/pdfs/reports/2015/BarthReport_2014-2015_EN.pdf>. Acesso em: 08 nov. 2015.

BEUCLER. J.; DRAKE, M.; FOEGEDING, A. Design of a beverage from whey permeate. **Journal of Food Science**. v. 70, n. 4, p. 277-285, 2005.

BJCP - Beer Judge Certification Program. **Beer Style Guidelines**. Edição 2015. Minessota: Gordon Strong e Kristen England, 2015. 2015 Style Guidelines.

BRANDAM, C.; MEYER, X.M.; PROTH, J.; STREHAIANO, P.; PINGAUD, H. An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 1, p. 43-52, Jan 2003.

BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial**. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa nº 54, de 5 de novembro de 2001. Regulamento Técnico Mercosul de produtos de cervejaria. **Diário Oficial**. Brasília, 07 nov. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 68 de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. V – Métodos Quantitativos. **Diário Oficial**. Brasília, DF, 2006.

BRAVI, E.; PERRETTI, G.; BUZZINI, P.; DELLA SERA, R. FANTOZZI, P. Technological steps and yeast biomass as factors affecting the lipid content of beer during the brewing process. **J. Agric. Food Chem**. 2009, 57, p. 6279–6284.

BRIGGS, D.E.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P.A.; STEVENS, R. Metabolism of wort by yeast. In: _____. **Brewing science and pratice**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited e CRC Press, 2004. cap 12, p. 403-471.

BRUNELLI, L.T. **Produção de cerveja com mel:** características físicoquímicas, energética e sensorial. 2012. 90 p. Dissertação (Mestre em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, 2012.

BURRINGTON, KJ. **Applications monograph:** Permeate. Permeate for Sodium Reduction. 2011. 4p. Disponível em: <http://www.innovatewithdairy.com/SiteCollectionDocuments/Permeate%20Brochure.pdf > Acesso em: 23 set. 2014.

CARMINATTI, C.A. **Ensaios de hidrólise enzimática da lactose em Reator a Membrana utilizando β-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 66p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CARRARA, C.R.; RUBIOLO, A.C. Imobilization on b-galactosidase on chitosan. **Biotchnol. Prog.**, Santa Fé (Argentina), v. 10, p. 220-224. 1994.

CARVALHO, A.F.; PERRONE, I.T.; CORREIA, L.F.M. Cadeia de Produtos: Tendências e Perspectivas. **Revista Laticínios**, São Paulo, ed. 99, p. 29, 2013. Disponível em: <https://revistalaticinios.com.br/wp-content/uploads/2013/01/16-33-Materia-de-Capa-99.pdf> Acesso em: 16 out. 2013.

CARVALHO, G.B.M. **Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante**. 2009. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

CARVALHO, G.B.M; BENTO, C.V.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Elementos Biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º parte – As leveduras. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 25, p. 36-42, Out/Nov, 2006.

CARVALHO, G.B.M; ROSSI, A.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Elementos Biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2º parte – A fermentação. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 26, p. 46-54, Jan, 2007.

CARVALHO, G.G.; MONTEIRO, R.A.B. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para produção de etanol. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 8, p. 47-54, 2011.

CASTRO, G.C.; DELGADO, C.B.; VALENTE, L.L.G.; DORNELAS, F.S. Perfil dos consumidores de bebida alcoólica de 18 a 30 anos e o impacto da lei seca no comportamento dos moradores do Rio de Janeiro de Classe A e B. **Cadernos do IME** – Série Estatística, v. 30, p. 19 - 33, 2011.

CERVEJARIA COLORADO. Cerveja Appia. 2014. Disponível em: < http://www.cervejariacolorado.com.br/cervejas/appia.php>. Acesso em: 24 nov. 2015.

Cervejarias AB InBev e SABMiller anunciam 3ª maior fusão da história. **Folha de São Paulo**, São Paulo. 2015. Disponível em: < http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2015/10/1693298-ab-inbev-e-sabmiller-anunciam-a-terceira-maior-fusao-da-historia.shtml>. Acesso em: 27 nov. 2015.

COSTA, R.C. **Obtenção de lactose a partir de permeado de soro de queijo e permeado de leite.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1995.

COURI, S.; PARK, Y.; PASTORE, G.; DOMINGOS, A. Enzimas na produção de alimentos e bebidas. In: **ENZIMAS em biotecnologia:** produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 7 p. 153-178.

DANIELS, R. Using hops and hop bitterness. In: _____ **Designing great beers:** The ultimate guide to brewing classic beer styles. Boulder: Brewers Publications, 2000. p. 72-90.

DANÚBIO. Queijo Frescal Ultrafiltrado. Disponível em: < http://www.danubio.com.br/queijo-frescal-ultrafiltrado/produtos/produto-queijo-frescal-ultrafiltrado-light-250g> Acesso em: 25 abr. 2014.

DRAGONE, G.; MUSSATO, S.I.; VILANOVA, M.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Obtenção e caracterização de bebida destilada a partir da fermentação do soro de queijo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, p. 120-124, Jun. 2009. Edição do VII BMCFB.

EATON, B. An Overview of brewing. In: PRIEST, F.G; STEWART, G.G. **Handbook of brewing.** 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. Cap. 3, p. 77-89.

FONTES, E. A. F.; ALVES, Y. P. C.; FONTES, P. R.; MINIM, V, P. Bebida eletrolítica a base de permeado da ultrafiltração de leite: avaliação física, química e microbiológica durante o armazenamento. **Ciência Rural**. v. 45, n.2, p. 342-348, 2015.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 62, p. 334–361, 1988.

GIROTO, J.M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, v.10, p. 43-46, Set./Out. 2001.

GOLDINER, F; KLEMANN, H. **Tafel zur Berechnung der spezifischen Gewichte von Zuckerlösungen auf Zucker Prozente, und von Alkohol-Wassermischungen auf Gewichtsprozente Alkohol**. Berlim: Institut für Gärungsgewerbe, Berlim, n.65. 1951.

GONZÁLEZ SISO, M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**. Grã Bretanha, v. 57, p. 1-11, mar. 1996.

GRAHAM, J. **Characteristic flavors from yeast:** and their relationship to world beer styles. 2015. 6p. Disponível em: <http://www.jstrack.org/brewing/yeast-jdg-bjcp.pdf>. Acesso em: 17 nov 2015.

HENDGES, D.H. **Produção de cervejas com teor reduzido de etanol, contendo quinoa malteada como adjunto**. 2014. 95p. Tese (Doutorado em Ciências). – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W; ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial.** São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v.2, p. 93-121.

HORWITZ, W. **Official Methods of Analysis of AOAC International.** 17th Ed. 2000, Vol 2. Food Composition, Additives, Natural Contaminants, Cap. 33, p. 10; 54; 61; 71.

INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FARIA, A. Revisão: as bactérias do ácido láctico do vinho – Parte I. **Ciência Téc. Vitiv.** v. 23, n. 2, p. 81-96, 2008.

INSTITUTO ADOLF LUTZ a. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. Brasília: MS, 2005. p. 104-105.

INSTITUTO ADOLF LUTZ b. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. Brasília: MS, 2005. p. 831-832.

INTERNACIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of the protein content of processed cheese products**. Bruxelas: FIL/IDF, 1964.

INTERNACIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of total solids content of cheese e processed cheese products.** Bruxelas: FIL/IDF, 1982. 2p.

JELIČIĆ, I.; BOTANIC, R.; TRATNIK, L. Whey based beverages: new generation of dairy products. **Mljekarstvo**, v. 58, n. 3, p. 257-274, Jul-Sep 2008. Disponível em: <http://www.academia.edu/1087053/Whey_based_beverages-new_generation_of_dairy_products> Acesso em: 01 mar. 2014.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A new model proposed for hydrolysis of lactose by β-galactosidase from Kluyveromyces fragilis**. Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n.3, p. 300-309, 2002.

KROTTENTHALER, M; BACK, W.; ZARNKOW, M. Wort production. In: EßLINGER, H.M. **Handbook of brewing**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. cap. 7, p. 165-202.

LADERO, M.; PEREZ, M. T.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Hydrolysis of lactose by free and immobilized β-galactosidase from Thermus sp. Strain T2. **Biotechnology and Bioengineering**, Washington, v. 81, n. 2, p. 241-252, 2002.

LÓPEZ-LEIVA, M.H; GUZMÁN, M. Formation of Oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**. v. 30, n. 8, p. 757-762, 1995.

MARTINEZ, O. C. **Obtenção de cerveja super concentrada com a utilização de xarope de milho como adjunto de malte.** 2014. 144 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena da USP, Lorena, 2014.

MATIOLI, G.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Hydrolysis of lactose by β-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 23, n. 3, p. 655-659, 2001.

MIZUBUTI, I.Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ci. Agr**., Londrina, v.15, n.1, p-80-94, março 1994.

MORADO, R. **Larousse da Cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009. 357p.

MUNIZ, L.D.; MELO, V.F.; BISPO, J.A.C.; BIANCHI, V.L.D.; CARVALHO, G.B.M. Suco de cajá (*Spondias mombin* l.) como adjunto na produção de cerveja:

análises fisíco-químicas, sensorial e estudo cinético. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014. Florianópolis: **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, 2015, v. 1. p. 4964-4971.

OLIVEIRA, C. **Mais de mil tipos de cervejas estão registradas no Brasil.** Notícia Aberta do Ministério da Agricultura. Brasília, 10 dez. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2013/12/mais-de-mil-tipos-de-cervejas-estao-registradas-no-brasil> Acesso em: 19 dez. 2013.

PALMERa, G.H. Barley and Malt. In: PRIEST, F.G; STEWART, G.G. **Handbook of Brewing.** 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. Cap. 5, p. 139-159

PALMERb, J.J. **How to brew**. Everything you need to know to brew beer right the first time. Boulder: Brewers Association, NATL BOOK NETWORK. 2006. 321p.

PARRONDO, J.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. Production of an alcoholic beverage by fermentation of whey permeate with *Kluyveromyces fragilis* I: Primary metabolism. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 106, n. 6, p. 367-375, 2000.

PHILLISKIRK, G. Quality. In: PRIEST, F.G; STEWART, G.G. **Handbook of Brewing.** 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. Cap. 20, p. 730-770.

Pilsen, *Ale*, Stout, Bock, *Lager*: qual é a diferença? **Curiosidades,** 2012. Disponível em: <http://heinekenbrasil.com.br/?Curiosidades-pilsen-ale-stout-bock-lager-qual-e-a-diferenca#sthash.vLuFSI3J.dpuf>. Acesso em: 14 nov 2015.

REINOLD, M.R. **Tipos de malte**. 2015. Disponível em: <http://www.cervesia.com.br/malte/25-tipos-de-malte.html>. Acesso em: 27 jul. 2015.

REIS, V. **Ministério retoma discussões sobre os padrões de cervejas.** Notícia Aberta do Ministério da Agricultura. Brasília, 10 jul. 2013. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2013/07/ministerio-retoma-discussoes-sobre-os-padroes-de-cervejas> Acesso em: 19 dez. 2013.

ROBERTS, T.R.; WILSON, R.J.H. Hops. In: PRIEST, F.G; STEWART, G.G. **Handbook of Brewing.** 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. Cap 7, p. 181-278.

ROSA, S.S.; COSENZA, J.P.; LEÃO, L.T.S. Panorama do setor de bebidas no Brasil. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 23, p. 101-150, mar. 2006. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2304.pdf.> Acesso em: 25 abr. 2014.

RUSSEL, I. Yeast. In: PRIEST, F.G; STEWART, G.G. **Handbook of Brewing.** 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. Cap 8, p. 282-324.

RUSTOM, I. Y. S.; FODA, M.I.; LÓPEZ-LEIVA, M.H. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors. **Food Chemistry**. v. 62, n. 2, p. 141- 147, 1998.

SANTIAGO, P.A.; MARQUEZ, L.D.S.; CARDOSO, L.M.; RIBEIRO, E.J. Produção de β-galactosidase por fermentação de soro de queijo com Kluyveromyces marxianus. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 24, p. 567-572, out./dez. 2004.

SANTOS, C.D.O. **Avaliação do emprego de arroz preto (*Oryza sativa* L.) submetido à hidrólise enzimática como adjunto na fabricação de cerveja.** 2011. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L. F. L. **Composição e propriedades físico-químicas do leite**: módulo 1. Piracicaba: Agripoint, 2007. Curso online: Monitoramento da qualidade do leite - Agripoint, 2007. Disponível em: < http://www.milkpoint.com.br/busca.aspx?p=marcos+veiga+dos+santos&ordem=31 >. Acesso: em: 29 set. 2014.

SAORIN, C. **Mercado brasileiro de cerveja**. 2010. Disponível em: <http://www.beerlife.com.br/portal/default.asp?id_texto=28>. Acesso em: 14 nov 2015.

SILVA, P.H.A.; FARIA, F.C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.28 n.4, p. 902-906, out./dez. 2008.

STEWART, G.G. Adjuncts. In: PRIEST, F.G; STEWART, G.G. **Handbook of Brewing.** 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. Cap 6, p. 161-175.

STOLIAR M. U.S**. Whey ingredients in bakery products**. 2009. 8 p. Monografia publicada por U.S. Dairy Export Council: Arlington, U.S.A. Disponível em: <http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008Monographs/Bakery%20Monograph%202008.pdf> Acesso em: 19 dez. 2013.

SUÁREZ, E.; LOBOA, A.; ÁLVAREZ, S.; RIERAA,F.A.; ÁLVAREZ, R. Partial demineralization of whey and milk ultrafiltration permeate by nanofiltration at pilot-plant scale. **Desalination**, v. 198, p. 274–281, 2006.

TALABARDON, M.; SCHWITZGUE´BEL, J.P.; PE´RINGER, P. Anaerobic thermophilic fermentation for acetic acid production from milk permeate. **Journal of Biotechnology**. v. 76, p. 83–92, 2000.

TAYLOR, D.G. Water. In: PRIEST, F.G; STEWART, G.G. **Handbook of brewing.** 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. Cap 4, p. 93-135.

TEIXEIRA, L.V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**. Jan/Fev, n 366, v. 64, p.12-21, 2009.

TREMARIN, A. **Condições operacionais na hidrolise enzimática da lactose em reator a membrana.** 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

TSCHOPE, E.C. **Microcervejarias e cervejarias.** A História, a Arte e a Tecnologia. São Paulo: Editora Aden, 2001. 223p.

USDEC - U.S. Dairy Export Council. **Reference Manual for U.S. Whey and Lactose Products.** 2004. 226p. Disponível em: <http://www.usdec.org/Library/ProductDetail.cfm?ItemNumber=83042&SNItemNumber=82591&TNItemNumber=82609.> Acesso em: 23 set. 2014.

VENTURINI FILHO, W.G.; CEREDA, M.P. Cerveja. In: ALMEIDA LIMA, U.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial.** São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 4, p. 91-144.

WALKER, G.M. Yeast nutrition. In: _____. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley, 1998, cap 3, p. 51-92.

WENDORF, W. **Uses of whey in the farmstead setting.** 2008. 21p. Disponível em: < http://future.aae.wisc.edu/pubs/index_search.html > Acesso em: 01 mar. 2014.

WHITAKER, J.R. The glycoside hydrolases. In: _____. **Principles of enzymology for food sciences.** Nova Iorque: Marcel Dekker, 1994. cap. 15, p. 419-423.

YOO, B. W.; MATTICK, J. F. Utilization of acid and sweet cheese whey in wine production. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 6, p. 900, 1969.

ZACARCHENCO, P.B. et al. Permeado de soro: Aplicações que agregam valor aos coprodutos do leite. **Anuário Leite e Derivados**. Campinas, v. 21. n.131, p. 48-55. Jan./Fev. 2012. Disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/arquivos/artigos/permeado_de_soro.pdf> Acesso em: 19 dez. 2013.

ZACARCHENCO, P.B.; PITHAN-SILVA, R.; BUENO, C.R.F.; AMARAL, A.M.P. Tecnologias para industrialização do soro de leite. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 12., 2013, Porto Velho. **Anais eletrônicos...** Porto Velho: ULBRA.

APÊNDICE A

Cálculos para produção dos mostos

Os cálculos de malte, adjunto, água e lúpulo foram feitos de acordo com Daniels (2000).

- Cálculo de malte, adjunto e água primária

Tanto para o mosto puro malte quanto para os mostos 55/45 e 90/10, considerou-se para água primária a proporção 1:3 kg de malte:kg de água e assumiu-se uma eficiência do processo de 75% para escala de bancada.

A quantidade de extrato necessária para obter um mosto com 12ºP foi calculada seguinte forma:

$$\text{Ext} = \frac{\text{Vm x Cm}}{\text{Ef}p} \qquad (A1)$$

Onde:

Ext = Quantidade de extrato necessário (kg)

Vm = volume de mosto a ser produzido (hL)

Cm = concentração de açúcares desejada para o mosto em kg/hL, transformando a concentração em ºP (m/m) em m/v com auxílio da tabela de Goldiner et al. (1951).

Ef_p = eficiência do processo

Para o cálculo da quantidade de malte no mosto puro malte e malte e permeado nos mostos 55/45 e 90/10, levou-se em consideração suas porcentagens da formulação. Para o malte pilsen considerou-se 75% de rendimento informado na ficha técnica.

Os cálculos foram feitos da seguinte forma:

$$\text{Malte (kg)} = \frac{\text{Ext x \% malte}}{\text{Rm}} \qquad (A2)$$

Onde:

Ext = Quantidade de extrato necessário (kg), calculado anteriormente

% malte = porcentagem de malte na formulação

Rm = rendimento do malte (%)

$$\text{Permeado (L)} = \frac{\text{Ext x \% permeado}}{\text{Cp}} \qquad (A3)$$

Onde:

Ext = Quantidade de extrato necessário (kg), calculado anteriormente na equação (A1)

% permeado = porcentagem de permeado na formulação

Cp = concentração de sólidos solúveis do permeado em kg/hL, transformando a concentração em ºBrix (g/100g) em m/v com auxílio da tabela de Goldiner et al. (1951).

Para a produção de 8L do mosto puro malte foram utilizados 1,78kg de malte e 5,35L de água primária.

Para a produção de 8L dos mostos 55/45 empregando o permeado concentrado não hidrolisado foram utilizados 0,98kg de malte, 2,86L de permeado não hidrolisado e 2,94L de água primária.

Para a produção de 8L dos mostos 90/10 empregando o permeado concentrado não hidrolisado foram utilizados 1,60kg de malte, 0,636L de permeado não hidrolisado e 4,81L de água primária.

Como o lote de permeado concentrado utilizado para hidrólise enzimática foi diferente, a concentração de sólidos solúveis estava levemente diferente e por isso os valores de permeado foram ajustados.

Sendo assim, para a produção de 8L dos mostos 55/45 empregando o permeado concentrado hidrolisado foram utilizados 0,98kg de malte, 2,81L de permeado não hidrolisado e 2,94L de água primária. E para a produção de 8L dos mostos 90/10 empregando o permeado concentrado não hidrolisado foram utilizados 1,60kg de malte, 0,625L de permeado não hidrolisado e 4,81L de água primária.

A quantidade de água secundária utilizada na lavagem dos mostos foi variável sendo estabelecido lavar até que o mosto saísse com 4-5ºBrix.

- Cálculo de lúpulo

Estabeleceu-se produzir cervejas com 20 IBUs. O cálculo estimado de IBU foi feito de acordo com DANIELS (2000) e considera a taxa de utilização do lúpulo em função do tempo de fervura, o volume e concentração do mosto.

A quantidade de lúpulo utilizado foi a mesma em todos os mostos, pois a concentração do mosto (12ºP), o volume (8,0L) e os tempos de adição do lúpulo foram os mesmos.

Sabendo que 1 IBU é igual a 1mg de iso-α-ácido por litro de cerveja, temos que para 20 IBU em 8,0L serão necessários 160mg de iso-α-ácido. A porcentagem de isomerização dos α-ácidos do lúpulo varia com o tempo em que o lúpulo encontra-se em fervura, como disposto na Tabela 23 (DANIELS, 2000). Optou-se por fazer a adição de 70% do total de lúpulo para ferver por 60 minutos, 20% do total para ferver por 15 minutos e 10% do total para ferver por 5 minutos. No início da fervura foram adicionados 2,69g de zeus, faltando 15 minutos para o término da fervura mais 1,53g de zeus e nos 5 minutos finais de fervura 1,92g de zeus.

Tabela A1 - Valores de isomerização do lúpulo de acordo com o tempo de fervura.

Tempo de fervura (minutos)	**% de isomerização do lúpulo em pellet**
Lúpulo seco	0
0 a 9	6
10 a 19	15
20 a 29	19
30 a 44	24
45 a 59	27
60 a 74	30
75 ou mais	34

Fonte: (DANIELS, 2000).

APÊNDICE B

Figura B1 - Questionário da Análise Sensorial

QUESTIONÁRIO

Nome: _____ Idade:_____ Sexo: _____

( ) Professor ( ) Funcionário ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação

1) Você é um consumidor de cerveja?
( ) Sim ( ) Não

2) Com qual frequência você consome cerveja?
( ) Ocasionalmente ( ) 1 vez por mês ( ) 1 vez por semana
( ) 2 ou mais vezes por mês ( ) 2 ou mais vezes por semana

3) Qual sua cerveja ou estilo preferido? _____

4) Você sabe o que é uma cerveja de alta fermentação (ale)?
( ) Sim ( ) Não

5) Você gosta de cervejas de alta fermentação (exemplo de alguns estilos: trigo, *pale ale, india pale ale, blond ale, saison, tripel, stout, porter*...)?
( ) Sim ( ) Não

Figura B2 – Ficha de avaliação da Análise Sensorial

FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL

Você está recebendo 5 (cinco) amostras de cerveja. Por favor, avalie as amostras codificadas da esquerda para a direita e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou da mesma.

Escala:
9 – gostei extremamente
8 – gostei muito
7 – gostei moderadamente
6 – gostei ligeiramente
5 – nem gostei / nem desgostei
4 – desgostei ligeiramente
3 – desgostei moderadamente
2 – desgostei muito
1 – desgostei extremamente

Código da amostra					
Impressão Global	_____	_____	_____	_____	_____
Cor	_____	_____	_____	_____	_____
Aroma	_____	_____	_____	_____	_____
Sabor	_____	_____	_____	_____	_____
Aparência	_____	_____	_____	_____	_____

Agora, use a escala abaixo e avalie qual seria sua atitude quanto à <u>compra</u> dos produtos.

Escala:
5 – eu certamente compraria este produto
4 – eu provavelmente compraria este produto
3 – eu tenho dúvidas se compraria ou não este produto
2 – eu provavelmente não compraria este produto
1 – eu certamente não compraria este produto

Código da amostra					
Intensão de compra	_____	_____	_____	_____	_____

Comentários: _____
_____
_____