

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

YANET BOFFILL RODRÍGUEZ

**Emprego do malte de sorgo na produção de bebidas fermentadas sem
glúten com baixo teor alcoólico**

Lorena
2019

YANET BOFFILL RODRÍGUEZ

Emprego do malte de sorgo na produção de bebidas fermentadas sem glúten com baixo teor alcoólico

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada.

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

Versão Corrigida

Lorena

2019

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

Boffill Rodríguez, Yanet

Emprego do malte de sorgo na produção de bebidas fermentadas sem glúten com baixo teor alcoólico / Yanet Boffill Rodríguez; orientador João Batista de Almeida e Silva - Versão Corrigida. - Lorena, 2019. 147 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Enzimas. 2. Fermentação. 3. Maltagem. 4. Mosturação. 5. Parâmetros de qualidade. I. Título. II. Almeida e Silva, João Batista de , orient.

RESUMO

BOFFILL RODRÍGUEZ, Y. **Emprego do malte de sorgo na produção de bebidas fermentadas sem glúten com baixo teor alcoólico**. 2019. 147p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

O interesse pelo malte de sorgo para substituir os maltes de outros cereais que contêm glúten, na produção de cervejas, tem aumentado nos últimos tempos. Esse empenho é devido à necessidade de oferecer bebidas sem glúten às pessoas com doença celíaca. A doença celíaca é uma síndrome caracterizada por dano da mucosa do intestino delgado causada pelas prolaminas, e o tratamento chave é a eliminação do glúten da dieta. Uma das vantagens do cultivo do sorgo é que ele se adapta a forte estresse ambiental, como a seca. Por outro lado, as bebidas a partir deste cereal caracterizam-se por seu alto valor nutritivo. No entanto, na elaboração de bebidas fermentadas a partir do sorgo, as principais desvantagens são a alta temperatura de gelatinização do amido e o baixo teor de enzimas hidrolíticas desenvolvidas no processo de maltagem. Assim, o objetivo da presente pesquisa foi maximizar os parâmetros de qualidade na maltagem, na mosturação e na fermentação de mosto a base de sorgo, usando a Metodologia de Superfície de Resposta. Foram realizados experimentos prévios de um único fator para avaliar a influência, sobre as respostas, de fatores, tais como as temperaturas de imersão e de germinação na maltagem; o pH e a temperatura de atividade proteolítica, na mosturação, e o pH e o tempo de maturação, na fermentação. Também foram selecionados os níveis baixos, médios e altos dos fatores experimentais do delineamento composto central rotacional. As condições ótimas para a maltagem do sorgo para obter valores adequados de poder diastásico, extrato em água quente, nitrogênio amino livre e perdas da maltagem foram 0,17% de hidróxido de sódio, 39,81 h de imersão e 120,62 h de germinação. Na mosturação, para maximizar o extrato em água quente e o nitrogênio amino livre, temperaturas de 51,47 °C para a β -amilase e de 71,14 °C para a α -amilase são ótimas. Podem ser obtidos adequados valores de etanol, fator de conversão de substrato em produto, produtividade volumétrica, grau real de fermentação, cor, pH e nitrogênio amino livre com condições ótimas de tempo (153 h) e de temperatura (16,24 °C). A confiabilidade do método foi confirmada através da realização de experimentos sob condições ótimas. A análise sensorial das bebidas fermentadas, em escala de laboratório, revelou que valores de 120 h e 12 °C são ótimos para a sua aceitabilidade. Na análise sensorial, das bebidas em escala piloto, foi observado que o sabor e a intenção de compra da bebida fermentada de sorgo não apresentaram diferenças significativas com as da cerveja sem glúten, comercializada no mercado. Assim, o malte de sorgo é uma matéria prima promissora para a fabricação de bebidas fermentadas sem glúten destinadas aos doentes celíacos.

Palavras-chave: enzimas. fermentação. maltagem. mosturação. parâmetros de qualidade.

ABSTRACT

BOFFILL RODRÍGUEZ, Y. **Use of sorghum malt for the production of gluten free fermented beverages with low alcohol content** 2019. 147p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

In beer production, the interest in sorghum malting to the replacement gluten-free malts has increased in recent times. This effort is due to the need to offer of gluten-free beverage to people with celiac disease. Celiac disease is a syndrome characterized by damage of the intestinal mucosa caused by prolamines, and its keystone treatment is the elimination diet of gluten. One of the advantages of sorghum cultivation is that it adapts to strong environmental stress, such drought. On the other hand, beverages from this cereal are characterized by their high nutritional value. However, in brewing with sorghum malt, the main disadvantages are its high starch gelatinization temperature and low hydrolytic enzymes level developed in malting. Thus, the aim of this present research was to maximize sorghum quality parameters in malting, mashing and sorghum wort fermentation applying Response Surface Methodology. Previous single factor experiments, such as germination and steeping temperature in malting; pH and proteolytic activity temperature in mashing; and pH and maturation time in fermentation, were performed to evaluate the influence of factors on responses. The lower, middle and upper of the experimental factors of the central composite design were also selected. The optimum conditions for sorghum malting to obtain suitable values of diastatic power, hot water extract, free amino nitrogen and malting loss were 0,17% of sodium hydroxide, 39,81 h of steeping and 120,62 h of germination. In mashing, to maximize hot water extract and free amino nitrogen, temperatures of 51,47 °C for β -amylase and 71,14 °C for α -amylase are optimum. Under optimum conditions of time (153 h) and temperature (16,24 °C) suitable values of ethanol, converting factor of substrate in product, volumetric productivity, real degree of fermentation, color, pH, and free amino nitrogen can be obtained. The reliability of the method was confirmed by performing experiments under optimal conditions. Sensorial analysis of the beverage produced in laboratory scale shows that the optimum fermentation conditions for its acceptability are 120 h and 12 °C. In sensorial analysis of fermented beverage in pilot scale, not significant differences in flavor and purchase intent were observed in respect with commercialized gluten free beverage in market. Thus, sorghum malt is a promising raw material for gluten-free fermented beverage production.

Keywords: enzymes. fermentation. malting. mashing. quality parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cerveja Wienbier sem glúten comercializada no Brasil	19
Figura 2 - Seção longitudinal dos grãos de sorgo e cevada.....	20
Figura 3 - Sistema de classificação para a avaliação do endosperma de sorgo ..	28
Figura 4 - Fluxograma do processo de maltagem de sorgo	31
Figura 5 - Fluxograma da metodologia de otimização do processo de maltagem a e as etapas de mosturação e fermentação	56
Figura 6 - Efeito da temperatura de imersão sobre o poder diastático (°L) (a), extrato em água quente (b) e nitrogênio amino livre (c) do malte de sorgo do cultivar BRS511, usando 0,2% de NaOH, 24 h de imersão e 144 h de germinação a 30 °C. As barras verticais.....	63
Figura 7 - Efeito da temperatura de germinação sobre o poder diastático (°L) (a), extrato em água quente (b) e nitrogênio amino livre (c) do malte de sorgo, usando 0,2% de NaOH, 24 h de imersão a 30 °C e 144h de germinação. As barras verticais representam o desvio padrão.....	65
Figura 8 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito da concentração de NaOH sobre o poder diastático (a), extrato em água quente (b), nitrogênio amino livre (c) e perdas da maltagem (d) do malte de sorgo. As barras verticais representam o desvio padrão.....	67
Figura 9 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito do tempo de imersão sobre o poder diastático (a), extrato em água quente (b), nitrogênio amino livre (c) e perdas da maltagem (d) do malte de sorgo. As barras verticais representam o desvio padrão.....	69
Figura 10 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito do tempo de germinação sobre o poder diastático (a), extrato em água quente (b), nitrogênio amino livre (c) e perdas da maltagem (d) do malte de sorgo. As barras verticais representam o desvio padrão.....	71
Figura 11 - Superfície de resposta e curva de contorno para o poder diastático do malte de sorgo em função da concentração de NaOH e o tempo de germinação	76
Figura 12 - Superfície de resposta e curva de contorno para o extrato em água quente do malte de sorgo em função da concentração de NaOH e o tempo de germinação	77
Figura 13 - Superfície de resposta e curva de contorno para o nitrogênio amino livre do malte de sorgo em função da concentração de NaOH e o tempo de germinação	78
Figura 14 - Superfície de resposta e curva de contorno para as perdas do malte de sorgo em função da concentração de NaOH e o tempo de germinação.....	79
Figura 15 – Maltagem do sorgo nas condições ótimas	80
Figura 16 - Efeito do pH na mosturação sobre o extrato em água quente (a) e nitrogênio amino livre (b), fixando as temperaturas de proteases (45 °C), β-amilase (55 °C) e α-amilase (70 °C). As barras verticais representam o desvio padrão	83
Figura 17 - Efeito da temperatura de atividade proteolítica sobre o extrato em água quente (a) e nitrogênio amino livre (b), fixando o pH (5,5), as temperaturas de β-amilase (55 °C) e α-amilase (70 °C). As barras verticais representam o desvio padrão.....	84
Figura 18 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito da temperatura de atividade da β-amilase sobre extrato em água quente (a) e nitrogênio amino livre (b). As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).	86

Figura 19 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito da temperatura de atividade da α -amilase sobre extrato em água quente (a) e nitrogênio amino livre (b). As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).	87
Figura 20 - Superfície de resposta e curva de contorno para o extrato em água quente em função da temperatura alfa-amilase e o temperatura beta-amilase	90
Figura 21 - Superfície de resposta e curva de contorno para o nitrogênio amino livre em função da temperatura alfa-amilase e o temperatura beta-amilase	92
Figura 22 - Efeito do pH de fermentação sobre a cor (a) e pH das bebidas fermentadas (b), usando 120 h e 9 °C na fermentação e 168 h de maturação. As barras verticais representam o desvio padrão	95
Figura 23 - Efeito do tempo de maturação sobre a cor (a) e pH das bebidas fermentadas (b), usando pH 4,4, 120 h e 9 °C na fermentação. As barras verticais representam o desvio padrão	96
Figura 24 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito do tempo de fermentação sobre a cor (a) e o pH das bebidas fermentadas (b). As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).	97
Figura 25 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito da temperatura de fermentação sobre a cor (a) e o pH das bebidas fermentadas (b). As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).	98
Figura 26 - Superfície de resposta e curva de contorno para o etanol em função do tempo e da temperatura de fermentação.....	104
Figura 27 - Superfície de resposta e curva de contorno para o fator de conversão de substrato em produto em função do tempo e da temperatura de fermentação	106
Figura 28 - Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade volumétrica em função do tempo e da temperatura de fermentação.....	108
Figura 29 - Superfície de resposta e curva de contorno para o grau real de fermentação em função do tempo e da temperatura de fermentação	110
Figura 30 - Superfície de resposta e curva de contorno para a cor em função do tempo e da temperatura de fermentação.....	112
Figura 31 - Superfície de resposta e curva de contorno para o pH em função do tempo e da temperatura de fermentação.....	113
Figura 32 - Superfície de resposta e curva de contorno para o pH em função do tempo e da temperatura de fermentação.....	114
Figura 33 - Concentração do extrato real do mosto, da concentração celular e da concentração de etanol em escala piloto da bebida fermentada de sorgo (a) e da cerveja (b).....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diretrizes gerais para a dieta de doentes celíacos	18
Tabela 2 - Diferenças estruturais entre os grãos de sorgo e de cevada.....	21
Tabela 3 - Composição aproximada dos grãos de sorgo e cevada	22
Tabela 4 - Parâmetros ótimos das principais enzimas envolvidas na hidrólise do amido e das proteínas.....	41
Tabela 5 – Variáveis independentes e seus valores atuais e codificados usados para a otimização da maltagem	60
Tabela 6 - Variáveis independentes e seus valores atuais e codificados usados para a otimização da mosturação	60
Tabela 7 - Variáveis independentes e seus valores atuais e codificados usados para a otimização da fermentação	60
Tabela 8 - Atributos de qualidade dos cultivares BRS511 e 1G244	62
Tabela 9 – Matriz (valores reais) do delineamento composto central rotacional e respostas observadas no processo do malte de sorgo	72
Tabela 10 – Análises de variância para o modelo quadrático da superfície de resposta: modelo de regressão estimado da relação entre as variáveis respostas e as variáveis independentes (X_1 , X_2 , X_3) da maltagem.....	74
Tabela 11 - Valores preditos e experimentais das variáveis respostas na maltagem sob condições ótimas.....	81
Tabela 12 - Parâmetros de qualidade na maltagem de quatro cultivares de sorgo sob condições otimizadas	81
Tabela 13 - Matriz (valores reais) do delineamento composto central rotacional e respostas observadas na etapa de mosturação.....	88
Tabela 14 - Análise de variância para o modelo quadrático de superfície de resposta na mosturação.....	89
Tabela 15 - Valores preditos e experimentais das variáveis respostas na mosturação sob condições ótimas	93
Tabela 16 - Matriz (valores reais) do delineamento composto central rotacional e respostas observadas na etapa de fermentação	101
Tabela 17 - Análise de variância para os modelos da fermentação	103
Tabela 18 - Valores preditos e experimentais das variáveis respostas na fermentação sob condições ótimas.....	115
Tabela 19 - As notas das 13 amostras do DCCR na análise sensorial.....	117
Tabela 20 - Comparação dos parâmetros físicos e análises físico-químicas entre as bebidas fermentadas em escala de laboratório e em escala piloto	118
Tabela 21 - As notas na análise sensorial das bebidas realizadas em escala piloto e da bebida comercial	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: *Analysis of variance* (análise de variância)
ATP: *adenosine triphosphate* (adenosina trifosfato)
AR: *air rest* (repouso no ar)
ASBC: *American Society of Brewing Chemists*
CO₂: dióxido de carbono
CV: coeficiente de variação
CWE: *cold water extrat* (extrato em água fria)
DCCR: delineamento composto central rotacional
DP: *diastatic power* (poder diastático)
DC: doença celíaca
EBC: *European Brewery Convention*
EBU: European bitterness unitss (unidade de amargor europeia)
EUA: Estados Unidos
EEL: Escola de Engenharia de Lorena
EG: energia de germinação
ER: extrato real
FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)
HWE: *hot water extrat* (extrato em água quente)
FAN: *free amino nitrogen* (nitrogênio amino livre)
LK: *lack of fit* (falta de ajuste)
MSR: metodologia de superfície de resposta
MWL: *malting weight loss* (perdas da maltagem)
NAD⁺: *nicotinamide adenine dinucleotide* (nicotinamida adenina dinucleotídeo, estado oxidado)
NADH: *nicotinamide adenine dinucleotide* (nicotinamida adenina dinucleotídeo, estado reduzido)
NaOH: hidróxido de sódio
NST: Nitrogênio solúvel total
OMS: Organização Mundial da Saúde
PMG: peso de 1000 grãos
Qp: *volumetric productivity* (produtividade volumétrica)
R²: coeficiente de determinação
RDF: *real degree fermentation* (grau real de fermentação)
SDU: *sorghum diastatic units* (unidades diastáticas de sorgo)
USD: dólar dos Estados Unidos
UFC: unidades formadoras de colônias
Yp/s: *product yield coefficient* (fator de conversão de substrato em produto)
°L: graus Lintner
°L/kg: graus Litro por quilograma
°P: graus Plato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	TERMO "SEM GLÚTEN"	17
2.2	CERVEJAS OU BEBIDAS FERMENTADAS?	18
2.3	SORGO.....	19
2.4	LIMITAÇÕES DO SORGO NA PRODUÇÃO DE CERVEJA	22
2.5	PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS GRÃOS DE SORGO	24
2.5.1	INFLUÊNCIA DO CULTIVAR.....	24
2.5.2	PESO DE 1000 GRÃOS.....	25
2.5.3	ENERGIA DE GERMINAÇÃO	26
2.5.4	TEXTURA DO ENDOSPERMA	27
2.5.5	TEOR DE PROTEÍNAS.....	29
2.5.6	TEOR DE AMIDO	30
2.6	PROCESSO DE MALTAGEM.....	30
2.6.1	IMERSÃO.....	31
2.6.2	GERMINAÇÃO	32
2.6.3	SECAGEM	34
2.6.4	PARÂMETROS DE QUALIDADE DO MALTE.....	35
2.6.4.1	Perdas da maltagem	35
2.6.4.2	Poder diastático	35
2.6.4.3	Extrato em água fria.....	36
2.6.4.4	Extrato em água quente	37
2.6.4.5	Atenuação limite.....	38
2.6.4.6	Nitrogênio amino livre	39
2.7	MOSTURAÇÃO	40
2.8	FERMENTAÇÃO	42
2.9	MATURAÇÃO.....	43
2.9.1	AMARGOR.....	43
2.9.2	SABOR	44
3	OBJETIVOS	46
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1	MATERIAL.....	47
4.1.1	GRÃOS DE SORGO	47
4.1.2	ÁGUA	47
4.1.3	LÚPULO	47
4.1.4	LEVEDURA	47
4.2	ANÁLISE DA QUALIDADE DOS GRÃOS DE SORGO.....	47
4.3	MALTAGEM	48
4.4	ANÁLISE DE QUALIDADE NO PROCESSO DE MALTAGEM	49

4.5	PREPARAÇÃO DO MOSTO	50
4.6	ANÁLISES DE QUALIDADE NA ETAPA DE MOSTURAÇÃO	50
4.7	PREPARAÇÃO DAS BEBIDAS FERMENTADAS	50
4.7.1	MOSTURAÇÃO	50
4.7.2	FILTRAÇÃO DO MOSTO	51
4.7.3	FERVURA DO MOSTO	51
4.7.4	PREPARAÇÃO DO INÓCULO	51
4.7.5	FERMENTAÇÃO	52
4.7.6	MATURAÇÃO E ENVASE	52
4.8	ANÁLISE DE QUALIDADE NA ETAPA DE FERMENTAÇÃO	52
4.8.1	PARÂMETROS CINÉTICOS	53
4.9	METODOLOGIA DE OTIMIZAÇÃO	54
4.9.1	PROCESSO DE MALTAGEM	55
4.9.2	ETAPA DE MOSTURAÇÃO	55
4.9.3	ETAPA DE FERMENTAÇÃO	57
4.10	ANÁLISE SENSORIAL	58
4.11	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4.12	OTIMIZAÇÃO.....	61

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO62

5.1	QUALIDADE DOS GRÃOS	62
5.2	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MALTAGEM DO CULTIVAR BRS511	62
5.2.1	SELEÇÃO DA TEMPERATURA DE IMERSÃO E DE GERMINAÇÃO	62
5.2.2	SELEÇÃO DOS NÍVEIS DOS FATORES DO DCCR	66
5.2.2.1	Concentração de NaOH	66
5.2.2.2	Tempo de imersão.....	68
5.2.2.3	Tempo de germinação.....	68
5.2.3	METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	70
5.2.4	COMPOSIÇÃO DOS MODELOS	72
5.2.5	ANÁLISE DAS SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS.....	75
5.2.5.1	Poder diastático.....	76
5.2.5.2	Extrato em água quente	77
5.2.5.3	Nitrogênio amino livre.....	78
5.2.5.4	Perdas da maltagem.....	79
5.2.6	VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL.....	80
5.3	OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE MOSTURAÇÃO DO MALTE DO CULTIVAR 1G244	82
5.3.1	SELEÇÃO DO PH E TEMPERATURA DAS PROTEASES	82
5.3.2	SELEÇÃO DOS NÍVEIS DOS FATORES DO DCCR	85
5.3.2.1	Temperatura da atividade β -amilase	85
5.3.2.2	Temperatura da atividade α -amilase	86
5.3.3	METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	87
5.3.4	COMPOSIÇÃO DOS MODELOS	88
5.3.5	ANÁLISE DAS SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS.....	89
5.3.5.1	Extrato em água quente	89
5.3.5.2	Nitrogênio amino livre.....	91
5.3.6	VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL.....	93

5.4	OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE FERMENTAÇÃO DO MOSTO DO CULTIVAR 1G244	94
5.4.1	SELEÇÃO DO PH DE FERMENTAÇÃO E DO TEMPO DE MATURAÇÃO	94
5.4.2	SELEÇÃO DOS NÍVEIS DOS FATORES DO DCCR	97
5.4.2.1	Tempo de fermentação	97
5.4.2.2	Temperatura de fermentação	98
5.4.3	METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	99
5.4.4	COMPOSIÇÃO DOS MODELOS	99
5.4.5	ANÁLISE DAS SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS	104
5.4.5.1	Etanol	104
5.4.5.2	Fator de conversão de substrato em produto	105
5.4.5.3	Produtividade volumétrica	107
5.4.5.4	Grau real de fermentação	109
5.4.5.5	Cor	111
5.4.5.6	Nitrogênio amino livre	113
5.4.6	VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL	115
5.5	ANÁLISE SENSORIAL DAS BEBIDAS FERMENTADAS EM ESCALA DE LABORATÓRIO	116
5.6	PRODUÇÃO EM ESCALA PILOTO DAS BEBIDAS FERMENTADAS	118
5.6.1	FERMENTAÇÃO EM ESCALA PILOTO	118
5.6.2	ANÁLISE SENSORIAL DAS BEBIDAS EM ESCALA PILOTO	119
6	CONCLUSÕES	121
7	RECOMENDAÇÕES	123
	REFERÊNCIAS	124
	APÊNDICES	144
	APÊNDICE A	144
	APÊNDICE B	145

1 INTRODUÇÃO

Muitos dos alimentos e das bebidas são feitos a partir de cereais que contêm glúten tais como o trigo, o centeio, a cevada e a aveia. O glúten é uma mistura complexa de proteínas composta por prolina e glutamina (prolaminas) presente nesses cereais (FASANO; CATASSI, 2001; ROSELL et al., 2014; TAYLOR; ARENDT, 2016).

Contudo, em pessoas com predisposição genética, a ingestão destes cereais provoca uma reação ao glúten característica da doença celíaca. A doença celíaca tem afetado cerca de 1% da população mundial (CATASSI; GATTI; FASANO, 2014). Conforme Fasano e Catassi (2001), a DC, em indivíduos geneticamente susceptíveis, é uma síndrome caracterizada por dano da mucosa do intestino delgado causada pelas prolaminas. Os autores afirmam que o tratamento chave da DC é a dieta, ao longo da vida, na qual os produtos que contêm glúten são eliminados. Neste sentido, há vários estudos, direcionados aos doentes celíacos, sobre alimentos livres de glúten, tais como bolos (GOMES et al., 2014), biscoitos (MARIANI et al., 2015) e pães (SILVA et al., 2017).

Além disso, comercializam-se cervejas sem glúten, obtidas a partir do malte de cevada, como revisado por Taylor e Arendt (2016). Esses produtos podem ser tratados com enzimas para degradar ou remover as prolaminas (TAYLOR; JACOB; ARENDT, 2015b) ou submetidos a processos de filtração que reduzem as prolaminas (TAYLOR; JACOB; ARENDT, 2015a). No entanto, devido a que as prolaminas, nesses processos, não são não eliminadas totalmente, isto faz com que as bebidas não sejam totalmente seguras para os doentes celíacos.

Por outro lado, tem havido um crescente desenvolvimento de cervejas *lager* usando proporções de cereais distintos do malte de cevada (TAYLOR; DLAMINI; KRUGER, 2013). Os autores informaram que existem várias cervejas *lager*, totalmente sem cevada, por exemplo, a *Bard's* preparada a partir de sorgo, nos Estados Unidos (EUA).

É assumido que o sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) tem grande potencial para ser usado na produção de alimentos e bebidas sem glúten (OGBONNA, 2011; ARENDT; SCHNITZENBAUMER, 2014). Um estudo demonstrou que híbridos de sorgo branco foram as matérias primas alternativas que produziram os melhores maltes para a indústria cervejeira (GARZÓN; DRAGO, 2018). Além disso, é muito

consumido na África e, nesse continente, há várias pesquisas sobre bebidas não fermentadas (ELGORASHI; ELKHALIFA; SULIEMAN, 2016) e fermentadas (ADEGBOLA et al., 2013); (DJAMEH et al., 2015) a partir desse cereal. Especificamente, Lyumugabe et al. (2012) ressaltaram a variabilidade das cervejas de sorgo; dentre as mesmas, encontram-se: *ikigage*, *merissa*, *doro*, *dolo*, *pito*, *amgba*, *tchoukoutou*. Esses autores reportaram que essas bebidas são ricas em aminoácidos essenciais, calorias, vitaminas do complexo B, incluindo tiamina, ácido fólico, riboflavina e ácido nicotínico. Contêm grandes quantidades de minerais, dentre os quais se encontram ferro, fósforo, potássio e sódio; demonstrando assim que, a substituição da cevada pelo sorgo, na produção de cerveja, está baseada, também, em seu alto valor nutritivo.

O sorgo, ao contrário da cevada, é muito bem adaptado às condições semiáridas e subtropicais. Uma das vantagens de seu cultivo é que ele pode crescer sob forte estresse ambiental, como a seca, em que os cereais temperados não conseguem se desenvolver (AGU; PALMER, 1998; PRASAD et al., 2007). O sorgo é o quinto cereal mais importante na produção mundial, após trigo, arroz, milho e cevada (SERNA-SALDIVAR; TELLES-GIRON; ROONEY, 1988; ANGLANI, 1998; WONG et al., 2009). Já no Brasil, o sorgo encontra-se em quarto lugar na produção de cereais, antes da cevada (FAO, 2015).

Em países da América, o sorgo tem um preço relativamente mais baixo, quando comparado ao da cevada. Por exemplo, os preços registros do sorgo e da cevada, em dólar dos Estados Unidos (*USD*) por tonelada (*USD/tonelada*), na Bolívia, Colômbia, no México, Uruguai e EUA têm sido 163,50 e 407,30; 300,20 e 429,10; 189,20 e 235,70; 156,10 e 227,30; e 120,00 e 253,00, respectivamente (FAO, 2015).

Contudo, as principais desvantagens no uso do sorgo, na produção cerveja, são a alta temperatura de gelatinização do amido (> 70 °C) e o baixo poder diastático (OWUAMA, 1997; OGBONNA, 2011). Nesse sentido, Dufour e Mélotte (1992) atribuíram os problemas de sacarificação, nas variedades de sorgo estudadas, à grande variabilidade da temperatura de gelatinização e viscosidade do amido, e à falta de β -amilase em muitos dos grãos. Tem sido estabelecido que as condições da maltagem tais como a concentração de hidróxido de sódio (NaOH), o tempo de imersão, o tempo de germinação e o tipo de cultivar influenciam na qualidade do malte (NOVELLIE, 1962b; PATHIRANA; SIVAYOGASUNDARAM;

JAYATISSA, 1983; MORRALL; BOYD; TAYLOR, 1986b; LEFYEDI; TAYLOR, 2006; BEKELE; BULTOSA; BELETE, 2012; DJAMEH et al., 2015).

Um índice crítico da qualidade do malte tal como o *DP*, deve ser adequado para a conversão deste em extrato (açúcares fermentáveis) para a fermentação pelas leveduras. O malte deve também produzir quantidade suficiente de nitrogênio amino livre requerido pelas leveduras para o crescimento e produção de álcool e compostos aromáticos durante a fermentação (DJAMEH et al., 2015).

Por outro lado, as mínimas perdas no processo de maltagem garantem a qualidade do mesmo. Devido à alta temperatura de gelatinização do amido de sorgo, a mosturação por infusão, comumente realizada com o malte de cevada, não pode ser usada com o malte de sorgo. Por isso, usa-se a mosturação por decantação; assim, o amido é gelatinizado, por fervura, e depois sacarificado (GUERRA et al., 2009; AGU; PALMER, 2013) para extrair a maior quantidade de açúcares fermentáveis necessários na fermentação, os quais dependem da variedade usada (ARCHIBONG et al., 2015).

A aceitabilidade das cervejas de sorgo é ainda uma limitação. Necessitam-se de estudos para atingir as características sensoriais adequadas que agradem ao consumidor. Há vários anos, Owuama (1997) ressaltou que a otimização das condições da maltagem, mosturação e fermentação do mosto a partir do malte de sorgo são necessárias para produzir bebidas com o citado cereal.

Diante do exposto, o objetivo deste projeto de pesquisa foi avaliar os fatores que influenciam na maltagem de sorgo (concentração de NaOH na imersão, tempo de imersão e de germinação; na mosturação (temperatura das atividades α e β -amilase), e na fermentação (tempo e temperatura) na produção de bebidas fermentadas sem glúten.

A metodologia de superfície de resposta, baseada no delineamento composto central rotacional, foi usada para a maximização de variáveis respostas tais como poder diastático, extrato em água quente, nitrogênio amino livre e perdas da maltagem, na maltagem; *HWE*, *FAN*, na mosturação; e teor alcoólico, fator de conversão de substrato em produto, produtividade volumétrica, grau real de fermentação, cor, pH e *FAN*, na fermentação. Assim as melhores condições poderiam ser escalonadas para a produção de uma bebida fermentada sem glúten e, aquelas pessoas que apresentam a doença celíaca, poderiam consumir uma

bebida compatível com seu metabolismo. Além disso, seria um produto atrativo, mesmo para aqueles consumidores que não apresentam essa doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Termo “sem glúten”

O *Codex Alimentarius* é uma comissão conjunta da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) com o objetivo de estabelecer normas internacionais na área de alimentos, incluindo padrões, diretrizes e guias sobre Boas Práticas e Avaliação de Segurança e Eficácia. Seus principais objetivos são proteger a saúde dos consumidores e garantir práticas leais de comércio entre os países (CODEX, 2006). Segundo essa Comissão, os alimentos livres de glúten são aqueles produzidos a partir de ingredientes que não contêm trigo, cevada, centeio, aveia ou triticale (cereal híbrido do trigo e do centeio), ou seus constituintes que não excedam 20 mg de glúten por Kg de alimento (20 ppm).

Outra categoria de produtos definida pelo *Codex* inclui aqueles alimentos com ingredientes provenientes dos anteriormente citados que passaram por processo de redução do conteúdo de glúten a um nível de até 100 mg de glúten por Kg de alimento (20 – 100 ppm). Nesse caso, o alimento não deve ser denominado “livre de glúten”. O *Codex* preconiza ainda que os alimentos contemplados nessa norma devem ser produzidos de acordo com as Boas Práticas de Fabricação, para evitar possível contaminação com glúten (CODEX, 2008). As Boas Práticas de Fabricação estão relacionadas ao uso correto de equipamentos e utensílios e à produção do alimento e documentação (BICUDO; FERREIRA; SAMPAIO, 2013).

A maior parte dos regulamentos de rotulagem relativos ao glúten no mundo é baseada na norma do *Codex*. Apesar disso, a implementação nacional de normas equivalentes apresenta diferenças importantes entre os países e depende das decisões das autoridades locais (DIAZ-AMIGO; POPPING, 2012).

No Brasil, a lei 8.543, de dezembro de 1992, determina a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten. Segundo essa lei, deverá ser expressa a advertência com relação à presença de glúten quando a composição do alimento incluir trigo, cevada, centeio, aveia, malte e/ou seus derivados (BRASIL, 1992).

Existem controvérsias se as frações de prolaminas e gluteninas da aveia são adequadas para celíacos (FRIC; GABROVSKA; NEVORAL, 2011). Apesar de não ser classificada como livre de glúten, a aveia pode ser tolerada por muitos celíacos

(PERÄÄHO et al., 2004). Fasano e Catassi, (2001) relatam que as controvérsias existentes são atribuíveis à falta de evidência científica sólida para um limiar de consumo de glúten abaixo do qual não ocorre dano. De fato, uma revisão, feita por Kerpes, Fischer e Becker (2017), demonstrou que os poucos estudos clínicos sobre a toxicidade da aveia para celíacos ainda são contraditórios.

Um produto proveniente dos cereais é o malte. Segundo Fasano e Catassi (2001) o malte também é tóxico para doentes celíacos, porque contém um hidrolisado parcial das prolaminas de cereais como a cevada, por exemplo. O malte de cevada pode conter entre 100 e 200 mg de prolaminas da cevada por 100 g de malte (ELLIS et al., 1994).

A Tabela 1 apresenta uma variedade de grãos amplamente utilizados na alimentação, dos quais alguns são permitidos para a dieta dos doentes celíacos.

Tabela 1 - Diretrizes gerais para a dieta de doentes celíacos

Não permitido	Permitido
Trigo (família <i>Triticum</i>)	Arroz, arroz selvagem
Centeio (<i>Secale cereale</i>)	Milho
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Sorgo
Triticale	Painço
Aveia (<i>Aveina sativa</i>)	Trigo-sarraceno
	Quinoa
	Soja

Fonte: Dados de (FASANO; CATASSI, 2001)

2.2 Cervejas ou bebidas fermentadas?

Na África (LYUMUGABE et al., 2012; LYUMUGABE et al., 2014) e em países de América do Sul, como Argentina (GARZÓN; DRAGO, 2018), a "cerveja" é denominada como o produto final obtido pela fermentação do mosto do malte de cereais.

Já, no Brasil, essa denominação é diferente. Segundo o Decreto nº 6.871, (BRASIL, 2009), regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, define a cerveja como a bebida produzida só pelo malte de cevada. Neste decreto, o artigo 36 define a cerveja como 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. Afirma que o malte de cevada e o lúpulo poderão ser substituídos por seus respectivos extratos, e que o 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. O artigo 2º define que a bebida é o produto de origem vegetal industrializado, destinado à ingestão humana em estado líquido, sem finalidade medicamentosa ou terapêutica. Segundo o artigo 12, esta pode ser: (i) não alcoólica, com graduação alcoólica até meio por cento em volume, seja ela fermentada ou não e (ii) alcoólica, com graduação alcoólica acima de meio por cento em volume até cinquenta e quatro por cento em volume. No Brasil, comercializam-se cervejas sem glúten, produzidas no país. Por exemplo a cerveja *pilsen* Wienbier 55 (Figura 1), elaborada a partir de cevada e cereais não malteados.

Figura 1 - Cerveja Wienbier sem glúten comercializada no Brasil



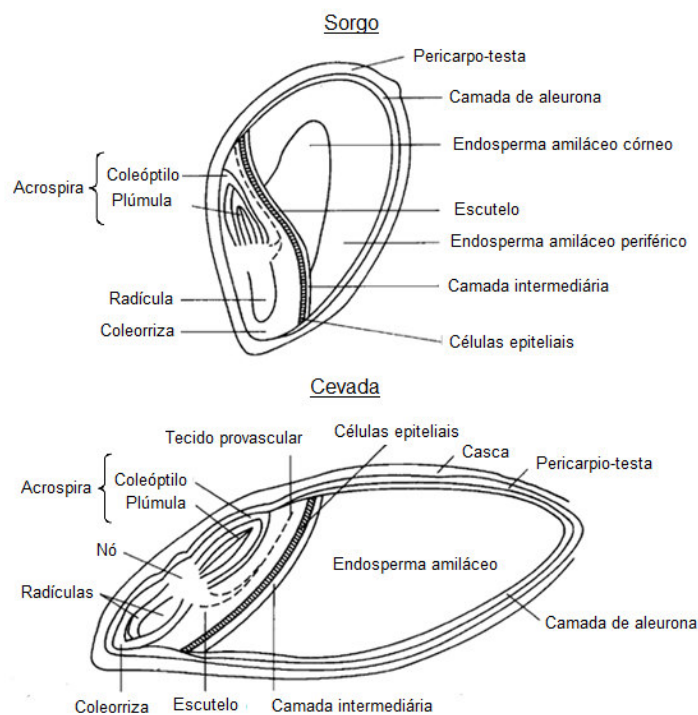
Fonte: Arquivo pessoal

2.3 Sorgo

O sorgo pertence à família *Graminae*, do gênero *sorghum* (OWUAMA, 1997). Ele é um dos cereais recomendados, como alimento seguro, para pacientes celíacos (MULTANI et al., 2003). Duas das espécies mais conhecidas de sorgo são *Sorghum vulgare* e *Sorghum bicolor* L. Moench. Os grãos de sorgo variam de vermelho, preto e marrom a amarelo e branco. Essas diferentes cores ou pigmentos são devidos à variação do conteúdo de polinenóis dos grãos, os quais são localizados no pericarpo-testa (PALMER; ETOKAKPAN; IGYOR, 1989). A maioria das proteínas do sorgo é encontrada dentro do endosperma do grão. As principais

frações proteicas do sorgo são as prolaminas e as glutelinas. O sorgo contém mais prolaminas do que a cevada. A prolamina no sorgo é a kafirina, uma proteína semelhante à do milho (zeína) em peso molecular, estrutura, solubilidade e composição de aminoácidos (SECKINGER; WOLF, 1973). A kafirina é predominante em três formas: α -, β - e γ -kafirina, sendo α -kafirina a forma principal (MUSIGAKUN; THONGNGAM, 2007). Estas prolaminas de sorgo estão localizadas dentro dos corpos de proteína no endosperma amiláceo (Figura 2) (TAYLOR; NOVELLIE; LIEBENBERG, 1984).

Figura 2 - Seção longitudinal dos grãos de sorgo e cevada



Fonte: (PALMER; ETOKAKPAN; IGYOR, 1989)

Existem diferenças marcantes entre os grãos de sorgo e de cevada como as relacionadas com o pericarpo-testa, as características do endosperma e as enzimas que o degradam, e as perdas durante a maltagem (Tabela 2). O pericarpo é a parede do fruto e a testa é a casca da semente (PALMER, 1989).

Palmer, Etokapan e Igyor (1989) assinalaram que os pigmentos, descritos como taninos, compreendem flavonoides e antocianinas. Alguns destes polifenóis estão localizados na região nuclear da testa. Os grãos de sorgo que não têm tecido nuclear têm, portanto, níveis reduzidos de polifenóis. Os polifenóis tais como as

proantocianidinas (taninos condensados), podem reagir com as proteínas, fazendo com que elas precipitem no mosto ou na cerveja.

Tabela 2 - Diferenças estruturais entre os grãos de sorgo e de cevada

	Diferenças	
	Grãos de sorgo	Grãos de cevada
	Pericarpo-testa	
Níveis de pigmentação por polifenóis ^{a,b}	altos	baixos
Grânulos de amido ^c	presentes	ausentes
	Características do endosperma do grão malteado	
Compactação do amido ^a	não friável	friável
	Produção de enzimas que degradam o endosperma	
Escutelo ^{c,d}	α-amilase e carboxipeptidase	
Endosperma amiláceo ^{c,d}	endo-β-glucanase, dextrinase limite, endo-protease	carboxipeptidase e β-amilase
Camada aleurona ^{c,d}		α-amilase, endo-protease, dextrina limite e endo-β-glucanase
	Perdas durante a maltagem	
Porcentagem ^c	20	7

Fonte: ^a(ERDAL, 1986); ^b(PALMER, 1989); ^c(PALMER; ETOKAKPAN; IGYOR, 1989); ^d(AISIEN; PALMER; STARK, 1983)

Durante a germinação, o hormônio ácido giberélico, induz à camada de aleurona da cevada à produção de enzimas que degradam o endosperma (PALMER, 1989), mas este hormônio não desempenha tal papel no desenvolvimento das enzimas no sorgo (AISIEN; PALMER; STARK, 1983; PALMER, 1989).

O fosfato, um mineral importante encontrado no tecido da aleurona da cevada e no embrião do sorgo (PALMER; ETOKAKPAN; IGYOR, 1989), pode explicar as diferenças nos potenciais de produção das enzimas em ambos cereais (AGU; PALMER, 1998).

Uma composição aproximada dos grãos de sorgo e cevada é apresentada na Tabela 3.

O grãos de sorgo classificam-se segundo à cor do pericarpo (sementes) e ao tipo de endosperma. De acordo à cor do pericarpo, as variedades de sorgo classificam se em tipo I, II e III. O tipo I, sem taninos, pericarpo não pigmentado; e os tipos II e III, sorgos taninos, pericarpo pigmentado (DYKES et al., 2005). O tipo II apresenta menor teor de taninos do que o tipo III (DYKES; ROONEY, 2006).

Tabela 3 - Composição aproximada dos grãos de sorgo e cevada

	Grão de sorgo (%)	Grão de cevada (%)
Embrião	8,0	4,0
Endosperma	86,0	80,0
Pericarpo-testa	6,0	6,0
Aleurone	-	10,0
Amido	70,0	65,0
Nitrogênio x 6.25 = proteína	10,0	11,0
Lipídeos	4,0	3,0
β -D-glucano	0,4	3,3
Pentosano	2,5	9,0
Cinzas	1,6	3,1
Temperatura de gelatinização do amido	75°C	62 - 63°C

Fonte: (PALMER; ETOKAKPAN; IGYOR, 1989)

Os sorgos taninos tipo II são invariavelmente de aparência branca, enquanto os de tipo III são invariavelmente de cor vermelho o marrom; embora, há variedades com estas cores que não contêm taninos (ROONEY; MILLER, 1982). É assumido que a maioria dos tipos de sorgo não tanino tem um endosperma córneo ou duro; já os tipos tanino uma textura predominantemente farinhosa ou branda (ADETUNJI et al., 2013). Segundo Waniska, Poe e Bandyopadhyay (1989), o endosperma brando desse tipo de sorgo é devido à presença de taninos que servem como mecanismo de defesa contra o ataque de fungos.

O endosperma dos sorgos cerosos contêm 100% de amilopectina (0% amilose) enquanto o endosperma dos não-cerosos normais são compostos, de aproximadamente 75 % de amilopectina e 25% de amilose (ROONEY; MILLER, 1982). Taylor et al. (2006) assinalaram que as variedades cerosas são reconhecidas por ter melhor potencial para a produção de cerveja, devido a sua textura de endosperma branda que ajudam aos grânulos de amido a se gelatinizar rapidamente, e, portanto, favorecem uma hidrólise melhorada por amilases e proteases, quando comparados com sorgos não-cerosos.

2.4 Limitações do sorgo na produção de cerveja

Conforme Owuama e Okafor (1987), o processo de produção de cerveja envolve o processo de maltagem e etapas de mosturação, fervura do mosto, fermentação, maturação e envase. A produção de cervejas *lager* com sorgo, pelo

método convencional, envolve o uso de sorgo não maltado como adjunto, malte de sorgo em vários níveis de substituição pelo malte de cevada, ou só malte de sorgo (OKAFOR; ANICHE, 1980; OLATUNJI et al., 1993). Alguns trabalhos têm sido realizados para otimizar condições as quais afetam a maltagem, secagem, mosturação e fermentação durante a produção de cerveja convencional com sorgo (OWUAMA; OKAFOR, 1987; OLATUNJI et al., 1993; OWUAMA; ASHENO, 1994).

Na produção de cerveja de sorgo, as limitações do processo estão relacionadas, principalmente, com as etapas do processo de maltagem e a etapa de mosturação. Além da alta temperatura de gelatinização do amido, o malte de sorgo apresenta insuficiente nível de enzimas hidrolíticas, quando comparado com o malte da cevada, especificamente o nível de β -amilase. Taylor e Robbins (1993) relataram que os grãos de sorgo não germinados não possuem atividade β -amilase e que, depois da maltagem, o sorgo tem uma atividade β -amilase inferior aos 25% do nível dessa atividade no malte de cevada. Por outro lado, tem sido reportado que o tempo de germinação é um fator crítico na atividade β -amilase (HASSANI; ZARNKOW; BECKER, 2014). As causas da baixa atividade β -amilase têm sido explicadas por vários autores. Por exemplo, Uriyo e Eigel (1999) explicaram que essa debilidade é devida à interação entre β -amilase e polifenóis. Diversamente, Dufour e Mélotte (1992) mostraram que a atividade β -amilase permanece fraca, mesmo em variedades de sorgo com baixo teor de polifenóis. Os autores atribuíram os problemas de sacarificação, nas variedades de sorgo estudadas, à grande variabilidade da temperatura de gelatinização e viscosidade do amido, e à falta de β -amilase em muitos dos grãos. A variabilidade no comportamento da temperatura de gelatinização do amido e das viscosidades foi atribuída às porcentagens variáveis de ramificação em amilopectina e diferentes forças de ligação nos grânulos (maior resistência ao inchamento e à ruptura).

Outros autores afirmam que, à parte dos polifenóis, o baixo nível de proteínas solúveis também pode inibir a atividade β -amilase. As proteínas formam uma matriz que envolve os grânulos de amido e, se não são solubilizadas durante a germinação, inibem a hidrólise do amido pela β -amilase (PALMER; ETOKAKPAN; IGYOR, 1989). Por outro lado, a proteólise é vital para a geração de *FAN* e peptídeos curtos, durante a maltagem. No sorgo, a atividade proteolítica também é outra limitação. Segundo Evans e Taylor (1990a), a proteólise é provocada pela ação das enzimas proteolíticas do malte. O baixo grau de proteólise (atividade

proteolítica) afeta negativamente o rendimento, a filtração e a fermentabilidade do mosto, como também a espuma e a estabilidade da cerveja. Um grau de proteólise adequado é decorrente de adequados níveis de TSN e de *FAN*. Além disso, a degradação incompleta das proteínas estruturais e de armazenamento do grão, durante a maltagem, limita a extensão da solubilização de carboidratos, durante a mosturação (AGU; PALMER, 1997c). Como observado, os principais obstáculos do malte de sorgo para ser usado na produção de cerveja são decorrentes das ações limitadas das enzimas amilolíticas e proteolíticas; dessa maneira, fica comprometida a produção de malte de boa qualidade devido à baixa atividade enzimática. Isso proporciona as desvantagens econômicas relacionadas com a filtração do mosto. Entretanto, essas limitações podem ser minimizadas por meio de: (i) a escolha adequada da variedade de sorgo, que apresente baixa temperatura de gelatinização e alto poder diastático; (ii) otimização da maltagem, e (iii) otimização da mosturação.

2.5 Parâmetros de qualidade dos grãos de sorgo

2.5.1 Influência do cultivar

A cultivar de sorgo influi nos parâmetros de qualidade do malte. Assim o mosto pode ter ou não os substratos necessários para serem utilizados pelas leveduras, durante a fermentação, por exemplo os açúcares fermentáveis e nitrogênio, expressos como *HWE* e *FAN*, respectivamente. Os resultados obtidos por Agu e Palmer (1997b) indicaram que diferentes variedades de sorgo macerados sob condições similares mostraram ampla variação em seus perfis de açúcares, devido às diferenças estacionais (condições ambientais) e de processamento (maltagem a 20 e 30 °C). Por exemplo, as cultivares *SS 16* (cultivar branca) e *SS 9* (cultivar vermelha) produziram baixos níveis de glicose e mais maltose quando germinados a 30 °C. No entanto, quando a maltagem foi realizada a 20 °C, eles produziram altos níveis de glicose e maltose. Os autores também descreveram que a 30 °C, a cultivar de sorgo vermelho, desenvolveu as atividades α e β -amilase perfeitamente, não acontecendo o mesmo com a variedade de sorgo branco, o que demonstra a influência do cultivar de sorgo na qualidade da maltagem, e que nem sempre há uma relação direta entre os níveis das α e β -amilases do malte e a relação entre maltose e glicose encontrada no mosto.

A temperatura de gelatinização do amido de sorgo é superior ao da cevada. Especificamente, Beta e Orke (2001) reportaram um intervalo entre 67 – 81 °C para o sorgo, e Aisien e Muts (1987) entre 63 – 64 °C para a cevada. Guerra et al. (2009) relatam que altas temperaturas de gelatinização do amido incrementam a desativação térmica das enzimas do malte de sorgo. Por conseguinte, as simultâneas gelatinização e hidrólise do amido, as quais ocorrem durante a mosturação do malte de cevada, é um problema no caso do malte de sorgo. A variedade de sorgo também determina a temperatura de gelatinização do amido. Por exemplo, Beta et al. (2000) afirmaram que *Barnard Red*, uma variedade de sorgo vermelho da África do Sul, gelatiniza o amido a 59,4 °C, enquanto o sorgo Chinês, de Hong Kong gelatiniza a 66,2 °C.

2.5.2 Peso de 1000 grãos

O peso de 1000 grãos (PMG) é um indicador do tamanho dos grãos (CHIREMBA; ROONEY; TAYLOR, 2011). Os citados autores têm reportado um PMG médio de 26 g em híbridos de sorgo comerciais. Já na cevada, o PMG é maior, oscilando entre 37,0 e 48,5 g (TAYLOR; ARENDT, 2016). Este parâmetro de qualidade dos grãos está relacionado com a qualidade da maltagem, em termos de extrato. Por exemplo, o PMG pode ter uma relação proporcional com extrato em água quente e com o extrato em água fria. As cultivares *SK 5912*, *NRL 3* e *KSV 8*, estudadas por Nnamchi et al. (2014), foram as de maiores pesos (40,25; 39,55 e 36,9 g) e atingiram os maiores valores de *HWE* (240,3; 200,7 e 235,6 °L/kg), respectivamente; no entanto, os maiores extratos foram com a primeira e a terceira variedade. O menor *HWE* (170,0 °L/kg) foi obtido com a cultivar *KAT 487*, a qual pesou 26,45 g, valor próximo ao mais baixo peso (22,45 g) registrado na variedade *Nafelen 6*. Fica demonstrado que os grãos mais grandes contêm proporcionalmente menos casca e, portanto, um maior teor de carboidratos quando comparado com os grãos mais pequenos, como assinalou Bamforth (2002). De fato Nnamchi et al. (2014) encontraram em *SK 5912*, *NRL 3* e *KSV 8*, os máximos teores de carboidrato, 70,6; 70,4 e 71,4%, respectivamente. Igualmente, as cultivares *SK 5912* e *KSV 8* também alcançaram os maiores valores de *CWE*, 22,5 e 21,1%, e a cultivar *KAT 487* um *CWE* de 15,2%, perto do mais baixo *CWE* (14,8%) verificado na cultivar *ICSV III*. Deduz se que para obter adequados valores de extratos são necessários cultivares com altos pesos de 1000 grãos.

Entretanto, cultivares com pesos menores também fornecem um adequado *HWE*. Dos três cultivares avaliados por Nso et al. (2003), o cultivar *S.35*, com um PMG de 28,3 g, produziu igual *HWE* (334,0 °L/kg) que a cultivar *Safrari* de maior peso (49,9 g). O comportamento similar no *HWE* das cultivares com pesos diferentes pode ser devido a que a cultivar *S.35* apresentou maior densidade (0,969 /cm³ ou 96,9 kg/hL) quando comparado com a densidade (0,907 g/cm³ ou 90,7 kg/hL) da cultivar *Safrari*, sugerindo um alto potencial de rendimento do amido como fonte de extrato fermentável para a produção de cerveja. Observa-se, desta forma, que uma elevada densidade ou peso hectolitro correlaciona-se positivamente com o elevado teor de amido nos grãos.

O *HWE* reportado por Nso et al. (2003) superou ao reportado por Nnamchi et al. (2014) devido, provavelmente, ao método de maceração usado. Nso et al., (2003) usaram o método de decantação, no qual obtém-se maiores rendimentos de extratos, enquanto Nnamchi et al. (2014) usaram a técnica de infusão, a qual não é factível para o sorgo (TAYLOR; SCHOBBER; BEAN, 2006; NDUBISI et al., 2016).

2.5.3 Energia de germinação

A energia de germinação (EG, %) indica a porcentagem dos grãos que podem germinar (DJAMEH et al., 2015). Segundo a metodologia da *European Brewery Convention (EBC)* EBC (1987), a EG realiza-se a 20 °C, temperatura ótima para o desenvolvimento enzimático da cevada. Contudo, para cereais de natureza tropical, como o sorgo, a temperatura de EG é superior. Por exemplo, Bekele et al. (2012) determinaram a EG a 25 °C, Ebbah et al. (2015) a 28 °C e Djameh et al. (2015) a 29 °C, temperaturas apropriadas para alcançar um adequado *DP* no malte de sorgo. A EG mínima requerida para a cevada é 96% (EBC, 1987). Diversamente, para que o sorgo possa ser considerado adequado para a maltagem, a EG deve ser superior aos 90% (DEWAR; TAYLOR; JOUSTRA, 1995).

Com iguais valores de EG, podem ser obtidos extratos superiores com malte de sorgo do que com malte de cevada. No estudo feito por Agu e Palmer (2013), ambos os cereais obtiveram igual EG (99%); no entanto, foi superior o *HWE* do malte de sorgo (327 °L/kg) quando comparado ao do malte de cevada (323 °L/kg). Assim como o peso de 1000 grãos, a EG é influenciada pela variedade. A EG influencia na qualidade do malte em termos de poder diastático e extratos. A maior EG (99,33%) e o máximo *DP* (31,39 °L) das cultivares de sorgo, estudadas por

Bekele et al. (2012), foi alcançada pela cultivar *Gambella 1107*, e a menor EG (96,33%) e o mínimo *DP* (23,91 °L) obtive-se com a cultivar *76T1#23*. No entanto, a EG não teve o efeito sobre o *HWE*. As energias de germinação (97,67%) foram iguais nas cultivares *Red-Swazi* e *Meko*; contudo atingiram extratos de 53,41 e 84,03%, respectivamente.

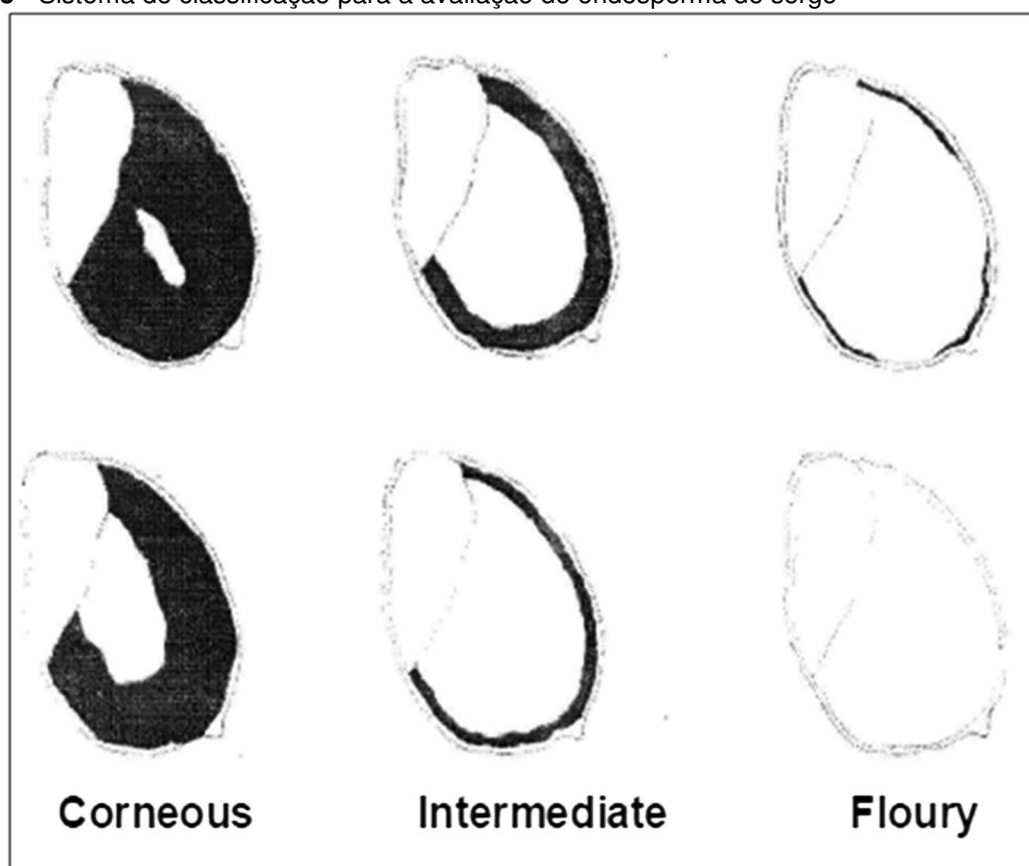
Por outro lado, Nnamchi et al. (2014) reportaram que as cultivares *SK 5912* e *KSV 8* alcançaram as maiores energias de germinação, 98,0 e 97,0% e os maiores valores de *HWE* e de *CWE*, como foi assinalado no epígrafe 2.5.2. A cultivar *ICSVIII*, com menor EG (90,0%), alcançou também o menor valor de *CWE* (14,8%) e um *HWE* (172,0%) perto do valor mais baixo (170,0%).

2.5.4 Textura do endosperma

A classificação da textura do endosperma é usada como uma técnica para a estimativa da dureza do grão (ROONEY; MILLER, 1982; PALMER; ETOKAKPAN; IGYOR, 1989). A proporção relativa de córneo a farinhoso dentro de um grão de sorgo é referida como a textura do endosperma. Essa textura pode ser determinada por uma exame visual do grão cortado longitudinalmente, comparando-a com a foto (Figura 3) de amostras que foram previamente avaliadas. A avaliação é feita usando uma escala de 1 a 5, com uma classificação de 1 (córneo), de intermediário (2 – 3) ou de farinhoso (4 – 5) (ROONEY; MILLER, 1982).

Os grãos de sorgo com uma textura do endosperma intermediária são considerados mais adequados para a maltagem do que aqueles com textura farinhosa (ADEOLA, 2002; BEKELE; BULTOSA; BELETE, 2012). Conforme Adeola (2002) as energias de germinação dos grãos com textura intermediária foram maiores (84 – 95%) quando comparadas com os de textura farinhosa (82%), com exceção de *ICSH 89002* e do *ICSV 247*. O fato de o *ICSH 89002*, apesar de ser farinhoso, apresentar a maior EG, 98%, pode indicar que existem diferenças entre cultivares de sorgo da mesma textura. O desvio observado na *ICSV 247*, com textura intermediária, que tinha a menor EG (21%), pode ser decorrente da infestação do grão, segundo os autores.

Rooney e Miller (1982) confirmaram que a infestação afeta a coloração do pericarpo e a germinabilidade dos grãos. Além disso, no quarto dia de germinação, o maior valor de *HWE* (472,8 °L/kg) foi atingido numa cultivar com textura intermediária enquanto o maior valor de *HWE* dos farinhosos foi 372,4 °L/kg.

Figura 3 - Sistema de classificação para a avaliação do endosperma de sorgo

Corneous: dura; *Intermediate*: intermediária; *Floury*: farinhosa.
 Fonte: (ROONEY; MILLER, 1982)

Não obstante, variedades com texturas do endosperma farinhoso também podem oferecer maltes com adequados parâmetros de qualidade. Bekele et al. (2012) reportaram que as variedades com texturas intermediária ofereceram maltes com adequados extratos em água quente. Por exemplo, às 144 h, a cultivar *Gambella 1107*, alcançou um dos mais altos extratos (82,89%). Contudo, embora a *Red-Swazi*, de textura farinhosa, tenha alcançado o mais baixo *HWE* (66,5%), obteve um *DP* (31,39 °L) similar ao da *Gambella 1107* (30,56 °L), de textura intermediária.

A textura do endosperma e as suas atividades enzimáticas intrínsecas desempenham papéis dominantes na velocidade de hidratação do endosperma e modificação durante a imersão e germinação (CHIREMBA et al., 2013) e, portanto, na qualidade do malte. A textura do endosperma está relacionada com a absorção de água. O endosperma córneo tem baixo poder de hidratação e é inacessível às enzimas hidrolíticas (PSOTA et al., 2007). Neste sentido, Beta et al. (2000) reportaram que, às 24 h de imersão, a cultivar de sorgo *Chirimaugute*, com textura

do endosperma relativamente branda, em relação às demais, teve maior absorção de umidade (41,5%) do que a cultivar *SV2* e a cultivar *DC-75*, 36,2% e 39,6%, respectivamente. No entanto, a cultivar *DC-75*, com textura córnea, absorveu menos água e teve o maior *DP*, 46,9 *SDU g*⁻¹. Isto pode ser devido ao tempo de imersão assinalado foi suficiente para a absorção de água, fazendo com que as enzimas amilolíticas atuem adequadamente. A imersão não apenas causa uma germinação ótima; igualmente causa a hidratação ideal do endosperma amiláceo, facilitando assim, a formação de enzimas e transformações metabólicas de suas reservas alimentares (PALMER; ETOKAKPAN; IGYOR, 1989).

2.5.5 Teor de proteínas

Se reporta como aceitável para a proteólise efetiva durante a maltagem de sorgo que o teor de proteína do grão esteja entre 8 e 11% (PALMER, 1989). Devido a que o teor de proteínas dos grãos deve ser convertido em aminoácidos e peptídeos pequenos (denotado como nitrogênio assimilável), antes de que possa ser utilizado pelas leveduras para o seu crescimento, o *FAN* é um importante índice de qualidade do malte na produção de cerveja (KNATCHBULL; SLAUGHTER, 1987; EZEUGU; OKOLO, 1996). Como o peso de 1000 grãos, a energia de germinação e a textura de endosperma, o teor de proteínas depende da variedade do grão. Das 10 variedades avaliadas por Nnamchi et al. (2014), as variedades *SK 5912* e *KSV 8* tiveram os maiores níveis de proteínas, 10,0 e 9,9%, respectivamente; as quais apresentaram os maiores valores de *FAN*, 185,0 e 170,0 mg/L, respectivamente.

Já Bekele et al. (2012) reportaram que foram obtidos os maiores valores de teor de proteína e de *FAN* nas variedades *Red-Swazi* e *76 T1#23*, os quais foram de 11,45% e 303,16 mg/L e de 11,87% e 343,29 mg/L, respectivamente. Os resultados devem-se também à forma que o *FAN* foi determinado a partir dos maltes inteiros, ou seja, incluindo as raízes e os brotos secos, que são ricos em *FAN*.

Além dos materiais não amiláceos da parede celular do endosperma tais como os pentosanas e β -glucanos, e a sacarificação incompleta do amido decorrente da limitada atividade β -amilase do malte de sorgo, a viscosidade do mosto é influenciada também pelas proteínas (HOFFMANN; MUETZEL; BECKER, 2002; DYKES; ROONEY, 2006).

Abuajah et al. (2016b) reportaram que o efeito da variedade sobre a viscosidade do mosto do malte foi significativo. No quinto dia de germinação, a cultivar *ICSV400*, com menor teor de proteínas, foi o que ofereceu a menor viscosidade; no entanto, o mosto da cultivar *KSV8* foi mais viscoso do que o da *SK5912*, com um teor de proteína um pouco menor do que esse, 10,19 e 10,94%, respectivamente. Isto pode ser devido à atividade β -glucanase que foi maior na *ICSV400* (16,87%), enquanto foi mais elevada na *SK5912* (16,15%) do que no *KSV8* (14,42%).

2.5.6 Teor de amido

Costumam-se preferir grãos para a maltagem com maiores taxas de germinação, tamanhos, pesos hectolitro, e nível adequado de proteína, entre outras qualidades (NNAMCHI; OKOLO; MONEKE, 2014). Uma dessas qualidades é o teor de amido, o qual é relacionado com o tamanho ou peso dos grãos, como assinalado anteriormente.

As 10 cultivares de sorgo estudados por Nnamchi (2014) tiveram um teor de carboidratos adequado (65 – 70%). Similar composição, foi reportada por (BARIKMO; OUATTARA; OSHAUG, 2004). Grãos inteiros de cevada contêm entre 65 – 68% de amido (GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010).

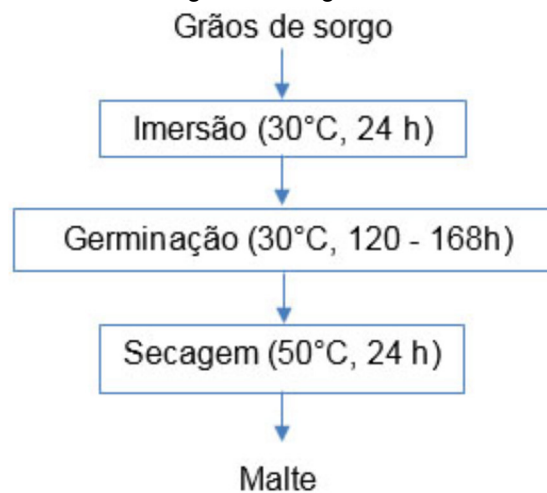
Segundo Taylor (1984), no endosperma córneo, as não-kafirinas (albuminas, globulinas, gluteninas) formam-se em torno dos corpos de proteínas, "colando" os corpos em uma matriz que envolve os grânulos de amido. Essa matriz proteica parece agir como uma barreira à gelatinização do amido e digestibilidade do amido (EZEUGU et al., 2008) devido à ligação cruzada entre γ - e β -kafirinas e a matriz proteica. Wong et al. (2009) assinalaram que o amido é mais facilmente digerido em sorgos cerosos do que nos tipos não cerosos.

2.6 Processo de maltagem

No processo da maltagem, os grãos atingem as características enzimáticas necessárias para as etapas posteriores do processo de produção de cerveja, garantindo a qualidade do processo em geral. Agu e Palmer (1996) destacaram que o objetivo principal do processo de maltagem é a formação de enzimas hidrolíticas as quais clivam os compostos principais, amido e proteínas, para

proporcionar açúcares fermentáveis, aminoácidos e nitrogênio amino livre. As três etapas que envolvem este processo, assinaladas por Dewar et al. (1997a), assim como as melhores condições na maltagem de sorgo, revisadas por Rodríguez, Aguilar e Almeida-Silva (2018), são mostradas na Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma do processo de maltagem de sorgo



Fonte: (RODRÍGUEZ; AGUILAR; ALMEIDA-E-SILVA, 2018)

2.6.1 Imersão

Na imersão, uma etapa preparatória para a germinação, deve ser obtida a máxima hidratação dos grãos para iniciar as modificações do endosperma (AGU; PALMER, 1998). Tanto na imersão dos grãos de sorgo quanto na imersão nos grãos de cevada tem sido mostrado a eficácia do tratamento com álcalis diluídos porque melhoram a qualidade geral do malte ao aumentar a absorção de água, melhorando a modificação do revestimento da semente e promovendo a síntese e atividade das enzimas hidrolíticas (DEWAR; TAYLOR; BERJAK, 1997a; EZEUGU; OKOLO, 1999). O licor alcalino tem a capacidade de influenciar nas propriedades da ligação proteínas-taninos/polifenóis que variam em composição e distribuição de acordo com a variedade. Os taninos e polifenóis podem se ligar a proteínas, incluindo enzimas, e, portanto, é provável que inativem as enzimas envolvidas na hidrólise de materiais do endosperma (CHAVAN et al., 1979; CHAVAN; KADAM; SALUNKHE, 1981).

Além disso, esse tratamento evita a contaminação de microrganismos provocada pela umidade que é necessário alcançar, tanto na etapa de imersão

quanto na de germinação. De fato, tem sido reportada a presença de aflatoxinas e micotoxinas produzidas, em pequenas quantidades, por fungos do gênero *Aspergillus* no malte de sorgo (MATUMBA et al., 2011). Lefyedi e Taylor (2006) conseguiram reduzir com 0,2% de NaOH a população microbiana nas duas cultivares de sorgo vermelho. A redução foi de até $1,0 \times 10^3$ UFC g⁻¹ (bactérias aeróbias), $1,6 \times 10^3$ (bactérias ácido-láticas), $7,9 \times 10^2$ (leveduras), $2,0 \times 10^3$ (fungos) e $1,6 \times 10^3$ (coliformes) na cultivar *NK 283*. Já foi de até $2,0 \times 10^3$ UFC g⁻¹ (contagem total em lacas), $2,0 \times 10^2$ (bactérias ácido-láticas), $5,0 \times 10^2$ (leveduras), $4,0 \times 10^2$ (fungos) e $2,0 \times 10^2$ (coliformes) na cultivar *PAN 8546*. A combinação de ambos os métodos, químico e biológico, é uma boa opção para reduzir tal contaminação. Todos os tratamentos bio-controle (com e sem areação, com ou sem *Bacillus subtilis*-S499, combinado ou não com 0,2% de NaOH testados por Bwanganga et al. (2012), reduziram a contagem inicial de fungos ($4,85$ UFC g⁻¹), nos grãos de sorgo, para abaixo do limite, $3,0$ UFC g⁻¹.

Tem sido reportado graus de imersão (porcentagem de absorção de água) do sorgo entre 33 e 36% (AGU; PALMER, 1998); entre 35 e 40% (AISIEU; GOSH, 1978), como revisado por Morrall et al. (1986b), e de 41% (HASSANI; ZARNKOW; BECKER, 2014). Estes valores são mais baixos do que os reportados para a cevada (44 – 46%), mostrando que é mais limitada a permeabilidade do pericarpo e o potencial de hidratação do endosperma do sorgo do que da cevada (AGU; PALMER, 1998).

Na imersão, outro tratamento eficaz é o método de repouso no ar (*AR*). Nesse período, os grãos ficam expostos ao ar por um tempo predeterminado, antes de preencher novamente o recipiente com água fresca (DEWAR; TAYLOR; BERJAK, 1997a). Ezeogu e Okolo (1995) assinalaram que o método de *AR* por 3 h melhora a qualidade do malte de sorgo, em termos de atividade β -amilase; possivelmente, devido ao método que fornece mais oxigênio, há uma maior atividade metabólica nas plântulas. Além disso, os autores notaram que essa técnica pode reduzir as altas perdas da maltagem devido à redução dos comprimentos das radículas e brotos.

2.6.2 Germinação

A germinação é uma etapa essencial porque contribui para o desenvolvimento das enzimas hidrolíticas, na qual ocorre a modificação do malte.

Palmer et al. (1989) apontaram que o broto das radículas é um indicador do desenvolvimento desta etapa. Se alcançada uma modificação enzimática suficiente dos substratos do endosperma, resultará em ótimos níveis de extratos (AGU; PALMER, 1998).

As principais enzimas hidrolíticas desenvolvidas na maltagem são: α -amilase, β -amilase, dextrinase limite, α -glicosidase, endo- β -glucanase e as enzimas proteolíticas.

Como revisado por Uryyo e Eigel (1999), a degradação de β -glucano ocorre após a liberação das paredes celulares do endosperma pela carboxipeptidase no início da germinação. O β -glucano dissolvido é degradado pela endo-(1,3)-glucanase para dar um produto que pode ser atacado pela endo-(1,3)(1,4)- β -D-glucanase e a endo- β -(1,4)-glucanase. Os produtos são celobiose, laminaribiose e 3-O-D-celobiosil-D-glicose. Finalmente, esses produtos serão degradados a glicose por β -glicosidases, celobiasas e laminaribiasas. Aisien e Palmer (1983), afirmaram que o malte de sorgo é deficiente em enzima endo- β -glucanase, responsável por degradar a parede celular.

As enzimas proteolíticas (ou proteases) catalisam a hidrólise de grandes moléculas de proteínas, hidrolisando ligações peptídicas, liberando pequenos fragmentos de proteínas ou aminoácidos livres como produtos (OGBONNA, 2009). Por exemplo, as carboxipeptidases e proteinases são importantes na mobilização de proteínas durante a germinação de grãos. A formação de peptidase requer oxigênio adequado e é afetada na presença de excesso de dióxido de carbono (TAYLOR; BOYD, 1986). As carboxipeptidases hidrolisam especificamente as proteínas solubilizadas para liberar *FAN* essencial para as funções anabólicas da plântula germinativa, e como nutriente no mosto para o metabolismo das leveduras na fermentação (ENARI; SOPANEN, 1986).

Conforme Brosnan et al. (1992), a α -amilase catalisa a hidrólise aleatória das ligações glicosídicas α (1,4) internas, liberando pequenos oligossacarídeos e glicose. Já a β -amilase atua na penúltima ligação glicosídica α (1,4), na extremidade não redutora, liberando maltose (MA et al., 2000). Durante a maltagem uma significativa quantidade de α -amilase é produzida nos embriões do sorgo enquanto a β -amilase é ativada a partir de formas latentes no endosperma amiláceo (PALMER, 1989).

Segundo Owuama (1999), um dos requerimentos para a formação de α -amilase é o oxigênio. A atividade β -amilase constitui entre 27 e 49% da atividade diastática no malte sorgo (EZEUGU; OKOLO, 1995). A β -amilase é a principal enzima de sacarificação do malte cervejeiro (NORRIS; LEWIS, 1965). Ambas as enzimas, α e β -amilase, não hidrolisam as ligações α (1,6), mas a dextrinase limite realiza essa função (MANNERS et al., 1970). Outra enzima que catalisa a hidrólise das ligações α (1,4) é a α -glicosidase, liberando glicose a partir das ligações terminais não redutoras (TAYLOR; DEWAR, 1994). As atividades da α - e β -amilase, dextrinase limite, e α -glicosidase resultam na produção de uma mistura de dextrinas de baixo peso molecular (DUNN, 1974).

2.6.3 Secagem

A secagem do malte é a etapa que se realiza até alcançar o mínimo permitido de umidade. Lyumugabe et al. (2012) disseram que esta etapa também tem como alvo interromper o crescimento do embrião e a atividade enzimática, e minimiza a desnaturação das enzimas. Além disso, o processo desenvolve atributos como o sabor e a cor.

A secagem pode se realizar de diferentes formas. No processo de produção das cervejas de sorgo tradicionais africanas, os grãos são secos ao sol e armazenados sob a proteção durante a noite para evitar a re-hidratação; esta etapa leva de dois até três dias (LYUMUGABE et al., 2012). Contrariamente, a secagem pode se realizar em estufas, a temperaturas fixas ou a duas temperaturas diferentes. Por exemplo, Owuama e Asheno (1994) reportaram que quando a secagem é feita inicialmente a 55 °C e, logo, a 65 °C ocorre uma redução considerável da umidade com produção de um bom malte comparado com a secagem feita a uma única temperatura de 65 °C. Assim, a combinação destes tratamentos na etapa fornece maltes com melhores características, tais como umidade, atividade enzimática, conteúdo de açúcar e compostos voláteis.

Por outro lado, há trabalhos realizados com temperatura de 40 °C por 48 h (BWANGANGA; BÉRA; THONART, 2012). Não obstante, existem muito mais autores que defendem a secagem do malte a 50 °C por 24 h (NOVELLIE, 1962b; DEWAR; TAYLOR; BERJAK, 1997b; BEKELE; BULTOSA; BELETE, 2012; LYUMUGABE et al., 2014).

2.6.4 Parâmetros de qualidade do malte

2.6.4.1 Perdas da maltagem

As perdas da maltagem são aquelas registradas como resultado de processos metabólicos associados à germinação dos grãos, que se manifestam pelo crescimento e desenvolvimento das raízes e gêmulas (AISIEN; MUTS, 1987). A faixa de perda entre 10% e 15% é aceitável na maltagem de sorgo (NOVELLIE, 1962a). Geralmente, as perdas estão em proporção direta com o tempo de germinação e são maiores nos últimos dias de germinação (BEKELE; BULTOSA; BELETE, 2012; NNAMCHI; OKOLO; MONEKE, 2014). As altas perdas dos grãos de sorgo são atribuídas à temperatura de maltagem predominante nos cenários tropicais (30 °C), a qual é adequada para a germinação desse cereal (AGU; PALMER, 1998; OGU et al., 2006). As *MWL*, assim como outros parâmetros de qualidade, são influenciados pela variedade de sorgo. Bekele et al. (2012) estudaram seis cultivares, com 144 h (seis dias) de germinação, e a perda mais alta (27,56%) foi verificada com a cultivar *Meko*, e a perda mais baixa (19,91%), com a cultivar *Teshale*. Igualmente, Nnamchi et al. (2014) reportaram que, das 10 cultivares avaliadas, a maior perda (37,74%) ocorreu com a cultivar *White Kaura* e a menor (13,77%), com a cultivar *Boboje*. Na maltagem, minimizar as perdas e conseguir a modificação necessária dos grãos são metas essenciais para o bom desenvolvimento do processo.

2.6.4.2 Poder diastático

Conforme Novellie (1959), o poder diastático é a capacidade de ambas as enzimas, α e β -amilase, de hidrolisar o amido em açúcares menores, e indica o grau de conversão do amido em açúcares fermentáveis que podem ser extraídos a partir do malte. Graus Lintner (°L) e unidades diastáticas de sorgo (*SDU*), unidades usadas para expressar o *DP*, são definidas como a quantidade de atividade enzimática, sob condições determinadas, em dependência do método usado. O autor acrescentou que um grau Lintner é equivalente à metade de um *SDU g⁻¹*. É recomendado que o *DP* do sorgo esteja entre 60 e 80 *SDU g⁻¹* (30 e 40 °L) (NOVELLIE, 1962c), e que seja de 80 °L para a cevada (PALMER; ETOKAKPAN; IGYOR, 1989).

O *DP* é um dos parâmetros de qualidade mais importantes na avaliação do malte de sorgo. O malte de sorgo tem baixo *DP*, quando comparado ao *DP* do malte de cevada. O uso de compostos químicos, em baixa concentração na imersão, tais como álcalis, pode melhorar o poder diastático. Por exemplo, é recomendado o uso de até 0,3% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, KOH ou NaOH (DEWAR; TAYLOR; BERJAK, 1997a). Por outro lado, Lefyedi e Taylor (2006) reportaram que, além de aumentar o *DP*, a imersão dos grãos em 0,2% de NaOH é um método recomendado para o controle da contaminação bacteriana e fúngica, durante a maltagem, como explicado anteriormente. O poder diastático é influenciado pela temperatura e pela quantidade de água absorvida durante a imersão. Ebbah et al. (2015) reportaram que, a temperatura de 40 °C, quando comparada com 30 e 35 °C, na imersão, durante 16 h, até absorver a quantidade de água necessária (40%) pelo cultivar Kadaga, contribuiu para o alto *DP* (88,1 SDU g^{-1}), devido ao fato de se ter criado um ambiente propício para o desenvolvimento das enzimas. Diversamente, Dewar, Taylor e Berjack (1997a) reportaram que a cultivar *Bernard Red* alcançou o máximo *DP* (42,60 SDU g^{-1}) quando a imersão foi realizada a 30 °C em vez de a 20 e 25 °C, atingindo um grau de imersão de 35,9% em 40 h. Além disso, o tempo de germinação e a variedade também influenciam o *DP*. Geralmente, o *DP* aumenta com o aumento do tempo de germinação em até 120 h (DJAMEH et al., 2015; ABUAJAH et al., 2016a). Bekele et al. (2012) chegaram a um tempo de germinação ótimo de 96 h para obter alto *DP*, nas cultivares estudadas. Nesse tempo, obtiveram valores entre 23,91 °L e 31,39 °L para as cultivares *76T1#23* e *Gambella 1107*, respectivamente. Ogu et al. (2006) obtiveram, com um tempo de germinação maior (120 h), com a cultivar *KSV 4*, o maior valor de *DP* (30 °L), similar ao obtido por Bekele et al. (2012).

2.6.4.3 Extrato em água fria

Conforme Ezeogu e Okolo (1999), o extrato em água fria é um dos indicadores úteis da modificação do malte e representa os produtos solúveis da hidrólise enzimática durante o processo de maltagem. Estes produtos são açúcares disponíveis e aminoácidos localizados no endosperma. Acrescentaram que o valor de *CWE* do malte bem modificado é cerca de 20%. O *CWE* também mostra uma tendência de aumentar com o aumento do tempo de germinação entre 96 h e 168 h (PATHIRANA; SIVAYOGASUNDARAM; JAYATISSA, 1983) e pode ser

melhorado com um tratamento alcalino durante a imersão (OKOLO; EZEUGU, 1996). O *CWE*, assim como as *MWL* e o *DP*, também é influenciado pela cultivar. Nnamchi et al. (2014) estudaram a maltagem, realizada com 24 h de imersão, 96 h de germinação e 24 h de secagem a 48 °C, de 10 cultivares de sorgo, e os valores de *CWE* variaram entre 14,80% e 22,50% nas cultivares *ICSV III* e *SK 5912*, respectivamente. Mas, em um estudo anterior feito por Ogu et al. (2006), com 40 h de imersão, com um período de quatro horas de *AR*, 120 h de germinação e 16 h de secagem a 50 °C, foram alcançados valores mais altos, de 31% para a cultivar *KSV 8* e de 36% para as restantes cultivares (*SK5912*, *KSV 4* e *ICSV 400*). Além das características próprias dos grãos, as quais podem ter uma importante influência, isso pode ser devido às condições de maltagem usadas pelos autores citados. Assim, maiores tempos de imersão, com períodos de *AR*, e de germinação podem aumentar os valores de *CWE*. Igualmente, Pathirana et al. (1983), entre 48 h e 144 h de germinação, obtiveram valores superiores de *CWE* com 18 h (21% a 32%) e com 32 h (21% a 31%) de imersão, quando comparados com os *CWE* obtidos com 8 h (17% a 28%). Do mesmo modo, esses estudos mostram que tempos de imersão, entre 24 h e 40 h, com períodos de *AR* e tempos de germinação entre 120 h e 168 h, são recomendados para a maltagem de sorgo, em termos de *CWE*.

2.6.4.4 Extrato em água quente

O extrato em água quente é uma medida da quantidade de materiais solúveis lixiviados em água sob condições de mosturação a 65 °C (AGU; PALMER, 1998) e é composto, principalmente, por açúcares fermentáveis (61 - 65%) (KUMAR et al., 2013). O valor mínimo recomendado de *HWE* é de 80%, em peso seco (AALBERS; VAN.EERDE, 1986). Bekele et al. (2012) assinalaram que *HWE* é um dos mais importantes parâmetros de qualidade do malte. Altos níveis de maltose podem ser obtidos a partir do *HWE* do malte de sorgo. Pathirana et al. (1983) obtiveram, a partir do cultivar amarelo (*IS 2941*), 89,3% de maltose com 18 h de imersão e 144 h de germinação. No estudo posterior, feito por Okoli et al. (2010), encontraram que a maltose constituiu o principal açúcar fermentável (74% a 80% do total) nas cultivares avaliadas, entre 120 h e 144 h de germinação. O *HWE*, assim como o *DP*, também mostra uma tendência de aumentar com o incremento do tempo de germinação de 144 h às 168 h (HASSANI; ZARNKOW; BECKER, 2014).

Independentemente do tipo de cultivar, geralmente, o *HWE* aumenta com o aumento do tempo de germinação; contudo, podem ser obtidos valores diferentes de *HWE* em função da cultivar, mostrando, mais uma vez, a influência desta na qualidade do malte. Por exemplo, com 144 h de germinação, Bekele et al. (2012) obtiveram o maior teor de *HWE* (85,08%) com a cultivar *Meko*, seguida pelo *Teshale* (83,4%), enquanto o valor mais baixo (66,5%) foi observado no *Red-Swazi*. Bekele et al. (2012) reportaram um período de maltagem ótimo de 96 h devido ao fato de que o *HWE* mostrou pouco incremento, depois desse período. Altos valores de *HWE* podem ser obtidos com o incremento do tempo de imersão, além de períodos de *AR* e água morna, ao final da etapa. Foram obtidos 310,70 e 303,50 °L/kg para as cultivares *ICSV 400* e *KSV 8*, respectivamente (EZEUGU; OKOLO, 1995). No caso do malte de sorgo, para obter altos teores de *HWE*, o método de decantação é mais efetivo do que o método de infusão, usado para o malte de cevada.

2.6.4.5 Atenuação limite

A atenuação limite representa a quantidade de açúcares fermentáveis (geralmente glicose, maltose e maltotriose) presente no mosto preparado a partir do malte. O princípio é que esses açúcares fermentáveis são consumidos pelas leveduras (na fermentação), resultando na produção de CO₂ e etanol (EBBAH et al., 2015). Portanto, tanto o *HWE* como a atenuação limite dependem diretamente das enzimas amilolíticas. São recomendados valores de atenuação limite entre 81% e 86% (ZARNKOW et al., 2007). Odibo et al. (2002) obtiveram, com uma temperatura de imersão de 30 °C, melhores resultados de atenuação limite, 78% e 82%, para as duas cultivares nigerianas de sorgo, *SK 5912* e *Fara fara*, respectivamente, se comparados com a faixa de atenuação limite (71,43% a 78,95%) obtida por Ebbah et al. (2015) com a cultivar *Kadaga*, com 30 °C e 40 °C na imersão, respectivamente. Isto se deve a uma quantidade maior de açúcares fermentáveis presentes nas cultivares *SK 5912* e *Fara fara* do que na *Kadaga*. Além disso, se o mosto contém altas concentrações de maltotriose (parcialmente fermentável por algumas cepas de leveduras e dextrinas), resultará em uma atenuação limite inferior. Djameh et al. (2015) reportaram que a atenuação limite da cultivar *Chireh* foi significativamente influenciada pelo tempo de imersão. A atenuação limite aumentou de 74,24% até 78,68% entre 12 h e 22 h de imersão,

mas decresceu ligeiramente de 78,21% para 77,23%, com o incremento da temperatura de secagem de 30 °C até 40 °C, ficando praticamente constante entre 40 °C e 50 °C. O maior valor foi atingido com 22 h de imersão e 120 h de germinação.

Tem sido descrito que o nível de extrato está correlacionado com o limite de atenuação aparente (fermentabilidade) (INGLEDEW, 2012). Segundo Kumar, Singh e Rao (2005), a fermentabilidade depende de vários fatores, incluindo as enzimas do malte, *FAN* e vitaminas e minerais presentes no malte. Taylor e Arendt (2016) reportaram que o nível de extrato teve uma correlação positiva com o limite de atenuação ($r = 0,699$, $p < 0,01$) e uma correlação negativa com o nitrogênio da cevada ($r = -0,768$, $p < 0,01$).

2.6.4.6 Nitrogênio amino livre

Conforme Knatchbull e Slaughter (1987), o nitrogênio amino livre do mosto representa a maior fonte de nitrogênio assimilável pelas leveduras, na produção de cerveja. Há relatos de que os níveis necessários são entre 100 e 150 mg/L, para manter satisfatórios o crescimento das leveduras e a fermentação (PIERCE, 1987). Assim como o *DP* e o *HWE*, o *FAN* é influenciado pelo tempo de germinação e pela cultivar. Bekele et al. (2012) reportaram que o aumento do tempo de germinação resultou em um consistente incremento nos valores de *FAN* nas seis cultivares estudadas. Com 144 h, foi obtido o mínimo valor (232,73 mg/L) do *FAN* com a cultivar *Teshale* e o máximo valor (343,29 mg/L) com a cultivar 76T1#23.

Evans e Taylor (1990a) também reportaram o incremento da atividade proteolítica do malte de sorgo com o incremento do tempo de germinação. Os valores reportados por Bekele et al. (2012) são marcadamente superiores àqueles considerados ótimos para a fermentação, devido ao fato de que os valores do *FAN* foram determinados a partir dos maltes inteiros, ou seja, incluindo as raízes secas, as quais são ricas em *FAN*.

Sob as mesmas condições de maltagem, foram obtidos por Nnamchi et al. (2014) diferentes valores de *FAN* com a cultivar *SK 5912* (185 mg/L) e com a cultivar *Nafelen* (109 mg/L). Várias razões podem explicar essas diferenças, tais como condições de cultivo e ambientais, e composição dos grãos. Esse fato demonstra que a cultivar tem um papel chave nos parâmetros de qualidade do malte de sorgo.

Djameh et al. (2015) reportaram que, como no *DP*, o tempo de germinação foi o fator dominante que influenciou no *FAN*, aumentando desde 232,78 a 291,00 g/100 g entre 3 a 5 dias. Isso pode ser devido a que ambos os parâmetros dependem das respostas enzimáticas, da atividade α - e da β -amilase, e da atividade proteolítica, as quais fornecem compostos solúveis simples a partir de compostos insolúveis complexos, como explicado anteriormente.

2.7 Mosturação

Os objetivos da mosturação, pela ação das enzimas hidrolíticas, são de formar e de extrair, em solução, açúcares fermentáveis, aminoácidos, vitaminas etc., a partir do malte. Dentre as principais enzimas, desenvolvidas na maltagem, envolvidas na hidrólise do amido e das proteínas estão as α e β -amilase, dextrinase limite, α -glicosidase, e as enzimas proteolíticas. Segundo Aisien e Palmer (1983), a insuficiência da endo- β -glucanase no malte de sorgo representa um problema sério para a filtração do mosto. Izydorczyk e Dexter (2008) relataram que os polissacarídeos da parede celular que não são hidrolisados podem conduzir à formação de espuma devido à alta viscosidade que eles causam. Estes problemas proporcionam como resultado custos elevados e longos procedimentos nos processos industriais. Lyumugabe et al. (2012) propõem uma solução para este tipo de problema, com a adição de enzimas exógenas.

Como revisado por Lyumugabe (2012), o mosto de sorgo tem uma composição diferente quando comparado ao da cevada, em termos de açúcares fermentáveis. Estudos têm mostrado que o mosto de cevada contém mais maltose do que glicose (DUFOR; MÉLOTTE, 1992). A diferença observada tem sido atribuída ao baixo nível de β -amilase no malte de sorgo (PALMER, 1989). Têm sido atribuído o alto nível de glicose no mosto do malte de sorgo à atividade catalítica da α -glicosidase, hidrolisando a maltose em glicose (TAYLOR; DEWAR, 1994); isso foi confirmado por outras pesquisas, nas quais tem sido assinalado que, no malte cevada, o nível da α -glicosidase é geralmente mais baixo que no malte de sorgo (AGU; PALMER, 1997c).

A eficiência da mosturação depende, principalmente, das atividades das enzimas proteases e amilases. A Tabela 4 apresenta valores ótimos de pH e de temperatura para cada uma destas enzimas. A mosturação pode ser feita por infusão ou por decantação (HOUGH; BRIGGS; STEVENS, 1971). Um estudo feito

por Ndubisi et al. (2016) sobre a mosturação por infusão (temperatura constante de 65 °C) de uma variedade amarela de sorgo resultou em baixos valores de HWE (100 °L/kg) para a mosturação sem suplementação de enzimas. Já com enzimas comerciais, tanto a 65 °C como a 85 °C, os valores de HWE melhoraram, indicando a temperatura de 65 °C como a mais adequada para o HWE, 300 °L/kg. Alternativamente, para atingir o mesmo objetivo, a mosturação pode ser feita a 85°C sem a adição de enzimas comerciais, para reduzir custos. A mosturação por decantação (decoção) é amplamente aplicada na África (LYUMUGABE et al., 2015).

Tabela 4 - Parâmetros ótimos das principais enzimas envolvidas na hidrólise do amido e das proteínas.

Enzima	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referência
α-amilase	5,0	70	(EL-NOUR; YAGOUB)
β-amilase	5,5	50	
Dextrinase limite	5,0 – 5,4	60	(HARDIE; MANNERS; YELLOWLEES, 1976)
α-glicosidase	3,75 – 4,0	60	(TAYLOR; DEWAR, 1994)
Enzimas proteolíticas (proteases)	5,6 – 6,0	50	(OGBONNA, 2009)

Fonte: (RODRÍGUEZ; AGUILAR; ALMEIDA-E-SILVA, 2018)

A decantação, usada por Agu e Palmer (2013), consistiu na obtenção do extrato a 30 °C por 30 min, decantação do extrato enzimático, fervura do extrato residual até 100 °C, para gelatinizar o amido, e, quando frio, mistura de ambos os mostos para realizar a mosturação a 65 °C por 1 h. Com esse método, os autores atingiram um valor de HWE do malte de sorgo (327 °L/kg) superior ao valor de HWE do malte de cevada (323 °L/kg), quando foi usado o método de infusão (65 °C por 1 h). Por outro lado, a mosturação por decantação produz mostos com maior quantidade de açúcares fermentáveis, quando comparada à mosturação por infusão. Por exemplo, Archibong et al. (2015) estudaram ambos os métodos, usando enzimas a partir de *Aspergillus sydowii*, com duas variedades de sorgo. Quando usado o método de infusão, as concentrações de glicose, maltose, maltotriose e dextrina foram 26,41; 13,33; 8,24 e 9,26 mg/mL com enzimas e 25,91; 12,7; 4,72 e 11,55 mg/mL sem enzimas, respectivamente, para o cultivar SK5912. Já os resultados foram inferiores no mosto do cultivar CSR01, em que as concentrações de glicose, maltose, maltotriose e dextrinas foram 19,59; 3,7, 4,07 e 4,33 mg/mL com enzimas e 15,18; 3,65; 3,91 e 5 mg/mL sem enzimas,

respectivamente. No entanto, quando feita a mosturação por decantação, os resultados foram melhores. Para o cultivar *SK5912*, as concentrações de glicose, maltose, maltotriose e dextrina foram 37,71; 25,77; 17,48 e 9,33 mg/mL com enzimas e 21,27; 10,91; 8,8 e 14,45 mg/mL sem enzimas, respectivamente. Já para o cultivar *CSR01*, os valores foram 31,06; 15,57; 8,28 e 4,32 mg/mL com enzimas e 23,16; 12,38; 8,19 e 4,35 mg/mL sem enzimas. Como observado na maltagem, a cultivar de sorgo também influencia na etapa de mosturação. As diferenças observadas por esses autores nos açúcares fermentáveis podem ser decorrentes do nível de enzimas hidrolíticas de cada variedade. Deste modo, quando se trabalha com malte de sorgo, a mosturação por decantação é mais adequada do que a mosturação por infusão, constituído assim um método de otimização.

2.8 Fermentação

Sob condições normais de fermentação, as leveduras utilizam a via glicolítica para converter a glicose em piruvato para produzir adenosina trifosfato (*ATP*) para as células. Durante este processo, a nicotinamida adenina dinucleotídeo, estado oxidado (*NAD⁺*) é reduzido a nicotinamida adenina dinucleotídeo, estado reduzido (*NADH*) quando o gliceraldeído-3-fosfato é oxidado a 1,3-bisfosfoglicerato. Esta produção de *NADH* cria um desequilíbrio no estado redox da célula, o que pode paralisar a glicólise, e subseqüentemente, o crescimento devido à incapacidade de gerar *ATP* por meio da fosforilação ao nível de substrato (BRIGGS et al., 2004a). Para superar este desequilíbrio redox, as leveduras são submetidas à fermentação, na qual o piruvato é descarboxilado a acetaldeído, com produção de dióxido de carbono (*CO₂*) que é subseqüentemente reduzido a etanol pela desidrogenase alcoólica com a oxidação simultânea de *NADH* a *NAD⁺*. Isso ajuda a reciclar o *NAD⁺*, permitindo que a glicólise continue estável (GRAHAM; SKURRAY; CAIGER, 1970).

No processo de produção de cerveja, durante a fermentação, a massa específica do mosto decresce, e os açúcares são convertidos, pela ação das leveduras, a *CO₂* e álcool etílico (POPESCU et al., 2013).

Ao contrário da maioria das cervejas Europeias, as cervejas Africanas de sorgo são exemplos típicos de fermentação láctica do mosto, seguida da alcoólica, na qual inicialmente as bactérias ácido lácticas criam um favorável ambiente ácido para a proliferação das leveduras posteriormente (MAOURA; POURQUIE, 2009;

LYUMUGABE et al., 2012). Segundo Lyumugabe (2012), geralmente, as cervejas de sorgo tradicionais Africanas não são claras nem brilhantes, senão opacas com sólidos solúveis suspensos (5 – 7%) e têm uma concentração de ácido láctico de cerca de 0,26%. Suas cores variam de lustre pálido a rosada. Os autores acrescentaram que, normalmente, têm notas de frutas.

2.9 Maturação

Segundo Masschelein (1986), na produção de cerveja, as modificações de sabor e aroma estão associadas a uma longa fermentação secundária (maturação) fria e ativa. Assim, a carbonatação pela fermentação de açúcares residuais, a remoção do excesso de levedura por sedimentação, a adsorção na superfície da levedura de vários materiais não voláteis, a redução do potencial de formação de espuma por precipitação dos complexos proteína/polifenol, e as mudanças progressivas no sabor e aroma dependem das transformações associadas à clarificação da cerveja e à lenta remoção de componentes voláteis pela geração e liberação do excesso de dióxido de carbono.

Segundo Haboucha e Masschlein (1976), fatores como a concentração de leveduras e a baixa capacidade de fermentação de maltotriose são frequentemente responsáveis pelos níveis excessivos de açúcares residuais na cerveja. Em termos de utilização de mono, di e trissacarídeos em leveduras comerciais, a inibição catabólica foi considerada complementar à repressão catabólica na explicação da absorção sequencial de maltose em relação à maltotriose. Conforme Masschlein (1986), curiosamente, a diferença das leveduras ale, a grande parte das leveduras *lager* são caracterizadas por uma diminuição variável mas rápida na sua capacidade para fermentar maltotriose. O autor agregou que a maturação de cervejas *lager*, sendo um processo uma etapa que ocorre em baixa temperatura, a contribuição da maturação para o sabor da cerveja será significativamente dependente da duração da etapa, da quantidade de levedura em suspensão e da quantidade de açúcares fermentáveis na cerveja.

2.9.1 Amargor

O amargor é um importante parâmetro de qualidade na produção de cerveja (POPESCU et al., 2013). O sabor amargo da cerveja vem de um grupo de

substâncias que são componentes extraídos do lúpulo durante a fervura do mosto. O lúpulo (*Humulus lupulus*) fornece cervejas com amargor sensorial, estabilidade da espuma, atividade antimicrobiana e estabilidade do sabor. Os componentes principais do lúpulo são óleos essenciais, ácidos de lúpulo e polifenóis. Durante a fervura, os α -ácidos insolúveis são isomerizados em isoácidos mais solúveis, as principais substâncias amargantes da cerveja. Embora os α -ácidos isomerizados sejam os maiores contribuintes, os lúpulos também contêm β -ácidos, que são reivindicados também pelo amargor da cerveja (ARRIETA et al., 2010; CABALLERO; BLANCO; PORRAS, 2012). O envelhecimento da cerveja produz uma redução significativa na intensidade do amargor, bem como uma mudança na qualidade do sabor amargo, levando a um amargor duradouro, persistente e severo (POPESCU et al., 2013).

Conforme Bamforth (2004), durante a etapa de fervura, de fermentação e de filtração, as unidades de amargor podem ser diminuídas pelos seguintes fatores (i) a alta temperatura da fervura; (ii) isomerização incompleta (nem todos os α -ácidos são isomerizados); (iii) na fermentação, a diminuição do pH; também as moléculas de α -ácidos aderem-se às paredes das leveduras, depositando-as no fundo do tanque ou elas podem ser arrastradas com o *trub* frio e perdido durante a etapa de filtração, e (iv) o uso do material de filtro. Por exemplo, Popescu et al. (2013) relataram que as perdas no amargor durante o processo de produção das cervejas *light* Romêneas, feitas com cevada, não passaram dos 25 *EBU*. Valores de amargor similares têm sido reportados (JURIĆ et al., 2015).

2.9.2 Sabor

Segundo Rossi et al. (2014), os álcoois superiores são formados durante a fermentação e contribuem com uma aroma alcoólico ou similar e um paladar quente. Os álcoois superiores prevalentes são o 1-propanol e o 2-metil-1-propanol (isobutanol), que podem causar sabor "áspero", 2-feniletanol que causa sabor "doce", e os álcoois amílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) que causam sabores frutados e adocicados.

Os álcoois superiores atingem concentrações máximas durante a fase coincidente com a parada de crescimento celular e concentração mínima do *FAN*. A formação ocorre a partir de 2-oxoácidos decorrentes do metabolismo dos carboidratos (via anabólica) ou aminoácidos (via catabólica). A concentração final

de álcoois superiores é, portanto, determinada pela eficiência de absorção do aminoácido correspondente e pela taxa de utilização de açúcar (PIRES et al., 2014a). Concentrações de álcoois superiores acima de 100 mg/L podem prejudicar o sabor e a aceitabilidade da cerveja. Ceccaroni et al. (2019) reportaram uma concentração total de álcoois superiores de 251,6 mg/L em uma cerveja sem glúten (feita de arroz); embora o perfil sensorial tenha revelado notas frutadas e solventes, sem sabores desagradáveis.

Os ésteres representam um grande grupo de compostos aromatizantes conferindo à cerveja um aroma frutado. Os ésteres da cerveja podem ser divididos em ésteres de acetatos (acetato de etila e acetato de isoamila) que conferem à cerveja um aroma frutado, banana, e ésteres de ácido graxos (butirato de etila e hexanoato de etila) que dá um aroma de maçã (PIRES et al., 2014a).

Por outro lado, como descrito, alguns tipos de sorgo contêm quantidades substanciais de taninos condensados. Sabe-se que os taninos contribuem com o sabor amargo das cervejas (TAYLOR; DLAMINI; KRUGER, 2013). Além disso, transmitem a sensação de adstringência na cavidade oral, que parece envolver a ligação dos taninos às proteínas salivares ricas em prolina (LEE; ISMAIL; VICKERS, 2012). No entanto, foi demonstrado que os extratos de farelo de todos os tipos de sorgo, incluindo o tipo tan-planta branca, que contêm níveis muito baixos de polifenóis (DYKES; ROONEY, 2007), foram percebidos por serem amargos e adstringentes (KOBUE-LEKALAKE; TAYLOR; DE-KOCK, 2007). Como reportado por Taylor et al. (2013), em geral, os sorgos tanino foram mais amargos e adstringentes; no entanto, uma variedade de sorgo tanino foi similarmente amarga e adstringente a um tipo não-tanino vermelho, apesar de conterem taninos condensados. O lúpulo também é composto por polifenóis. O lúpulo tem um alto teor de polifenóis quando comparado com o malte (FĂRÇAŞ et al., 2013). O teor total de polifenóis em lúpulos usualmente oscila entre 2 e 6% dependendo do cultivar (LIU et al., 2007). Jurić et al. (2015) relataram que o alto teor de polifenóis (140 mg/L) na cerveja *pale lager* foi obtido com o lúpulo em pellets, estando em concordância com os valores padrões (50 – 150 mg/L) para as cervejas *lager*.

3 OBJETIVOS

Geral

Produzir malte de sorgo para a elaboração de uma bebida fermentada, sem glúten, com teor de álcool reduzido, que atinja as características sensoriais adequadas para ter uma boa aceitação pelos consumidores.

Específicos

- I. Estudar a influência da concentração de NaOH, na imersão, e do tempo de imersão e de germinação sobre a qualidade do malte, em termos de poder diastático, extrato em água quente, nitrogênio amino livre e perdas da maltagem;
- II. Estudar o efeito da temperatura das atividades α e β -amilase sobre o extrato em água quente e nitrogênio amino livre, na etapa de mosturação;
- III. Estudar a influência do tempo e da temperatura de fermentação sobre a concentração de etanol, fator de conversão de substrato em produto, produtividade volumétrica, grau real de fermentação, cor, pH e nitrogênio amino livre;
- IV. Avaliar as características sensoriais da bebida fermentada de sorgo;
- V. Produzir a bebida fermentada de sorgo em escala piloto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Grãos de sorgo

Duas cultivares de sorgo, BRS511 e 1G244, foram utilizados neste estudo; os grãos de sorgo foram fornecidos pela empresa "Ceres Sementes" do Brasil e pela empresa Sementes Dow Agrosiences, respectivamente.

O malte de sorgo usado para a produção das cervejas foi o obtido a partir da otimização do processo de maltagem, desenvolvida neste trabalho, que será detalhada adiante.

4.1.2 Água

A água obtida do poço artesiano que abastece a Escola de Engenharia de Lorena (EEL) foi utilizada para preparar o mosto para a fermentação, a qual tem adequados parâmetros de qualidade, de acordo com o SENAI (1997).

4.1.3 Lúpulo

O lúpulo do tipo Zeus, utilizado na fervura do mosto, foi fornecido pela Vallerstein Industrial Ltda de São Paulo.

4.1.4 Levedura

A linhagem da levedura utilizada para a fermentação foi a *Saccharomyces cerevisiae* w-34/70, do tipo *lager*, disponível no mercado (Insumos do Vale, São José dos Campos, SP).

4.2 Análise da qualidade dos grãos de sorgo

Foram realizadas as seguintes análises de qualidade nos grãos: peso de 1000 grãos, energia de germinação, textura do endosperma e teor de proteínas. A determinação do peso de 1000 grãos foi realizada contando manualmente 1000 grãos de sorgo e pesando-os em uma balança analítica (MARCONI) (BAMFORTH, 2002). A energia de germinação foi determinada conforme o método da *EBC* (EBC, 1987); mas, a 30 °C em vez de 20 °C para o melhor desenvolvimento da

germinação do sorgo. Foram tomadas amostras representativas de 100 grãos e colocadas em papéis de filtro umedecidos (com 4 ml de água bidestilada), em placas de Petri fechadas. A porcentagem dos grãos germinados foi contada em intervalos de tempo de 24, 48 e 72 h.

A textura do endosperma foi determinada, visualmente, por disseção longitudinal de 10 grãos em metades; estas foram avaliadas usando a escala de classificação de 1 ao 5. A classificação é determinada comparando os grãos com a foto da Figura 3, como descrito anteriormente por Rooney e Miller (1982). O teor de proteína foi determinado pelo método micro-Kjeldahl mediante a análise de nitrogênio como descrito por AOAC (1995) usando ureia como controle na análise. O teor de proteína foi calculado pela multiplicação do percentagem de nitrogênio da amostra por 6,25.

4.3 Maltagem

A maltagem foi realizada conforme o método empregado por outros autores (MORRALL; BOYD; TAYLOR, 1986b) com algumas modificações. As amostras de grãos foram selecionados manualmente, removendo os grãos quebrados e danificados e materiais estranhos, e foram lavados três vezes com água corrente. As amostras (300 g) foram imersas em solução de NaOH, cujas condições serão descritas adiante no item 5.2.3, por 4 h; após esse tempo, foram lavadas três vezes para remover o residual de NaOH. Os grãos foram imersos em água por tempo determinado, de acordo com cada tratamento. Em todos os tratamentos de imersão foram realizadas 4 h de *AR*.

Os grãos foram germinados, em bandejas metálicas perfuradas, e cobertos com panos para reter a umidade. Os grãos foram borrifados com água destilada, três vezes por dia, e virados ocasionalmente para evitar a junção de raízes e brotos. Ao final de cada tratamento, as amostras foram secadas até atingir 5% de umidade, em uma estufa de ar quente (Nova Ética) a 50 °C por 24 h. O teor de umidade dos grãos foi determinado mediante método gravimétrico por secagem de 1 g de amostra de malte numa balança analítica (DENVER INSTRUMENT IR-30).

As amostras foram moídas até atingirem um aspecto de farinha (0,7 mm) usando moinho de discos (MARCONI). Os maltes secos e moídos foram armazenados em sacos de polietileno herméticos na de 6 a 8 °C.

4.4 Análise de qualidade no processo de maltagem

Foram determinados parâmetros de qualidade, tais como o poder diastático, o extrato em água quente, o nitrogênio amino livre e as perdas da maltagem. O poder diastático foi determinado como descrito nos métodos da *American Society of Brewing Chemists (ASBC)* (ASBC, 2008), em que o extrato enzimático do malte de sorgo, obtido com NaCl, 0,5%, p/v, hidrolisou o amido sob condições controladas. Os açúcares redutores liberados (uma estimativa de *DP*) foram analisados pelo método do ferrocianeto alcalino e titulação com tiosulfato de sódio.

A mosturação foi realizada pelo método de decantação descrito por Agu e Palmer (2013). A farinha (50 g) foi extraída com 360 mL de água destilada em frascos Erlenmeyers de 500 mL a 30 °C por 30 min, após o qual o mosto enzimaticamente ativo foi decantado. O resíduo da mosturação foi então aquecido a 100 °C em um banho de água para gelatinizar o amido do malte. Depois de frio, o sobrenadante decantado foi devolvido ao macerado fervido e o volume foi ajustado a 360 mL, e então macerado em mosturador de bancada (Lochner Labor) a 65 °C por 1 h. Finalmente, o mosto foi centrifugado a 4.150 x g por 20 min. O extrato em água quente foi determinado analisando a amostra obtida após a mosturação do malte usando um picnômetro. Após a conversão à gravidade específica, o HWE foi calculado pelo método 4.6.1 como descrito na *EBC* (EBC, 1987).

O teor de *FAN* foi determinado a partir das amostras de mosto, utilizando um ensaio colorimétrico, de acordo com o método 4.10 da *EBC* (EBC, 1987). Foram colocados em diferentes tubos de ensaio a amostra (2 ml de mostos, diluídos 10^{-2}), a solução padrão (glicina diluída 10^{-2}), e o branco, (água destilada em vez do mosto), e adicionado 1 ml de reagente de cor (teste da ninidrina pH 6,6). As misturas foram colocadas em banho de água em ebulição durante 16 minutos e depois esfriadas a 20 °C por 20 min. Finalmente, foram adicionados 5 ml da solução de diluição e a absorbância medida a 570 nm no espectrofotômetro de UV-visível (Thermo Scientific Serie GENEYIS 10S) contra o branco.

As perdas da maltagem foram determinadas como a porcentagem de perda do peso dos grãos de sorgo na maltagem, ou seja, a diferença entre o peso inicial e final dos grãos; quando as raízes foram removidas dos grãos secos do malte (DEWAR; TAYLOR; BERJAK, 1997b).

4.5 Preparação do mosto

A mosturação foi realizada pelo método de decantação, recomendado para o malte de sorgo (AGU; PALMER, 2013), com algumas modificações para otimizar a etapa.

O malte (50 g) foi misturado com 360 mL de água destilada em diferentes valores de pH e de temperaturas de atividade das proteases (por 30 min), segundo os experimentos preliminares, após o qual o mosto enzimaticamente ativo foi decantado.

Após a gelatinização do amido do malte, quando frio, o sobrenadante foi devolvido ao macerado fervido e o volume foi ajustado a 360 mL. A mosturação continuou por 30, 60 e 30 min, a diferentes temperaturas de atividade da β -amilase, juntamente as α e β -amilases, e a α -amilase, respectivamente. O mosto resultante foi centrifugado a 4.150 x g por 20 min.

4.6 Análises de qualidade na etapa de mosturação

A partir do mosto obtido foram determinados o extrato em água quente e o nitrogênio amino livre. O *HWE* e o *FAN* foram determinados pelos métodos 4.6.1 e 4.10, respectivamente, segundo a *EBC* (EBC, 1987).

4.7 Preparação das bebidas fermentadas

4.7.1 Mosturação

A mosturação foi realizada em painéis de alumínio, de acordo com as condições estabelecidas na otimização. A adição de malte moído (farinha) e água primária foi feita em uma proporção de uma parte de malte para três partes de água. O pH inicial (5,5) foi ajustado pela adição de ácido láctico.

Foi usado o método de decantação. O perfil de tempo e temperatura de atividade de cada enzima foi de 45; 50; 65; 70 e 78 °C por 30; 30; 60; 30 e 10 minutos, respectivamente. No final da etapa de mosturação, a 70 °C, foi realizado o teste com solução de iodo, 0,02 N para verificar a sacarificação do amido do malte.

Após a confirmação da hidrólise do amido, o mosto foi aquecido até 78 °C com o objetivo de inativar as enzimas presentes e ajudar à clarificação do mosto.

4.7.2 Filtração do mosto

Com o objetivo de melhorar a filtração do mosto primário, foi utilizado como auxiliar da filtração palha de arroz. Desta forma, a farinha do malte fica misturada com a camada de palha, e a etapa ocorre normalmente. Essa camada serviu como elemento filtrante e para a lavagem do bagaço do malte de sorgo com água secundária a 80 °C, originando o mosto secundário. O volume de água secundária serviu para a extração dos açúcares residuais retidos no bagaço do malte de sorgo.

4.7.3 Fervura do mosto

O volume do mosto final, junção dos mostos primários e secundários, foi submetido à fervura em uma panela de inox, por uma hora, até atingir a concentração final de açúcares em 6,62 °P de extrato original. No início e no fim da fervura, foi adicionado lúpulo na forma de *pellets*, em proporções de 0,51 e 0,11 g/L, para conferir o amargor e aroma, respectivamente, no mosto acabado.

Após o término da fervura, foi feito, manualmente, o *whirlpool* (redemoinho) com o uso de uma espátula de inox e, aguardado um tempo de aproximadamente um minuto para a formação de aglomerados proteicos (*trub*) no fundo da panela. Esse processo de recirculação do mosto faz com que essas partículas decantem e fiquem no centro da panela; desta forma, é obtido um mosto mais claro. Logo em seguida, o mosto foi transferido para os fermentadores, aguardando a temperatura de fermentação.

4.7.4 Preparação do inóculo

Da cultura estoque da levedura *Saccharomyces cerevisiae* w-34/70, cultivada em tubos de ensaio contendo meio inclinado ágar batata dextrose, foi feita a transferência das células, em condições assépticas, para um tubo de ensaio contendo 10 mL de mosto na concentração de 6,62 °C. O cultivo foi realizado sob agitação em incubadora refrigerada (CIEN TEC) a 200 rpm e em temperatura ambiente (± 30 °C). Em seguida, este volume de meio foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 125 mL, contendo 90 mL de mosto, na mesma concentração, totalizando 100 mL. O cultivo foi feito sob as mesmas condições anteriores, até que a concentração de açúcares abaixasse para 3 °P (aproximadamente 24 h). Este volume de fermento foi transferido para outro frasco com o dobro do volume,

mantendo as mesmas condições de cultivo. O volume final de cultivo foi mantido na geladeira para a decantação das células e concentração das mesmas. Foi retirado o sobrenadante e efetuada a contagem de células. Este inóculo foi então transferido para os fermentadores contendo 5000 mL de mosto na concentração de 6,62 °P de extrato original.

4.7.5 Fermentação

As fermentações foram realizadas em escala de bancada, utilizando frascos Erlenmeyers de 5 L, com uma concentração de 6,62 °P. A concentração celular inicial foi de 10^6 células x °P por ml de mosto, segundo a metodologia descrita por Guldfeldt e Arneborg (1998). O tempo e a temperatura de fermentação variaram de acordo com o planejamento experimental.

4.7.6 Maturação e envase

A maturação foi conduzida a 0 °C, nos mesmos frascos Erlenmeyers onde ocorreu a fermentação; após, realizou-se uma trasfega, e deixou-se até completar o tempo recomendado. Após o período de maturação, a cerveja obtida foi transferida para uma garrafa onde foi adicionada uma solução de sacarose na concentração de 6 g/L para que ocorresse a refermentação na garrafa, para a carbonatação da bebida. As cervejas foram acondicionadas em garrafas de 600 mL na cor âmbar, e esperado um tempo de 15 dias em temperatura ambiente, para que a refermentação fosse finalizada.

4.8 Análise de qualidade na etapa de fermentação

Foram determinados a cor, o pH, e o nitrogênio amino livre das bebidas fermentadas. As análises de cor foram feitas segundo o método 9.6 da *EBC* (EBC, 1987), e foi utilizado um volume de 5 mL de cada cerveja que foram centrifugadas a $4.150 \times g$ por 10 minutos e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-visível (Thermo Scientific Serie GENEYIS 10S) no comprimento de onda 430 nm, em cubetas de 1 cm. O pH das cervejas foi determinado conforme o método 9.35 da *EBC* (EBC, 1987), usando um pHmetro MA-522 (MARCONI). O teor nitrogênio amino livre das cervejas foram medidos de acordo com os métodos 9.10, segundo *EBC* (EBC, 1987).

4.8.1 Parâmetros cinéticos

Durante o processo de fermentação foram retirados 35 mL de amostras (10% do volume total), periodicamente a cada 12 horas. As amostras foram desgaseificadas pela agitação dos tubos durante um minuto. O sobrenadante obtido, após a centrifugação a 4.150 x g por 20 minutos, foi utilizado para quantificar o extrato real (°P), a densidade (g/mL) e o etanol (% v/v) das cervejas em equipamento específico (Alcolyzer Beer ME, Anton Paar, DMA 4500M).

As contagens de células em suspensão, expressa em células/mL, foi realizada em uma câmara de Neubauer (1/400 mm² x 1/10 mm).

A viabilidade celular foi determinada pela método de coloração com azul de metileno, conforme Guldfeldt e Arneborg (1998). Foram misturados iguais volumes da suspensão de células e da solução de azul de metileno (contendo por litro: 0,1 g de azul de metileno e 20 g de acetato de sódio). A porcentagem de células não coradas foi registrada como a viabilidade celular.

Estas análises foram usadas para a avaliação do fator de conversão de substrato em produto, produtividade volumétrica e grau real de fermentação, expressos em g/g, g/L.h e %, respectivamente, das fermentações, calculados a partir das equações seguintes, de acordo a Borzani (1986):

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (1)$$

$$Q_p = \frac{P - P_0}{t - t_0} \quad (2)$$

$$RDF = \frac{2,0665 \times Etanol_{(m/m)}}{2,0665 \times Etanol_{(m/m)} + ER_{(m/m)}} \quad (3)$$

Em que:

P_0 e P : concentração de etanol inicial e final (g/L), respectivamente

S_0 e S : concentração de extrato real inicial e final (g/L), respectivamente

t_0 e t : tempo inicial e final (h), respectivamente

ER: extrato real (m/m)

Para os cálculos de rendimento, produtividade e grau real de fermentação, a conversão de unidades das concentrações de extrato real (°P) e do etanol (% v/v) para g/L, foram realizados de acordo com as Equações 4 e 5, usadas por Aizemberg (2015).

$$ER \left(\frac{g}{L} \right) = ER(^{\circ}P) \times densidade \left(\frac{g}{L} \right) \times 10 \quad (4)$$

$$E \left(\frac{g}{L} \right) = Etanol (\%, v/v) \times 0,789 \left(\frac{g}{L} \right) \times 10 \quad (5)$$

Onde: 0,789 g/L é a densidade do etanol a 20 °C.

4.9 Metodologia de otimização

A metodologia de superfície de resposta foi usada para a otimização do processo de maltagem e das etapas de mosturação e de fermentação (Figura 5). Inicialmente, foram realizados experimentos prévios com um único fator (cinco níveis). Em cada ensaio, foi estudada apenas uma primeira variável independente, fixando tanto a segunda variável quanto os fatores do delineamento composto central rotacional.

Os resultados dos estudos prévios, o seja, o valor de cada fator que forneceu as melhores respostas, foram usados no segundo passo da metodologia, a seleção dos níveis das variáveis do delineamento, no qual uma segunda série de experimentos com um único fator (três níveis) foi realizada para determinar o intervalo usado para as três variáveis independentes no processo de maltagem nas etapas de mosturação e de fermentação. Assim, foi desenvolvido o DCCR correspondente para cada otimização, e validado o modelo experimentalmente para a sua aceitabilidade.

4.9.1 Processo de maltagem

No processo de maltagem, os experimentos prévios com um único fator consistiram na seleção da temperatura de imersão e de germinação. Um estudo foi realizado para determinar a temperatura ótima de imersão para a maltagem do sorgo. Inicialmente, a imersão foi realizada em diferentes temperaturas: 25; 27,5; 30; 32,5 e 35 °C. A concentração de NaOH, tempo de imersão, temperatura e tempo de germinação foram mantidos constantes a 0,2%, 24 h, 30 °C e 144 h, respectivamente.

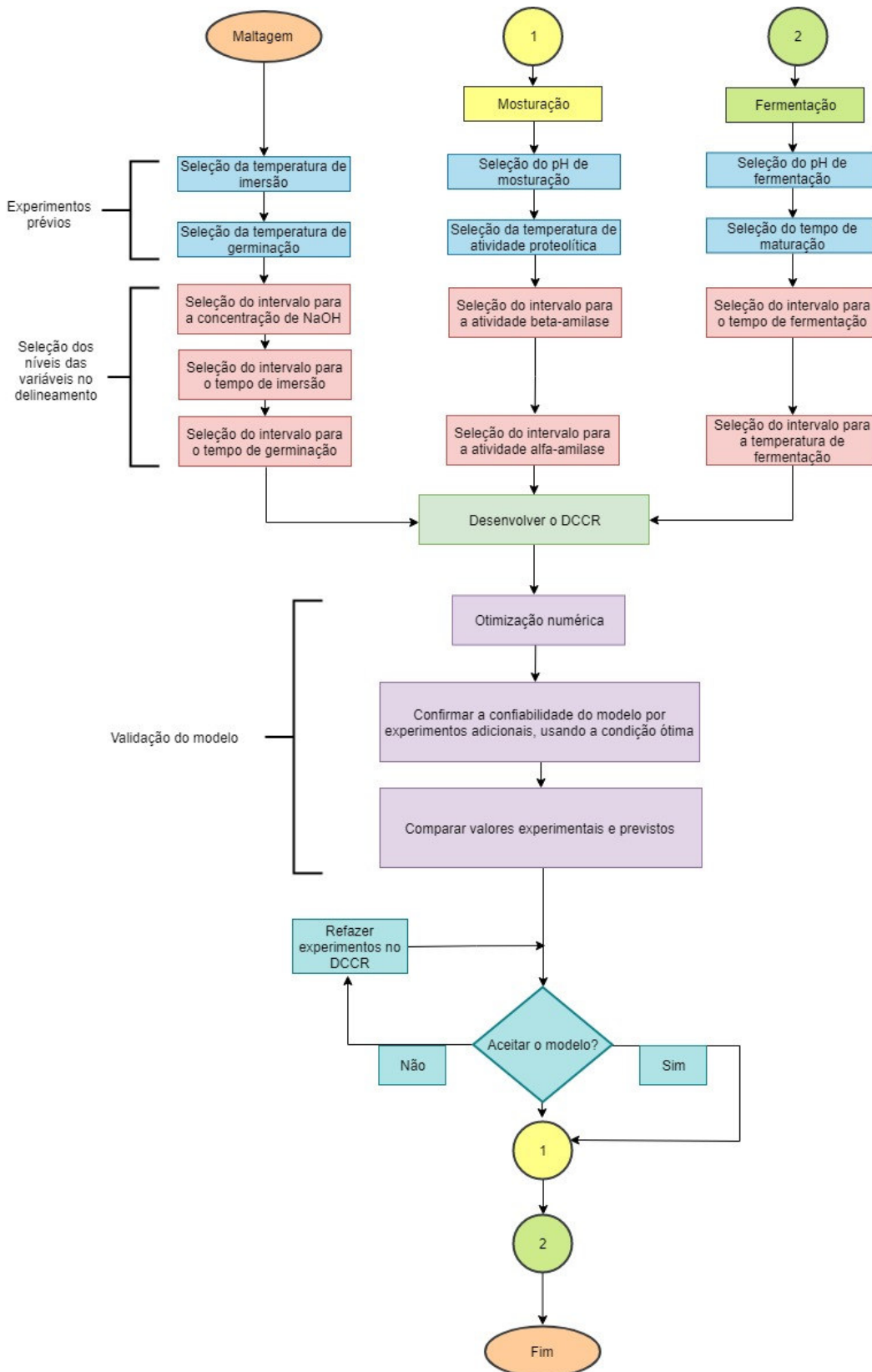
Um segundo conjunto de experimentos foi realizado para determinar a melhor temperatura de germinação. Como a temperatura de imersão, a temperatura de germinação foi estudada entre 27,5 e 35 °C. A temperatura de imersão ótima a partir dos experimentos prévios (30 °C) e condições idênticas de maltagem foram usadas. Foram avaliados o poder diastático, o extrato em água quente e o nitrogênio amino livre para a otimização destes parâmetros.

Uma segunda série de experimentos para a avaliação de apenas um fator foi realizada para determinar o intervalo usado para a concentração da solução alcalina, o tempo de imersão e de germinação na MSR. Os grãos foram imersos em três concentrações de NaOH [0,05; 0,35 e 0,65% (p/v)], três tempos de imersão (12, 30 e 48 h) e três tempos de germinação (48, 120 e 192 h) na temperatura de imersão e de germinação de 30 °C, otimizadas anteriormente. Foram estudados os efeitos destas três variáveis independentes sobre o *DP*, *HWE*, *FAN* e *MWL*.

4.9.2 Etapa de mosturação

Os experimentos prévios com um único fator, realizados na etapa de mosturação, foram a seleção do pH de mosturação e da temperatura da atividade das enzimas proteolíticas ou proteases. O pH do mosto durante a mosturação deve ser ajustado para permitir a degradação das proteínas, e posteriormente, a degradação do amido do malte (MAYER et al., 2016). Já que as enzimas proteolíticas são as responsáveis pela produção de aminoácidos livres, elas são chaves na produção de *FAN*. Assim, o pH foi a primeira variável independente estudada. A mosturação foi realizada em cinco diferentes valores de pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0).

Figura 5 - Fluxograma da metodologia de otimização do processo de maltagem a e as etapas de mosturação e fermentação



Fonte: Arquivo pessoal

As temperaturas da atividade das enzimas proteases, β -amilase e α -amilase, foram mantidas constantes a 45; 55 e 70 °C, respectivamente.

A segunda variável independente selecionada, nos experimentos prévios, foi a temperatura de atividade proteolítica. Essas enzimas são as responsáveis pela produção de nitrogênio amino livre, parâmetro importante na fermentação. Além de influenciar em outros parâmetros, como discutido anteriormente, as suas atividades enzimáticas influenciam também na cor do mosto (EVANS; TAYLOR, 1990a). Visando otimizar a etapa de mosturação do malte de sorgo, foi estudada a temperatura de atividade proteolítica em 30; 35; 40; 45 e 50 °C. O pH de 5,5, selecionado na primeira etapa, foi usado. Foram mantidas constantes as temperaturas da atividade β -amilase e da α -amilase em 55 e 70 °C, respectivamente. O extrato em água quente e o nitrogênio amino livre foram as variáveis respostas avaliadas nestes experimentos preliminares.

Foram realizados experimentos com um fator para determinar o intervalo usado para as temperatura de atividades das enzimas β -amilase e α -amilase durante a mosturação na MSR. Essas enzimas são chaves na sacarificação do amido do malte (OGBONNA, 2009; LYUMUGABE et al., 2012). A mosturação foi realizada em três diferentes temperaturas (48, 52 e 56 °C) para avaliar atividade da β -amilase e em três diferentes temperaturas (66; 70 e 74 °C) para avaliar atividade da α -amilase. O pH de 5,5 e a temperatura de atividade das enzimas proteolíticas de 45 °C, otimizados anteriormente, foram mantidos constantes. O efeito de ambas as temperaturas das enzimas sobre o *HWE* e o *FAN* foi estudado.

4.9.3 Etapa de fermentação

Os experimentos prévios com um único fator, na etapa de fermentação, foram a seleção do pH de fermentação e do tempo de maturação. O mosto usado nos experimentos da fermentação tinha uma concentração de extrato de 6,62 °P e de *FAN* de 111,00 mg/L. Um estudo foi realizado para determinar o pH ótimo para o crescimento das leveduras durante a fermentação. A fermentação foi realizada em diferentes valores de pH (4,0; 4,2; 4,4; 4,6 e 4,8). O tempo e a temperatura de fermentação, e o tempo de maturação, foram mantidos constantes a 120 h, 9 °C e 168 h, respectivamente. Um segundo conjunto de experimentos foi realizado para determinar o melhor tempo de maturação. O pH ótimo a partir dos experimentos prévios (4,4) e condições idênticas de fermentação foram usadas. A maturação foi

estudada em cinco tempos diferentes (144; 168; 192; 216 e 240 h). As variáveis respostas estudadas foram a cor, e pH das bebidas fermentadas porque estes parâmetros podem influir na aceitabilidade das bebidas.

Experimentos com um fator foram realizados para determinar o intervalo usado para o tempo e temperatura de fermentação na MSR. As fermentações foram conduzidas em três diferentes tempos (72; 144 e 216 h). Como a levedura usada é capaz de fermentar entre 9 e 22 °C e, idealmente, entre 12 e 15 °C, foram selecionadas as três temperaturas seguintes: 6; 12 e 18 °C. O pH de fermentação e o tempo de maturação foram mantidos a 4,4 e 240 h, respectivamente. Foram estudados os efeitos destas duas variáveis independentes sobre a cor e pH das bebidas fermentadas.

4.10 Análise sensorial

As cervejas de sorgo obtidas foram submetidas à análise sensorial. Foi empregado o teste de aceitação usando a escala hedônica de 9 pontos, para a escolha da melhor cerveja, com a nota 9 significando gostei muitíssimo, a nota 5 significando não gostei nem desgostei, a nota 1, desgostei muitíssimo. A aplicação do teste sensorial foi realizada conforme metodologia descrita por Meilgaard (2001).

As amostras foram apresentadas em blocos completos aos 60 consumidores habituais de cerveja, previamente recrutados, mediante entrevistas, em dias diferentes. Amostras de cerveja com 40 mL foram servidas em copos de acrílico codificados com três dígitos à temperatura de 4 ± 1 °C, acompanhadas de água, biscoito salgado e a ficha de avaliação sensorial (APÊNDICE A).

Os testes sensoriais foram realizados em cabinas individuais com a utilização de luz branca no laboratório de Análise Sensorial da Microcervejaria da EEL. Os participantes do teste foram recrutados por intermédio de informativos distribuídos no *campi* da EEL, de forma voluntária, e com idade maiores de 18 anos.

Os consumidores avaliaram atributos tais como aparência, cor, odor, sabor e impressão global da bebida. Simultaneamente, foi avaliada a intenção de compra em relação ao produto usando uma escala estruturada de 5 pontos, com a nota 5 significando certamente compraria e a nota 1, certamente não compraria.

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e aplicado teste de Duncan para identificar diferenças significativas entre as médias, usando o programa *IBM SPSS Statistics 20*. Diferenças entre as médias no nível de 5% foram consideradas

significativas. A etapa de análise sensorial foi aprovada pelo comitê de ética para sua execução (Número CAAE: 02912018.1.0000.5390) e os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE B).

4.11 Planejamento experimental e análise estatística

Foram avaliados os parâmetros de qualidade dos grãos, tais como umidade, peso de 1000 grãos, energia de germinação, teor de proteína e textura do endosperma.

Também, foram realizados experimentos prévios com um único fator (Figura 5) antes o desenvolvimento da metodologia de superfície de resposta. As variáveis respostas avaliadas foram: *DP*, *HWE* e *FAN*, na maltagem; *DP*, *HWE*, na mosturação; e cor e pH das bebidas fermentadas, na fermentação. Foi realizada a ANOVA e o teste de Duncan para identificar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias, usando o programa *IBM SPSS Statistics 20*, na avaliação das variáveis respostas.

A MSR com um delineamento composto central rotacional, tal como descrito por (MYERS; MONTGOMERY, 2002), foi utilizada para determinar a influência dos fatores sobre as variáveis respostas do processo de maltagem e as etapas de mosturação e de fermentação.

No processo de maltagem foi examinada a influência da concentração de NaOH (X_1), na imersão, o tempo de imersão (X_2), o tempo de germinação (X_3) sobre o *DP* (Y_1), o *HWE* (Y_2), o *FAN* (Y_3) e as *MWL* (Y_4). Na mosturação, foi analisada a influência da temperatura de atividade da β -amilase (X_1) e da α -amilase (X_2) sobre o extrato em água quente (Y_1) e o nitrogênio amino livre (Y_2). Já na etapa de fermentação avaliou-se influência do tempo (X_1) e da temperatura (X_2) sobre o etanol (Y_1), o *Yp/s* (Y_2), a *Qp* (Y_3), o *RDF* (Y_4), a cor (Y_5), o pH (Y_6) e o *FAN* (Y_7). Cada variável independente foi codificada em cinco níveis (Tabela 5, 6 e 7).

O delineamento composto central é constituído por três partes: (i) pontos fatoriais que permitem estimar os efeitos de primeira ordem; (ii) pontos axiais, fixados a uma distância α de $\pm 1,682$ ou de $\pm 1,414$ a partir da origem para gerar os termos quadráticos; (iii) pontos centrais para proporcionar informações sobre a existência da curvatura no sistema, a variância da resposta prevista e fornecer uma estimativa independente do erro experimental.

Tabela 5 – Variáveis independentes e seus valores atuais e codificados usados para a otimização da maltagem

Variáveis	Código	Níveis dos fatores				
		-1,682	-1	0	1	1,682
Concentração de NaOH (%)	X ₁	0,10	0,20	0,35	0,50	0,60
Tempo de imersão (h)	X ₂	3,82	12,00	24,00	36,00	44,18
Tempo de germinação (h)	X ₃	15,27	48,00	96,00	144,00	176,73

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 6 - Variáveis independentes e seus valores atuais e codificados usados para a otimização da mosturação

Variáveis	Código	Níveis dos fatores				
		-1,414	-1	0	1	1,414
Temperatura da β -amilase (°C)	X ₂	49,17	50	52	54	54,83
Temperatura da α -amilase (°C)	X ₁	67,17	68	70	72	72,83

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 7 - Variáveis independentes e seus valores atuais e codificados usados para a otimização da fermentação

Variáveis	Código	Níveis dos fatores				
		-1,414	-1	0	1	1,414
Tempo (h)	X ₁	52,12	72	120	168	187,88
Temperatura (°C)	X ₂	7,76	9	12	15	16,24

Fonte: Arquivo pessoal

Os ensaios do delineamento da maltagem foram realizados em triplicatas. Já os experimentos da mosturação e de fermentação foram realizados em duplicatas. Os experimentos foram realizados aleatoriamente para minimizar os efeitos da variabilidade inesperada nas respostas observadas.

Para as variáveis sob consideração, um modelo de regressão polinomial de segunda ordem foi proposto de acordo com Myres e Montgomery (2002) conforme descrito a seguir:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} X_i X_j \quad (6)$$

Em que: Y é a resposta prevista, β_0 é o coeficiente de interseção, β_i é o coeficiente do efeito linear, β_{ii} é o coeficiente do efeito quadrático, β_{ij} é o coeficiente do efeito de interação, X_i e X_j variáveis independentes codificadas, e n é o número de fatores. A qualidade do ajuste da equação do modelo polinomial foi expressa pelo coeficiente de determinação (R^2), $F_{\text{calculado}}$, falta de ajuste e coeficiente de variação. A significância estatística dos termos do modelo foi determinada por análise de regressão múltipla, análise de variância e teste de significância usando o programa *Design-Expert* (7.0.0).

4.12 Otimização

Para otimizar os fatores experimentais do processo de maltagem e as etapas de mosturação e de fermentação, foi usada a técnica de otimização numérica do programa *Design-Expert* (7.0.0). Foram selecionados os objetivos desejado para cada variável independente e resposta. Para a otimização numérica, todas as variáveis independentes foram mantidas dentro do intervalo dos pontos axiais, enquanto as variáveis respostas foram maximizadas ou minimizadas. A otimização numérica determina um ponto que melhora a função de desejabilidade ao máximo. Para buscar uma combinação ótima de variáveis, os objetivos são combinados em uma função composta geral, $D(x)$, chamada função de desejabilidade (MYERS; MONTGOMERY, 1995), a qual é definida como:

$$D(x) = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{1/n} \quad (7)$$

Em que d_1, d_2, \dots, d_n são as respostas e " n " é o número total de respostas na medida.

Os gráficos de superfície de resposta foram gerados com a ajuda do programa *Design-Expert* (7.0.0). Os gráficos de superfície de resposta obtidos a partir dos dados experimentais mostraram o efeito das variáveis independentes sobre as respostas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Qualidade dos grãos

A Tabela 8 apresenta os resultados dos parâmetros de qualidade dos grãos de sorgo das cultivares BRS511 e 1G244. As análises foram feitas em triplicatas e calculados a média e o desvio padrão. A umidade foi menor quando comparada com as umidades de outras cultivares de sorgo. Por exemplo, têm sido relatado umidades nas cultivares de sorgo *S.SA*, *S.Su* e *S.Nig* de 3,4; 5,6 e 4,7%, respectivamente (AISIEN; MUTS, 1987). Já Odibo et al. (2002) encontraram nas cultivares *SK 5912* e *Fara fara* umidades de 10,5 e 10,7%, respectivamente.

O peso de 1000 grãos está nos intervalos de pesos encontrados na literatura (NNAMCHI; OKOLO; MONEKE, 2014; ABUAJAH et al., 2016b). Igualmente, os grãos demonstraram ter boa energia de germinação. A EG neste estudo foi marcadamente maior que ao valor mínimo para o sorgo, e também superior ao mínimo exigido pela *EBC* (EBC, 1987) para grãos de cevada. Os resultados mostraram que os grãos tiveram um bom teor de proteínas; similares aos obtidos por Nnamchi et al 2014 nas 10 cultivares estudadas.

Em relação à textura do endosperma, ambas as cultivares estudadas têm uma textura farinhosa (4 – 5). Cultivares de sorgo tem apresentado uma textura similar (BEKELE; BULTOSA; BELETE, 2012).

Tabela 8 - Atributos de qualidade dos cultivares BRS511 e 1G244

Atributos	Cultivares	
	BRS 511	1G244
Umidade (%)	2,59±0,30	3,53±0,42
Peso de 1000 grãos (g)	27,24± 0,15	27,66±0,28
Energia de germinação (%)	98,17± 0,76	97,33±0,57
Proteína total (%)	10,8±0,28	9,75±0,35
Textura do endosperma	Farinhosa	Farinhosa

Fonte: Arquivo pessoal

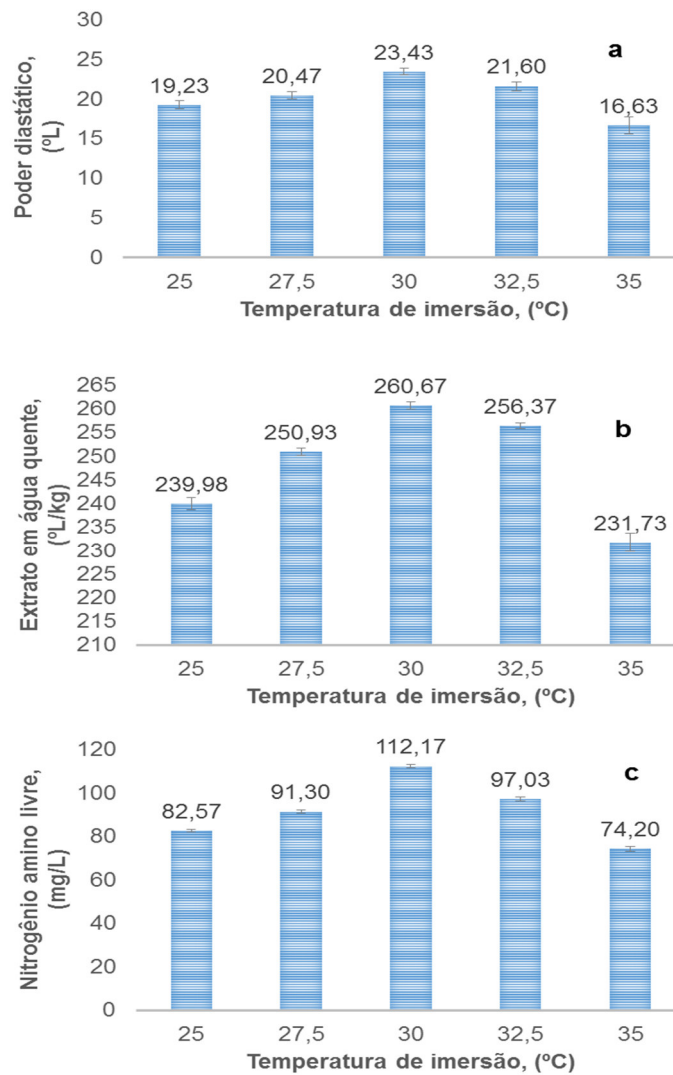
5.2 Otimização do processo de maltagem do cultivar BRS511

5.2.1 Seleção da temperatura de imersão e de germinação

Estudos prévios foram realizados para determinar a temperatura ótima de imersão e de germinação requeridas para atingir os máximos parâmetros de

qualidade durante o processo de maltagem. A análise estatística foi realizada usando o programa *IBM SPSS Statistics 20*. Os resultados mostraram que a temperatura de imersão teve um efeito significativo sobre o poder diastático, extrato em água quente e nitrogênio amino livre ($p < 0,05$). A Figura 6 mostra que os parâmetros de qualidade incrementaram com o aumento da temperatura até 30 °C, além do qual não houve aumento nesses parâmetros, indicando que temperaturas diferentes a 30 °C não são adequadas para o desenvolvimento enzimático do malte de sorgo do cultivar BRS511.

Figura 6 - Efeito da temperatura de imersão sobre o poder diastático (°L) (a), extrato em água quente (b) e nitrogênio amino livre (c) do malte de sorgo do cultivar BRS511, usando 0,2% de NaOH, 24 h de imersão e 144 h de germinação a 30 °C. As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).



Fonte: Arquivo pessoal

Um alto *DP* de 23,43 °L foi observado quando os grãos foram imersos em 30 °C. Similarmente, o máximo *DP* de 42,6 *SDU g*⁻¹ (aproximadamente 21,3 °L) num estudo prévio foi obtido pela cultivar *Bernard Red*, na imersão dos grãos a 30 °C (DEWAR; TAYLOR; BERJAK, 1997a).

Igualmente, neste estudo, o valor superior de *HWE* (260,67 °L/Kg) e o valor aceitável de *FAN* (112,17 mg/L) foram observados a 30 °C.

Por outro lado, Nnamchi et al. (2014) relataram que a cultivar *SK5912* só atingiu o máximo *HWE* de 240,3 °L/Kg, na imersão a 28 °C; embora o *FAN* (185 mg/L) tenha sido superior quando comparado com o presente estudo pesquisa. Neste estudo, portanto, uma temperatura de imersão de 30 °C foi selecionada para os futuros experimentos.

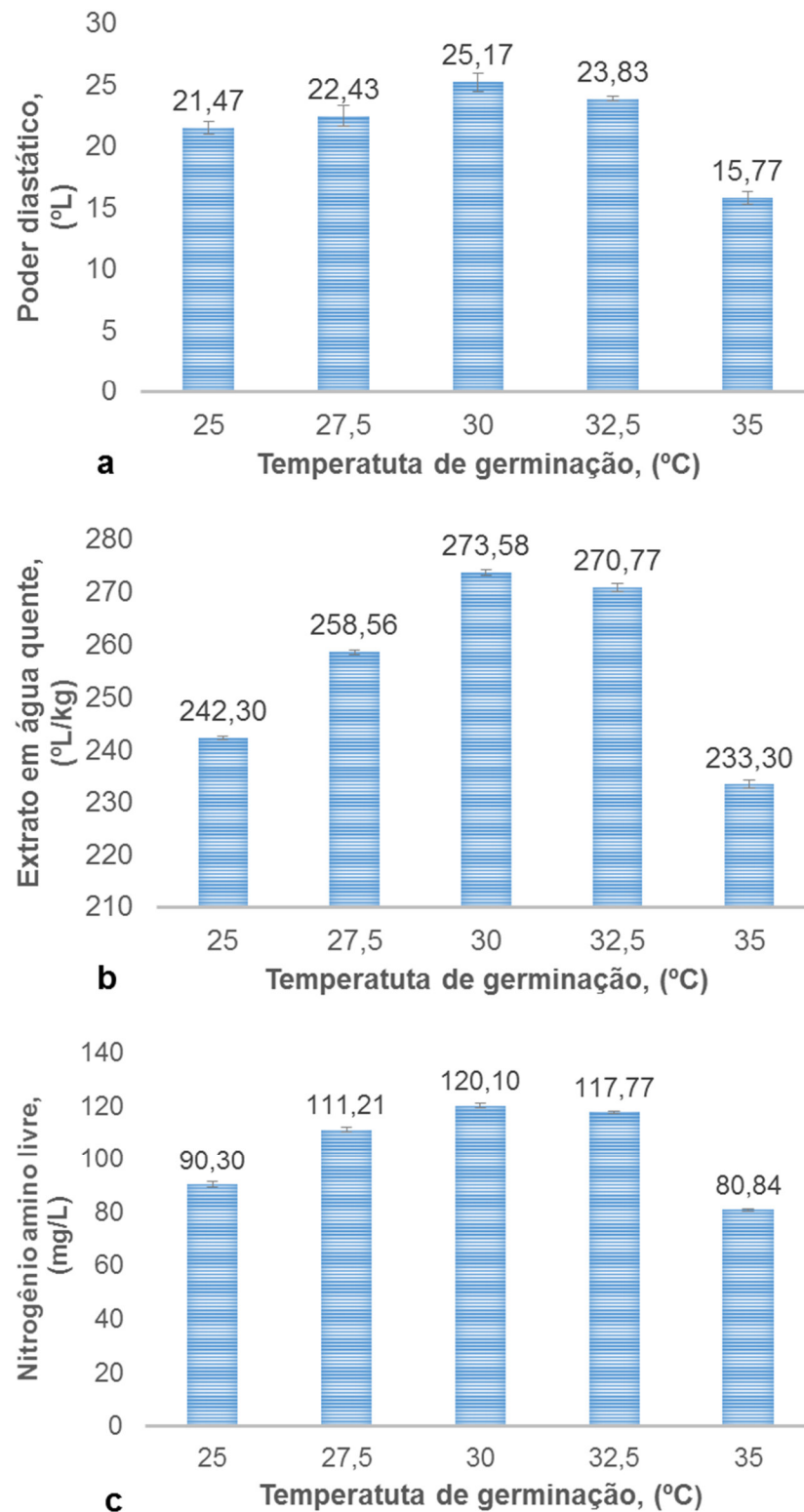
A próxima etapa foi a seleção de uma temperatura apropriada de germinação. Os resultados mostraram que os mesmos parâmetros de qualidade (*DP*, *HWE* e *FAN*) também melhoraram com o incremento da temperatura desde 25 até 30 °C, porém mantiveram-se praticamente constantes entre 30 e 32,5 °C, e decresceram com o aumento da temperatura de germinação desde 32,5 até 35 °C (Figura 7). A análise estatística revelou que a temperatura de germinação teve um efeito significativo sobre os parâmetros de qualidade estudados ($p < 0,05$).

Neste estudo, foram registrados a 30 °C os valores mais altos de *DP* (25,17 °L), *HWE* (273,58 °L/Kg) e *FAN* (120,10 mg/L).

No entanto, Morrall et al. (1986b) mostraram que o valor máximo *DP* de 46,6 *SDU g*⁻¹ (aproximadamente 23,3 °L) foi atingido em uma temperatura de germinação de 24 °C. Similarmente, Igyor et al. (1998) mostraram que a temperatura ótima de 25 °C para a qualidade do malte em termos de *HWE* (267 °L/Kg) e de *FAN* (aproximadamente 200 mg/L).

Contudo, uma ótima temperatura de germinação entre 25 e 30 °C também tem sido reportada (NOVELLIE, 1962b; DEWAR; TAYLOR; BERJAK, 1997b; AGU; PALMER, 1997c). Deste modo, este estudo recomenda que a temperatura de germinação seja de 30 °C para alcançar os parâmetros de qualidade máximos possíveis do malte de sorgo.

Figura 7 - Efeito da temperatura de germinação sobre o poder diastático (°L) (a), extrato em água quente (b) e nitrogênio amino livre (c) do malte de sorgo, usando 0,2% de NaOH, 24 h de imersão a 30 °C e 144h de germinação. As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).



Fonte: Arquivo pessoal

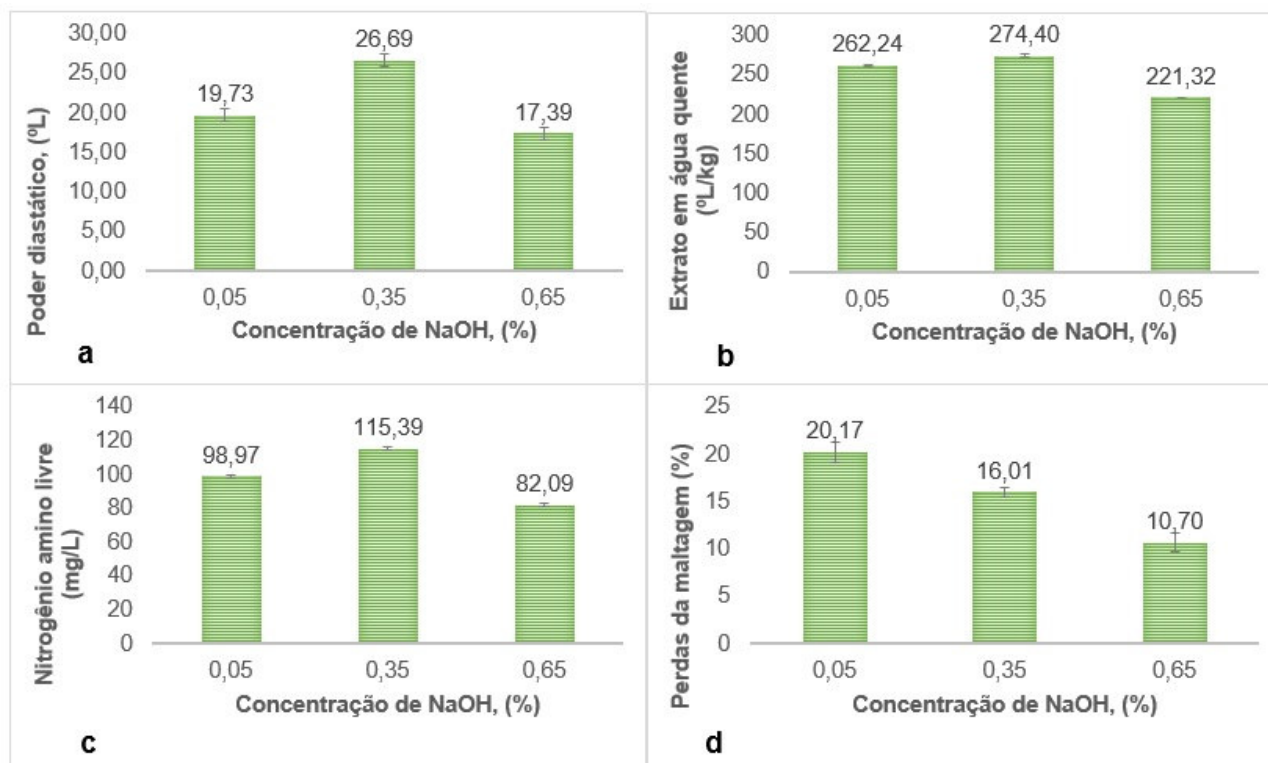
5.2.2 Seleção dos níveis dos fatores do DCCR

Como a concentração de NaOH, na imersão, o tempo de imersão e de germinação têm sido identificadas como os parâmetros principais na qualidade do malte (LEFYEDI; TAYLOR, 2006; BEKELE; BULTOSA; BELETE, 2012; AGU; PALMER, 2013; DJAMEH et al., 2015), assim estes parâmetros foram selecionados como os fatores do delineamento para a MSR.

5.2.2.1 Concentração de NaOH

A primeira etapa foi selecionar o intervalo para a concentração de NaOH na etapa de imersão no processo de maltagem. Os experimentos foram realizados em três diferentes concentrações de NaOH (0,05; 0,35 e 0,65% p/v). O tempo de imersão (24 h) e de germinação (144 h) foram mantidos constantes, e as temperaturas de imersão e de germinação, em 30 °C, como otimizadas nos estudos preliminares. A Figura 8 mostra que os maiores valores de *DP*, *HWE* e *FAN* foram de 26,69 °L, 274,40 °L/kg e 115,39 mg/L, respectivamente, enquanto a *MWL* mais baixa foi de 10,70%. A concentração de NaOH teve um efeito significativo sobre a qualidade do malte ($p < 0,05$). O *DP*, o *HWE* e o *FAN* incrementaram com o aumento da concentração de NaOH desde 0,05 até 0,35%; no entanto, houve um decréscimo nestes parâmetros quando 0,65% de NaOH foi utilizado. Uma tendência similar foi observada por Lefyedi e Taylor (2006) quando avaliaram o *DP* da cultivar *PAN 8546* usando uma concentração de NaOH entre 0,1 e 0,3%; o máximo *DP* (26,9 *SDU/g*) (aproximadamente 13,45 °L) foi obtido com 0,2% de NaOH. Por outro lado, neste estudo, as perdas da maltagem diminuíram com o aumento da concentração de NaOH. Várias pesquisas têm revelado que a imersão dos grãos em uma solução alcalina diluída pode proporcionar maltes com adequados valores de *DP*, *HWE* e *FAN*, além de reduzir as perdas, e melhorar a mobilização de carboidratos e proteínas sem efeitos adversos aos grãos (OKOLO; EZEUGU, 1996; DEWAR; OROVAN; TAYLOR, 1997; EZEUGU; OKOLO, 1999). Conforme (DEWAR; OROVAN; TAYLOR, 1997), a melhora no malte de sorgo pelo álcali, em termos de *DP* e *FAN* é devido à absorção de água durante a imersão. Isto pode ser um resultado da destruição da estrutura da parede celular do pericarpo nos grãos. Considerando todas as respostas, foi selecionado 0,20; 0,35 e 0,50 de NaOH, como o nível baixo, médio e alto, respectivamente.

Figura 8 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito da concentração de NaOH sobre o poder diastático (a), extrato em água quente (b), nitrogênio amino livre (c) e perdas da maltagem (d) do malte de sorgo. As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).



Fonte: Arquivo pessoal

5.2.2.2 Tempo de imersão

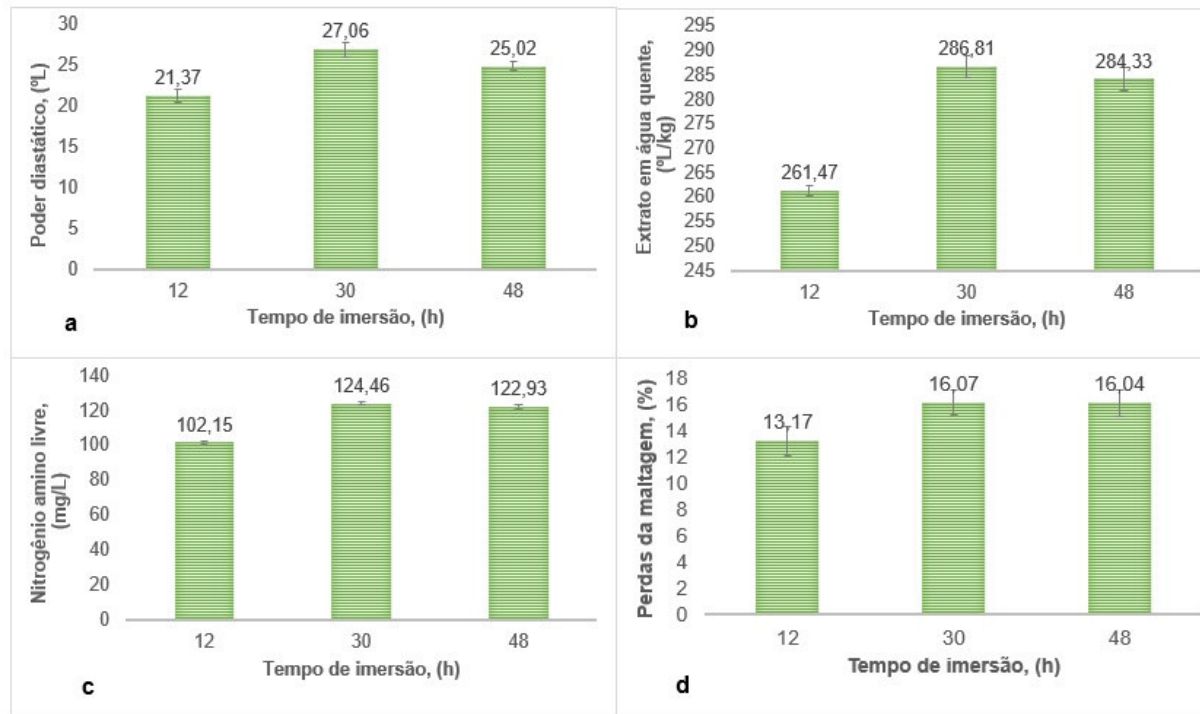
A segunda etapa foi selecionar um intervalo adequado para o tempo de imersão. Os experimentos realizaram-se a três diferentes tempos, 12, 30 e 48 h. A concentração de NaOH (0,2%) e o tempo de germinação (144 h) foram mantidos constantes, e as temperaturas de imersão e de germinação, ambas em 30 °C, como otimizadas previamente. Os maiores valores de *DP*, de *HWE* e de *FAN* foram de 27,06 °L, 286,81 °L/kg e 124,46 mg/L, respectivamente, e as menores perdas de 13,17% (Figura 9). Um efeito significativo ($p < 0,05$) do tempo de imersão sobre estes parâmetros foi observado. Os parâmetros de qualidade aumentaram com o aumento do tempo de imersão desde 12 até 30 h, porém ficaram constantes até às 48 h. Igualmente, Pathirana et al. (1983) perceberam que o *DP* do cultivar *IS 2941* aumentou com o aumento do tempo de imersão, desde 8 até 32 h, atingindo um máximo de 46,3 *SDU g*⁻¹ (aproximadamente 23,15 °L); no entanto, o maior extrato (82,4%) foi obtido com 18 h. Porém, Djamed et al. (2015) relataram que a duração do tempo de imersão no teve influência sobre o *DP*. Além disso, a média do *FAN* foi não afetada pelo tempo, e decresceu com o incremento do tempo de imersão desde 16 até 22 h. Por outro lado, tem sido relatado o retardo das perdas da maltagem pelo aumento do tempo de imersão dos grãos entre 16 e 40 h (DEWAR; TAYLOR; BERJAK, 1997a). Neste estudo, foi selecionado 12; 24 e 36 h de imersão como o nível baixo, médio e alto, respectivamente, para a otimização.

5.2.2.3 Tempo de germinação

A terceira etapa foi selecionar o melhor intervalo para o tempo de germinação. A germinação foi estudada a três diferentes tempos de 48; 120 e 192 h. A concentração de NaOH (0,2%) e o tempo de imersão (24 h) foram mantidos constantes, e as temperaturas de imersão e de germinação, ambas em 30 °C, como otimizadas anteriormente.

Os maiores valores de *DP*, de *HWE* e de *FAN* foram de 28,30 °L, 303,83 °L/kg, 128,79 mg/L, respectivamente. Já as perdas mais baixas foram de 12,26% (Figura 10). Foram observados efeitos significativos ($p < 0,05$) do tempo de germinação sobre o *DP*, *HWE* e *FAN*.

Figura 9 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito do tempo de imersão sobre o poder diastático (a), extrato em água quente (b), nitrogênio amino livre (c) e perdas da maltagem (d) do malte de sorgo. As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).



Fonte: Arquivo pessoal

Estes parâmetros incrementaram desde 48 até 120 h, mas não foram observados aumentos em 192 h. Por outro lado, as perdas aumentaram com o aumento do tempo de germinação.

A melhora dos parâmetros de qualidade com o aumento do tempo de germinação está em concordância com outros trabalhos. Por exemplo, foi reportado que o *DP* e *HWE* de sorgo incrementaram com o aumento do tempo de germinação até às 120 h. (AGU; PALMER, 2013).

Por outro lado, foi reportado que um incremento desde 48 até 144 h de germinação resultou em um consistente aumento nos valores de *FAN* e nas perdas da maltagem, em todas as variedades estudadas, oscilando entre 185,67 e 343,29 mg/L, e entre 8,68 e 27,56%, respectivamente (BEKELE; BULTOSA; BELETE, 2012).

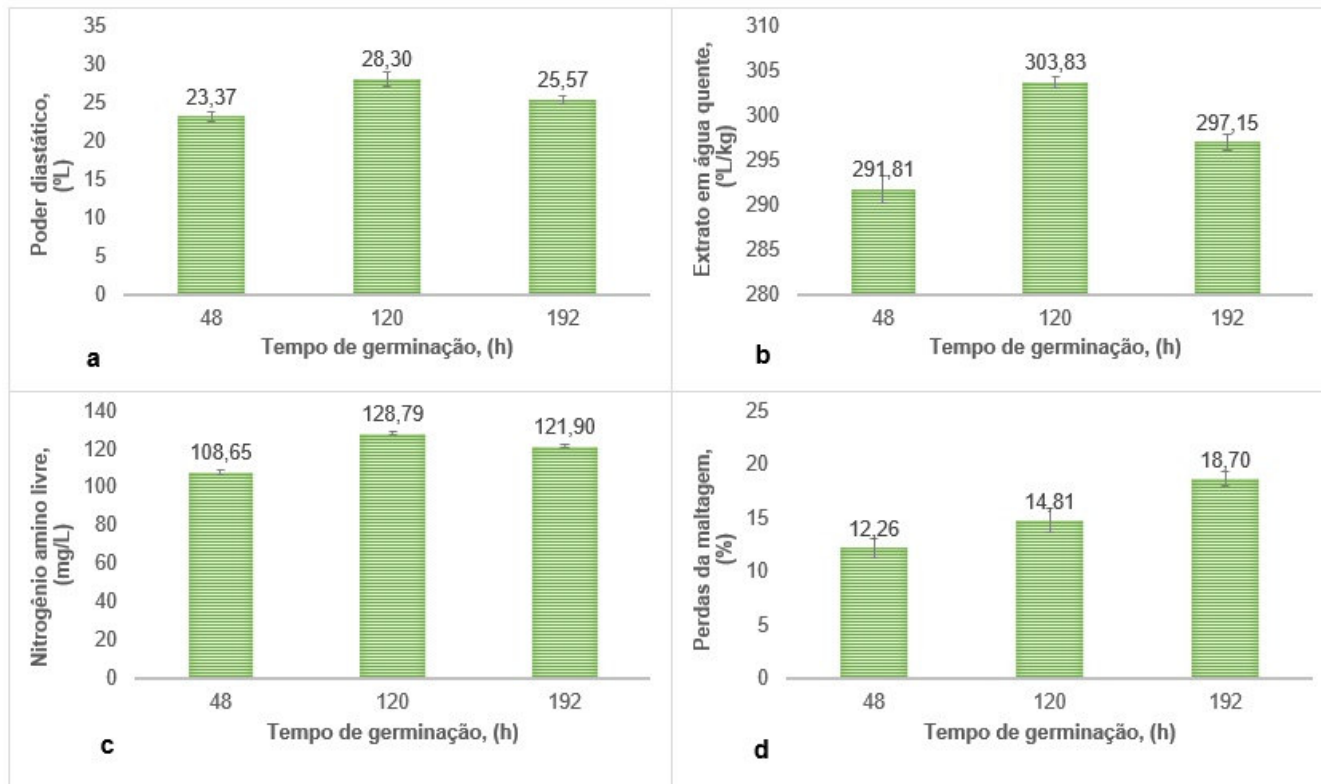
Neste trabalho, foi selecionado 48; 96 e 144 h de germinação como o nível baixo, médio e alto, respectivamente, para a otimização.

5.2.3 Metodologia de superfície de resposta

A Tabela 9 mostra as condições experimentais de acordo com o delineamento composto central rotacional e as respostas observadas.

Observa-se que o poder diastático, extrato em água quente, nitrogênio amino livre e as perdas da maltagem oscilaram entre 22,70 e 38,60 °L, 210,60 e 330,32 °L/kg (55,82 – 87,56 %), 70,86 e 145,36 mg/L, e 10,0 e 15,2%, respectivamente. Os mais altos valores de *DP* (38,60 °L), *HWE* (330,32 °L/kg), *FAN* (145,36 mg/L) foram obtidos sob condições experimentais de $X_1 = 0,20\%$, $X_2 = 36$ h e $X_3 = 144$ h (experimento n°. 7), enquanto a perda mais baixa (10%) foi obtida sob condições experimentais de $X_1 = 0,50\%$, $X_2 = 12$ h e $X_3 = 48$ h (experimento n°. 2).

Figura 10 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito do tempo de germinação sobre o poder diastático (a), extrato em água quente (b), nitrogênio amino livre (c) e perdas da maltagem (d) do malte de sorgo. As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 9 – Matriz (valores reais) do delineamento composto central rotacional e respostas observadas no processo do malte de sorgo

No. ^a	Orden ^b	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
1	20	0,20	12	48	26,5	255,11	89,10	12,00
2	5	0,50	12	48	22,7	233,50	80,00	10,00
3	15	0,20	36	48	32,0	276,10	116,73	13,30
4	6	0,50	36	48	24,0	255,80	92,30	11,50
5	2	0,20	12	144	30,14	300,70	126,19	14,50
6	8	0,50	12	144	26,4	285,00	103,81	12,50
7	3	0,20	36	144	38,6	330,32	145,36	15,00
8	9	0,50	36	144	28,3	301,00	113,45	13,50
9	19	0,10	24	96	33,4	315,60	120,00	15,00
10	4	0,60	24	96	23,1	275,10	81,67	12,83
11	10	0,35	3,82	96	27,9	272,20	96,57	12,10
12	11	0,35	44,18	96	32,0	313,10	144,48	13,20
13	13	0,35	24	15,27	22,9	210,60	70,86	11,00
14	14	0,35	24	176,73	28,1	290,40	114,29	15,20
15	16	0,35	24	96	32,5	316,90	114,00	13,90
16	18	0,35	24	96	30,0	313,70	118,00	13,20
17	1	0,35	24	96	31,3	315,00	112,80	14,10
18	12	0,35	24	96	32,9	319,00	110,00	13,00
19	7	0,35	24	96	30,1	315,80	112,00	13,60
20	17	0,35	24	96	29,5	314,50	120,10	14,00

^aOrdem padrão; ^b Ordem de execução aleatório. X₁: concentração de NaOH; X₂: tempo de imersão; X₃: tempo de germinação; Y₁: poder diastático; Y₂: extrato em água quente; Y₃: nitrogênio amino livre; Y₄: perdas da maltagem.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.4 Composição dos modelos

A análise de regressão múltipla dos dados experimentais originaram as seguintes equações polinomiais de segunda ordem em variáveis codificadas para o poder diastático (Eq. (8)), extrato em água quente (Eq. (9)), nitrogênio amino livre (Eq. (10)) e perdas da maltagem (Eq. (11)).

$$Y_1 = 31,02 - 3,16X_1 + 1,76X_2 + 1,98X_3 - 1,34X_1X_2 - 0,81 X_1^2 - 1,78 X_3^2 \quad (8)$$

$$Y_2 = 315,74 - 11,35X_1 + 11,55X_2 + 24,22X_3 - 6,73 X_1^2 - 7,69 X_2^2 - 22,59 X_3^2 \quad (9)$$

$$Y_3 = 114,34 - 11,15X_1 + 10,93X_2 + 13,45X_3 - 3,91 X_1^2 + 3,05 X_2^2 - 6,84 X_3^2 \quad (10)$$

$$Y_4 = 13,65 - 0,80X_1 + 0,45X_2 + 1,15X_3 - 0,43 X_2^2 - 0,27 X_3^2 \quad (11)$$

As equações obtidas foram testadas para determinar se elas poderiam descrever a variabilidade nas respostas, avaliando os coeficientes de múltipla determinação e realizando ANOVA.

A Tabela 10 mostra os resultados do ajuste dos modelos quadráticos aos dados. A significância de cada coeficiente foi determinada usando F-test e p-valor. As variáveis correspondentes são mais significativas se o $F_{\text{calculado}}$ se torna maior e o p-valor é menor. A falta de ajuste é apresentada como uma medida da qualidade dos modelos ajustados. O R^2 foi usado como um símbolo para determinar a proporção de variabilidade nos dados experimentais explicada pelo modelo quadrático. O CV foi usado para julgar a adequação dos modelos. O CV é a relação entre o erro padrão da estimativa e o valor médio da resposta observada, expresso em porcentagem. Um modelo pode ser considerado reproduzível razoavelmente se o CV não for maior que 10% (MYERS; MONTGOMERY, 1995). Neste estudo, observa-se a partir da ANOVA que o CV dos modelos da maltagem foi menor que 10%.

O $F_{\text{calculado}}$ do modelo de 18,70 com uma baixa probabilidade p-valor ($<0,0001$) para o poder diastático indica alta significância do modelo. Há uma pequena possibilidade de 0,01% de que um valor $F_{\text{calculado}}$ tão grande do modelo pudesse ocorrer devido ao ruído. Os termos lineares (X_1 , X_2 , X_3), quadráticos (X_1^2 , X_3^2) e a interação (X_1X_2) tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) sob o *DP* do malte de sorgo. O R^2 do modelo predito foi 0,9439. O p-valor ($p = 0,6018$) para a falta de ajuste foi não significativo, indicando que esses valores são um bom ajuste para o modelo matemático na Eq. (8).

Um alto valor de $F_{\text{Calculado}}$ (291,23), altamente significativo ($p < 0,0001$) para o extrato em água quente indica a alta significância do modelo. Todos os termos lineares (X_1 , X_2 , X_3), como no poder diastático, e quadráticos (X_1^2 , X_2^2 , X_3^2) mostraram efeitos significativos ($p < 0,05$) sob o *HWE*. Já as interações ($X_1 X_2$, X_1X_3 , X_2X_3) não tiveram efeitos sobre a resposta. O R^2 (0,9962) do modelo predito nesta resposta foi alto e o p-valor da falta de ajuste foi 0,1188, sugerindo mais um bom ajuste do modelo matemático Eq. (9).

Com relação ao nitrogênio amino livre, o $F_{\text{calculado}}$ (31,63) foi altamente significativo ($p < 0,0001$). Como na análise do *HWE*, os três termos lineares (X_1 , X_2 , X_3) e quadráticos (X_1^2 , X_2^2 , X_3^2) foram significativos ($p < 0,05$), e não houve efeito

Tabela 10 – Análises de variância para o modelo quadrático da superfície de resposta: modelo de regressão estimado da relação entre as variáveis respostas e as variáveis independentes (X_1 , X_2 , X_3) da maltagem

Fonte de variação	SQ	G L	QM	F calculado	p-valor
<i>DP (°L)</i>					
Modelo	300,15	9	33,35	18,70	< 0,0001
X_1	136,41	1	136,41	76,49	< 0,0001
X_2	42,37	1	42,37	23,76	0,0006
X_3	53,32	1	53,32	29,90	0,0003
$X_1 X_2$	14,47	1	14,47	8,11	0,0173
$X_1 X_3$	0,63	1	0,63	0,35	0,5663
$X_2 X_3$	1,58	1	1,58	0,89	0,3682
X_1^2	9,37	1	9,37	5,25	0,0449
X_2^2	0,61	1	0,61	0,34	0,5728
X_3^2	45,58	1	45,58	25,56	0,0005
Resíduos	17,84	10	1,78		
LF	7,84	5	1,57	0,78	0,6018
Erro puro	9,99	5	2,00		
Total (corr.)	317,99	19			
R ²	0,9439				
R ² A	0,8934				
CV (%)	4,59				
<i>HWE (°L/Kg)</i>					
Modelo	19628,80	9	2180,98	291,23	< 0,0001
X_1	1760,16	1	1760,16	235,04	< 0,0001
X_2	1820,90	1	1820,90	243,15	< 0,0001
X_3	8008,71	1	8008,71	1069,43	< 0,0001
$X_1 X_2$	18,94	1	18,94	2,53	0,1428
$X_1 X_3$	1,21	1	1,21	0,16	0,6963
$X_2 X_3$	0,68	1	0,68	0,09	0,7696
X_1^2	652,89	1	652,89	87,18	< 0,0001
X_2^2	851,21	1	851,21	113,67	< 0,0001
X_3^2	7352,69	1	7352,69	981,83	< 0,0001
Resíduos	74,89	10	7,49		
LF	56,70	5	11,34	3,12	0,1188
Erro puro	18,19	5	3,64		
Total (corr.)	19703,69	19			
R ²	0,9962				
R ² A	0,9928				
CV (%)	0,94				
<i>FAN (mg/L)</i>					
Modelo	7011,17	9	779,02	31,63	< 0,0001
X_1	1697,99	1	1697,99	68,95	< 0,0001
X_2	1632,41	1	1632,41	66,29	< 0,0001
X_3	2471,56	1	2471,56	100,36	< 0,0001
$X_1 X_2$	77,24	1	77,24	3,14	0,1070
$X_1 X_3$	53,87	1	53,87	2,19	0,1699
$X_2 X_3$	15,47	1	15,47	0,63	0,4464
X_1^2	220,79	1	220,79	8,97	0,0135
X_2^2	133,84	1	133,84	5,43	0,0420
X_3^2	673,30	1	673,30	27,34	0,0004
Resíduos	246,26	10	24,63		
LF	173,01	5	34,60	2,36	0,1836
Erro puro	73,25	5	14,65		
Total (corr.)	7257,43	19			
R ²	0,9661				

(continua)

Fonte de variação	SQ	G L	QM	F calculado	p-valor
R ² A	0,9355				
CV (%)	4,55				
MWL (%)					
Modelo	33,62	9	3,74	18,45	< 0,0001
X ₁	8,79	1	8,79	43,42	< 0,0001
X ₂	2,77	1	2,77	13,68	0,0041
X ₃	18,20	1	18,20	89,87	< 0,0001
X ₁ X ₂	0,061	1	0,061	0,30	0,5944
X ₁ X ₃	0,011	1	0,011	0,056	0,8184
X ₂ X ₃	0,21	1	0,21	1,04	0,3311
X ₁ ²	2,29 x 10 ⁻³	1	2,29 x 10 ⁻³	0,011	0,9174
X ₂ ²	2,71	1	2,71	13,40	0,0044
X ₃ ²	1,09	1	1,09	5,37	0,0429
Resíduos	2,02	10	0,20		
LF	1,01	5	0,20	1,00	0,5009
Erro puro	1,01	5	0,20		
Total (corr.)	35,64	19			
R ²	0,9432				
R ² A	0,8921				
CV (%)	3,42				
Fonte de variação	SQ	G L	QM	F calculado	p-valor

SQ: soma de quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrados médios, *LK*: falta de ajuste; CV: coeficiente de variação. X₁: concentração de NaOH; X₂: tempo de imersão; X₃: tempo de germinação.

Fonte: Arquivo pessoal.

significativo das interações sob a resposta, como no *HWE*. O R² (0,9661) e o p-valor (0,1836) da falta de ajuste do modelo predito também foram adequados.

Para as perdas da maltagem, o F calculado (18,45) foi altamente significativo (p < 0,0001). Como nas respostas anteriores, os três termos lineares (X₁, X₂, X₃) foram significativos; mas, apenas os termos quadráticos X₂², X₃² mostraram significância estatística. O R² de 0,9432 e o p-valor de 0,5009 da falta de ajuste indicam o apropriado ajuste do modelo na Eq. (11).

5.2.5 Análise das superfícies de respostas

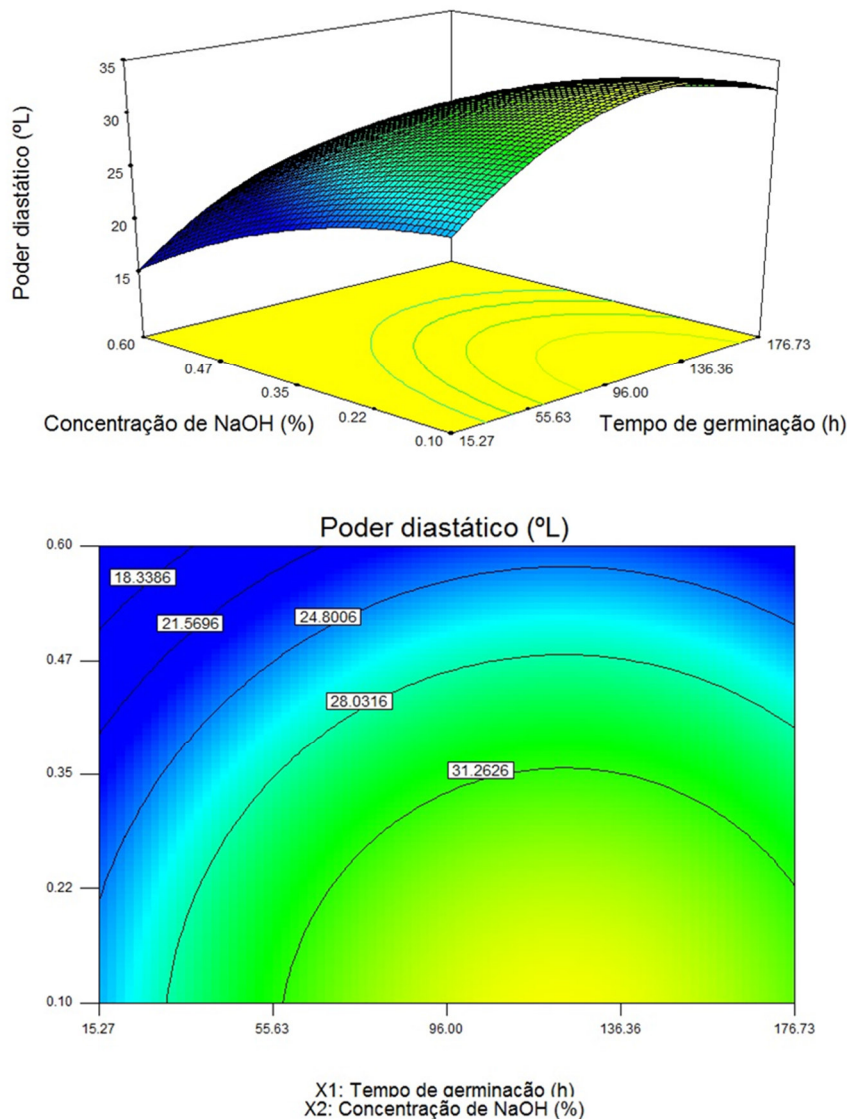
Como os modelos mostraram que a falta de ajuste não tem significância, as respostas foram explicadas suficientemente pela equação de regressão. A relação entre as variáveis dependentes e independentes é mostrada pela representação tridimensional das superfícies de resposta e as curvas de contorno bidimensional geradas pelos modelos, considerando apenas os termos estatisticamente significativos. No processo de maltagem, os gráficos apresentam a função de dois fatores (X₁ e X₃) enquanto o terceiro fator (X₂) foi fixado ao nível zero (24 h). Já nas

etapas de mosturação e fermentação, mostram-se as duas variáveis dependentes (X_1 e X_2).

5.2.5.1 Poder diastático

A Figura 11 descreve a superfície de resposta e curva de contorno do efeito da concentração de NaOH e do tempo de germinação sobre o poder diastático do malte de sorgo. A concentração de NaOH, na imersão, demonstrou efeito linear, e o tempo de germinação efeito quadrático sobre o poder diastático.

Figura 11 - Superfície de resposta e curva de contorno para o poder diastático do malte de sorgo em função da concentração de NaOH e o tempo de germinação



Fonte: Arquivo pessoal

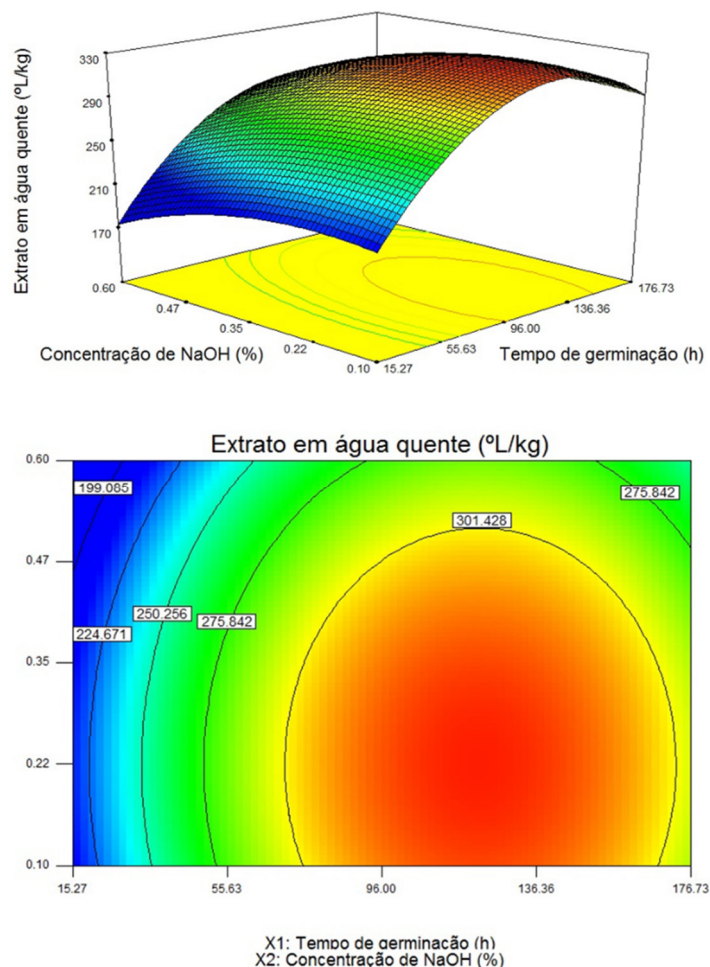
O *DP* aumentou com a diminuição da concentração de NaOH, e aumentou com o aumento do tempo de germinação, mas até as 140 h, aproximadamente. A

região ótima encontra-se nas concentrações mais baixas de NaOH e nas últimas horas de germinação. Resultados similares foram atingidos por Dewar et al. (1997) na imersão do sorgo em 0,1% de NaOH. Por outro lado, Bekele et al. (2012) sugeriram um tempo ótimo de germinação (96 h); embora, não tivesse diferença significativa com 144 h. O incremento do *DP* com o tempo de germinação está de acordo com vários trabalhos (MORRALL; BOYD; TAYLOR, 1986b; OWUAMA, 1997; DJAMEH et al., 2015) e tem sido associado com o alto nível de umidade dos grãos durante a germinação (NOVELLIE, 1962b).

5.2.5.2 Extrato em água quente

A Figura 12 exibe a superfície de resposta e curva de contorno do efeito da concentração de NaOH e do tempo de germinação sobre o extrato em água quente.

Figura 12 - Superfície de resposta e curva de contorno para o extrato em água quente do malte de sorgo em função da concentração de NaOH e o tempo de germinação



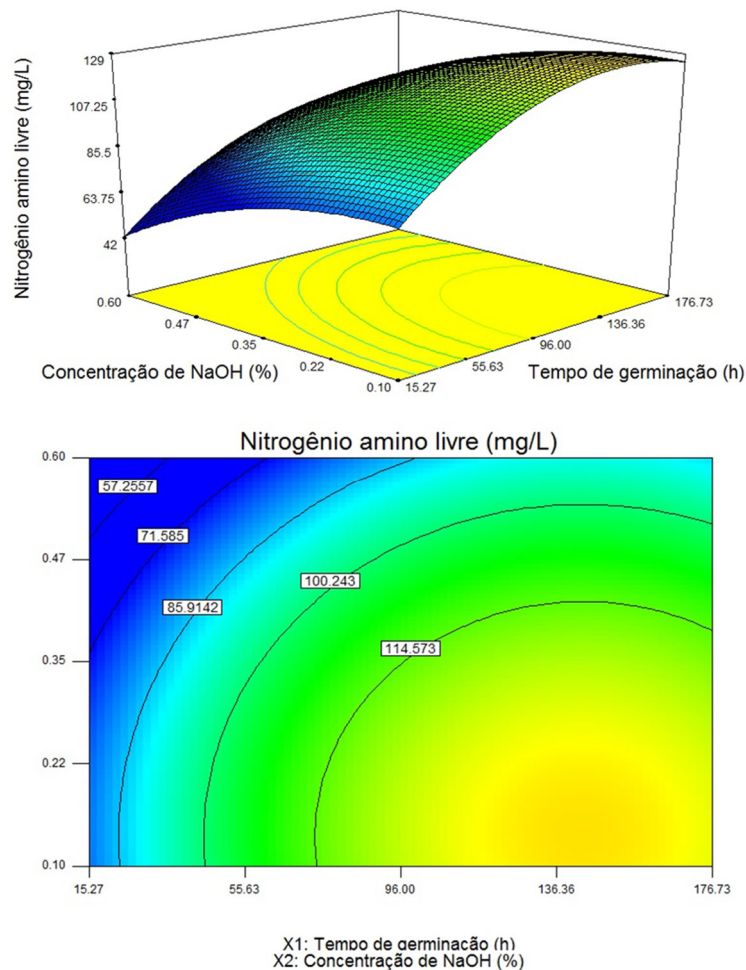
Fonte: Arquivo pessoal

Diferente ao *DP*, ambas as variáveis independentes tiveram um efeito quadrático sobre a resposta. O *HWE* atingiu seu máximo entre 0,22 e 0,47% de NaOH e entre 96 e 140 h de germinação. A condição de germinação está em correspondência com os resultados de Okolo e Ezeogu (1996), que em seus trabalhos alcançaram o maior valor de *HWE* (315,60 °L/kg) às 96 h (4 dias). Usando a mosturação por infusão a 85 °C, um valor de *HWE* (~255 °L/kg) inferior quando comparado com o presente estudo foi obtido a partir do malte de sorgo (NDUBISI et al., 2016).

5.2.5.3 Nitrogênio amino livre

O efeito da concentração de NaOH e do tempo de germinação sobre o nitrogênio amino livre pode ser observado a partir da Figura 13.

Figura 13 - Superfície de resposta e curva de contorno para o nitrogênio amino livre do malte de sorgo em função da concentração de NaOH e o tempo de germinação



Fonte: Arquivo pessoal

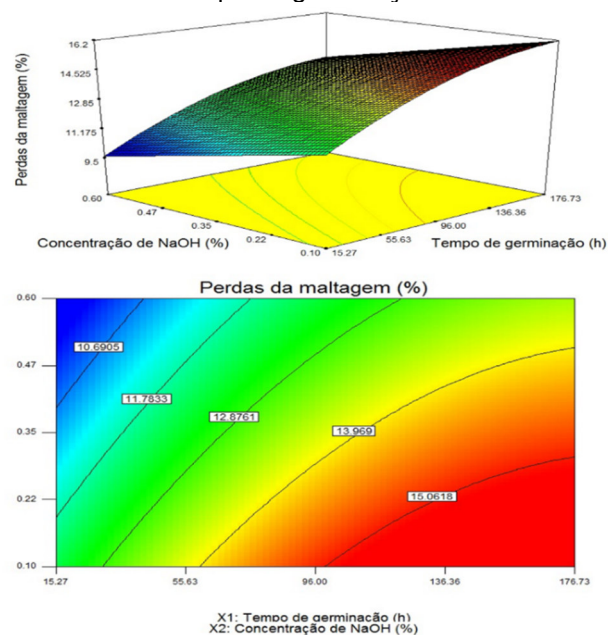
Ambas as variáveis independentes estudadas tiveram efeito linear sobre a resposta. O *FAN* aumentou com o decréscimo da concentração de NaOH e aumentou com o incremento do tempo de germinação. O maior valor de *FAN* pode ser obtido com as mínimas concentrações de NaOH e nas máximas horas de germinação estudadas. A influência do tempo de germinação sobre o *FAN*, é uma observação que está suportada por outros trabalhos (MORRALL; BOYD; TAYLOR, 1986b; BEKELE; BULTOSA; BELETE, 2012; DJAMEH et al., 2015).

A tendência observada no *FAN* semelhante à variação do *DP* com o tempo de germinação pode ser explicada porque ambas as respostas são dependentes da disponibilidade e atividade das enzimas em decompor o material insolúvel complexo em produtos solúveis simples. O aumento do *FAN* a partir das 96 h de germinação está de acordo com Nout e Davies (1980) que mostraram que a atividade proteolítica do malte de sorgo aumentou em até 7 dias de germinação. Também, Evans e Taylor (1990a) reportaram um incremento da atividade proteolítica com o tempo de germinação.

5.2.5.4 Perdas da maltagem

O efeito linear da concentração de NaOH e do tempo de germinação sobre as perdas da maltagem foi similar ao efeito sobre o *FAN* (Figura 14).

Figura 14 - Superfície de resposta e curva de contorno para as perdas do malte de sorgo em função da concentração de NaOH e o tempo de germinação



Fonte: Arquivo pessoal

As perdas decresceram com o incremento da concentração de NaOH e aumentaram com o incremento do tempo de germinação. As menores perdas da maltagem podem-se atingir com as máximas concentrações de NaOH e nos mínimos tempos de germinação. A relação direta entre o tempo de germinação e as perdas da maltagem tem sido encontrada em outros trabalhos (NOUT; DAVIES, 1980; MORRALL; BOYD; TAYLOR, 1986b).

5.2.6 Validação experimental

Como pode ser visto nos resultados anteriores, as condições que maximizam o poder diastático, o extrato em água quente e o nitrogênio amino livre são distintas às que minimizam as perdas da maltagem. Assim, foi realizado um estudo de otimização para obter as ótimas condições da maltagem que maximizam as três primeiras respostas e minimizam as perdas. Usando o programa *Design-Expert*, as condições ótimas obtidas foram 0,17% de NaOH, 39,81 h de imersão e 120,62 h (aproximadamente 5 dias) de germinação. A confiabilidade do método foi confirmada por experimentos adicionais realizados, usando as condições ótimas. O malte obtido sob essa condições é mostrado na Figura 15.

Figura 15 – Maltagem do sorgo nas condições ótimas



Fonte: Arquivo pessoal

A Tabela 11 mostra os valores previstos e experimentais. Não foram observadas diferenças significativas entre eles ($p > 0,05$). Portanto, a execução preditiva do modelo estabelecido pode ser considerada aceitável. As condições otimizadas foram usadas para a maltagem de quatro cultivares de sorgo. Sob essas condições, o *DP* o *HWE*, o *FAN* e as *MWL* oscilaram entre $34,48 \pm 1,64$ e $42,38 \pm 1,99$ °L, $320 \pm 3,00$ e $326,90 \pm 2,72$ °L/kg, $142,70 \pm 2,82$ e $148,63 \pm 1,23$ mg/L, e $14,27 \pm 1,06$ e $17,40 \pm 2,04\%$. (Tabela 12).

Tabela 11 - Valores preditos e experimentais das variáveis respostas na maltagem sob condições ótimas

Parâmetro	Condições	Valores	Valores
	otimizadas	experimentais	previstos
<i>DP</i> (°L)	$X_1 = 0,17\%$	$40,45 \pm 0,83$	38,60
<i>HWE</i> (°L/kg)	$X_2 = 39,81$ h	$324,37 \pm 1,98$	327,88
<i>FAN</i> (mg/L)	$X_3 = 120,62$ h	$148,98 \pm 1,59$	146,93
<i>MWL</i> (%)		$15,83 \pm 0,61$	15

DP: poder diastático; *HWE*: extrato em água quente; *FAN*: nitrogênio amino livre; *MWL*: perdas da maltagem; X_1 : concentração de NaOH; X_2 : tempo de imersão; X_3 : tempo de germinação.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 12 - Parâmetros de qualidade na maltagem de quatro cultivares de sorgo sob condições otimizadas

Cultivar	Parâmetros sob condições otimizadas			
	<i>DP</i> (°L)	<i>HWE</i> (°L/kg)	<i>FAN</i> (mg/L)	<i>MWL</i> (%)
1G244	$41,29 \pm 1,95$	$326,33 \pm 2,52$	$142,70 \pm 2,82$	$15,93 \pm 1,92$
1G100	$42,38 \pm 1,99$	$320,00 \pm 3,00$	$143,97 \pm 2,94$	$16,67 \pm 2,43$
CMXSX3000	$34,48 \pm 1,64$	$326,90 \pm 2,72$	$148,63 \pm 1,23$	$17,40 \pm 2,04$
50A70	$36,20 \pm 1,60$	$324,47 \pm 2,25$	$145,70 \pm 1,47$	$14,27 \pm 1,06$

DP: poder diastático; *HWE*: extrato em água quente; *FAN*: nitrogênio amino livre; *MWL*: perdas da maltagem.

Fonte: Arquivo pessoal

Esses valores são próximos aos previstos pelo modelo e não diferem muito entre si ($p > 0,05$). As condições ótimas, validadas experimentalmente neste trabalho, estão próximas daquelas reportadas na literatura. Por exemplo, foi encontrado que as cultivares de sorgo *ISCV* e *SS 20*, imersos por 44 h e germinados por 120 h a 30 °C, atingiram valores de 315 e 327 °L/kg, respectivamente, quando foi usado o método de decantação (AGU; PALMER, 1997b). Por outro lado, Lefyedi e Taylor (2006) recomendaram a imersão em 0,2% de NaOH para obter valores adequados de *DP*; além de ser um método controle

para a contaminação por bactérias e fungos durante a maltagem. No entanto, esses autores usaram um tempo de imersão menor de 24 h e um tempo de germinação de 144 h (6 dias) maior. Igualmente, com 0,2% de NaOH e entre 96 e 144 h de germinação Bekele et al. (2012) alcançaram os melhores valores de *DP*, *HWE*, *FAN* e *MWL*. No entanto, usaram 24 h de imersão. Assim, as condições de maltagem foram obtidas e validadas, e poderiam ser usadas como as condições padrões para maltagem do sorgo no processo de produção de cerveja.

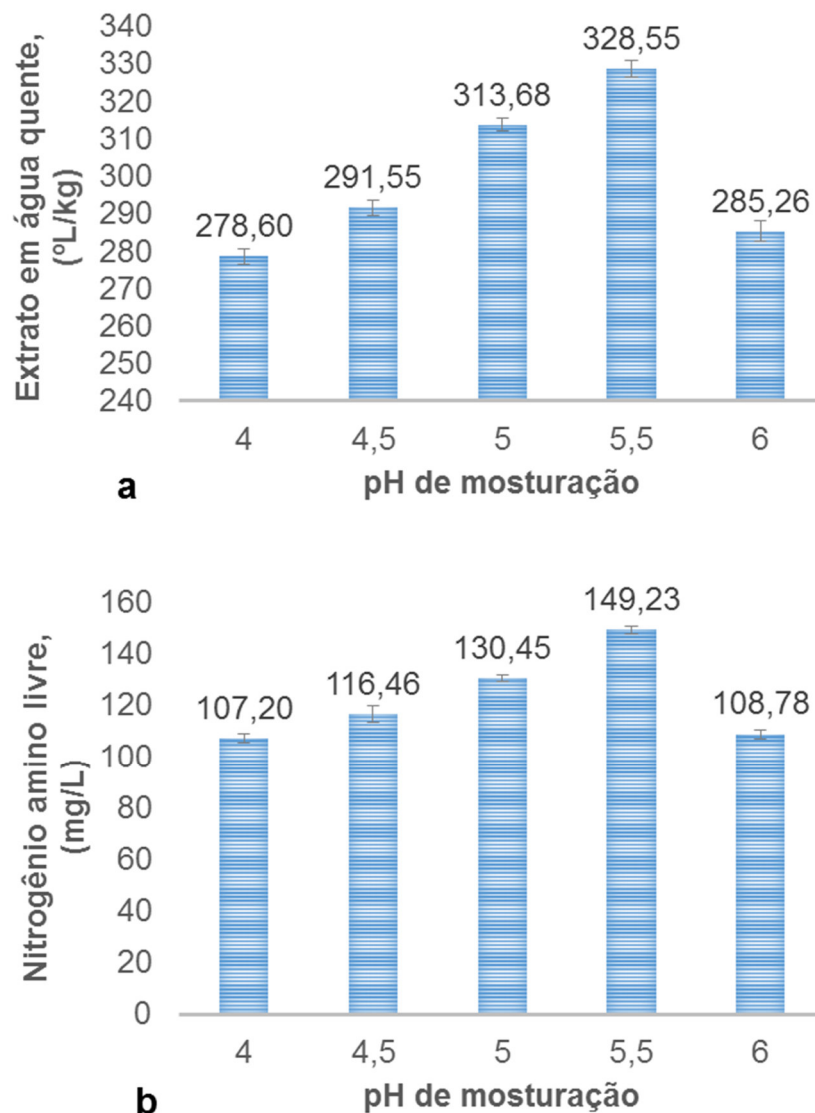
5.3 Otimização da etapa de mosturação do malte do cultivar 1G244

5.3.1 Seleção do pH e temperatura das proteases

Como visto anteriormente, os valores de qualidade do malte das quatro cultivares de sorgo, sob as condições otimizadas, estão próximos dos valores previstos pelo modelo. Assim, devido à sua disponibilidade foi escolhido a cultivar 1G244 para as etapas posteriores do presente estudo. Segundo Briggs (1998), um adequado extrato em água quente é uma indicação do progresso da modificação (quebra das reservas do endosperma, predominantemente pela atividade de amilase e protease) do malte durante a germinação. Assim, essas enzimas podem ser ativadas na etapa de mosturação. Por outro lado, tem sido notado que o pH e a temperatura ótimos para as proteases e carboxipeptidases do sorgo coincidiram com condições ótimas de mosturação para a produção do nitrogênio amino livre, quando se produz cerveja a partir do malte de sorgo (TAYLOR; BOYD, 1986).

Visando atingir os melhores parâmetros de qualidade, em termos de *HWE* e *FAN*, preliminarmente, foram avaliados o pH e a temperatura das enzimas proteolíticas, na mosturação. Com a ajuda do programa *IBM SPSS Statistics 20*, foi realizada a análise estatística. Os resultados mostraram que o pH e a temperatura das proteases tiveram um efeito significativo sobre ambas as respostas ($p < 0,05$). A Figura 16 mostra que os parâmetros de qualidade incrementaram com o aumento do pH até 5,5; para um valor mais elevado houve uma supressão tanto no *HWE* como no *FAN*, sugerindo que valores de pH diferentes ao propriamente citado não são capazes de ativar, adequadamente, todas as enzimas presentes no malte de sorgo do cultivar 1G244.

Figura 16 - Efeito do pH na mosturação sobre o extrato em água quente (a) e nitrogênio amino livre (b), fixando as temperaturas de proteases (45 °C), β -amilase (55 °C) e α -amilase (70 °C). As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).



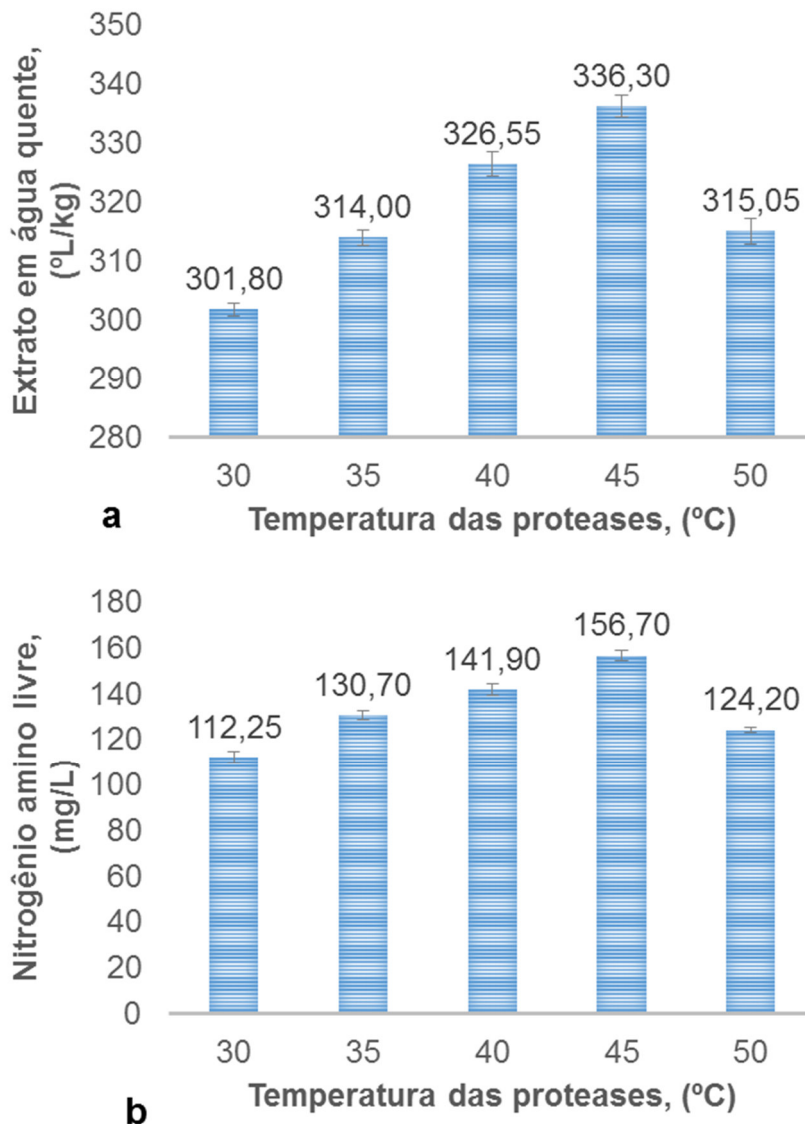
Fonte: Arquivo pessoal

Evan e Taylor (1990a) têm reportado que a atividade protease e carboxipeptidase, no malte de sorgo, tem um pH ótimo entre 4,25 e 4,50, e entre 4,00 e 5,25. Já Owuama (1997) destacou que a mosturação a pH 4,0, o qual é próximo ao pH ótimo da α -glicosidase ou maltase, produz mosto com uma relativa superior proporção de glicose do que a mosturação a pH entre 5,0 e 5,5. No entanto, Ogonna (2009) reportou que o ótimo pH para as enzimas α e β -amilase encontra-se entre 5,0 e 6,0. Outros autores reportaram como ótimo um pH entre 5,0 e 5,5 para ambas amilases no sorgo (EL-NOUR; YAGOUB, 2010). Assim, os argumentos anteriores justificam os resultados obtidos com o pH de 5,5, no

presente estudo, decorrente do pH apropriado para ativar todas as enzimas do malte, na etapa de mosturação.

Após otimizar o pH, o passo seguinte foi selecionar a temperatura adequada para a atividade proteolítica. A análise estatística mostrou que essa temperatura teve um efeito significativo sobre o *HWE* e sobre o *FAN* ($p < 0,05$). Como no estudo do pH, as variáveis respostas estudadas incrementaram com o aumento da variável independente, porém até 45 °C. Posteriormente, o seja, a 50 °C decresceram gradualmente (Figura 17). A temperatura ótima de 45 °C para as proteases foi similar à reportada por outros autores.

Figura 17 - Efeito da temperatura de atividade proteolítica sobre o extrato em água quente (a) e nitrogênio amino livre (b), fixando o pH (5,5), as temperaturas de β -amilase (55 °C) e α -amilase (70 °C). As barras verticais representam o desvio padrão ($n = 2$).



Por exemplo, é sabido que a temperatura ótima para proteases e peptidases (carboxipeptidases) (EVANS; TAYLOR, 1990a; EVANS; TAYLOR, 1990b) encontra-se entre 45 e 50 °C. Igualmente, tem sido recomendado a temperatura de 45 °C para iniciar a mosturação do malte de sorgo (PALMER; ETOKAKPAN; IGYOR, 1989).

No entanto, tem sido relatado que a mosturação foi iniciada com a temperatura de 30 °C para a atividade das enzimas proteolíticas (AGU; PALMER, 2013). Assim, foi selecionada como ótima a temperatura de 45 °C.

5.3.2 Seleção dos níveis dos fatores do DCCR

As amilases são enzimas sacarificantes importantes durante a mosturação (OWUAMA, 1997). Tanto as proteases quanto as amilases são reguladas pelo pH, temperatura e concentração do mosto (HOUGH; BRIGGS; STEVENS, 1971; OWUAMA, 1997).

Como a β -amilase é mais lábil do que α -amilase (NORRIS; LEWIS, 1965), buscou-se uma temperatura adequada, além da temperatura de sacarificação (63 – 65 °C), usada comumente na etapa de mosturação (PALMER, 1989; IGYOR; OGBONNA; PALMER, 2001), para iniciar a atividade a β -amilase antes da rampa assinalada. Deste modo, a metodologia de superfície de resposta foi baseada nas temperaturas das atividades das α e β -amilases.

5.3.2.1 Temperatura da atividade β -amilase

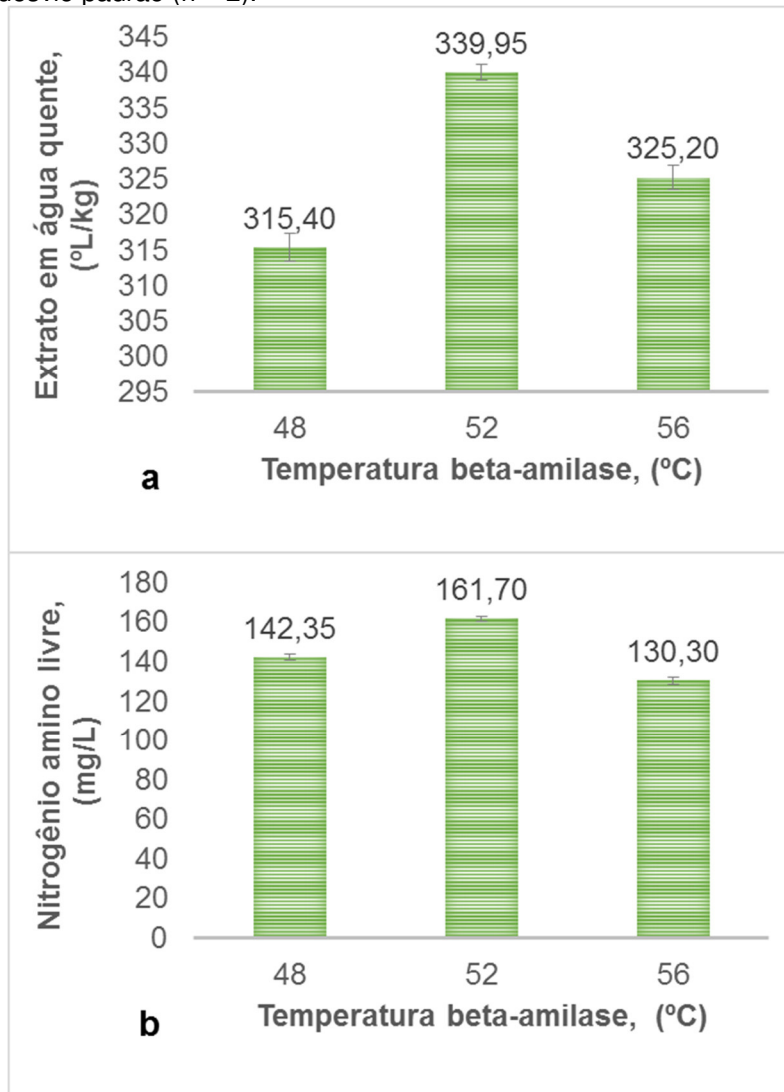
O estudo da MSR foi iniciado analisando um adequado intervalo de temperatura para a atividade β -amilase. Foram estudadas três diferentes temperaturas (48, 52 e 56 °C), mantendo constantes a temperatura da atividade da α -amilase (70 °C), e o pH (5,5) e a temperatura das proteases (45 °C), otimizados previamente.

Um efeito significativo ($p < 0,05$) da temperatura de atividade da β -amilase sobre o *HWE* e o *FAN* foi observado pela análise estatística. A temperatura de 52 °C forneceu os maiores valores de *HWE* (339,95 °L/kg) e *FAN* (161,70 mg/L) (Figura 18).

Além extrair os açúcares fermentáveis do mosto, essa temperatura é ideal para a proteólise. Por exemplo, Evans e Taylor (1990b) perceberam que 52 °C é

ótima para a produção de FAN na mosturação do malte de sorgo. Consequentemente, foi selecionado 50, 52 e 54 °C como o nível baixo, médio e alto, respectivamente.

Figura 18 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito da temperatura de atividade da β -amilase sobre extrato em água quente (a) e nitrogênio amino livre (b). As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).



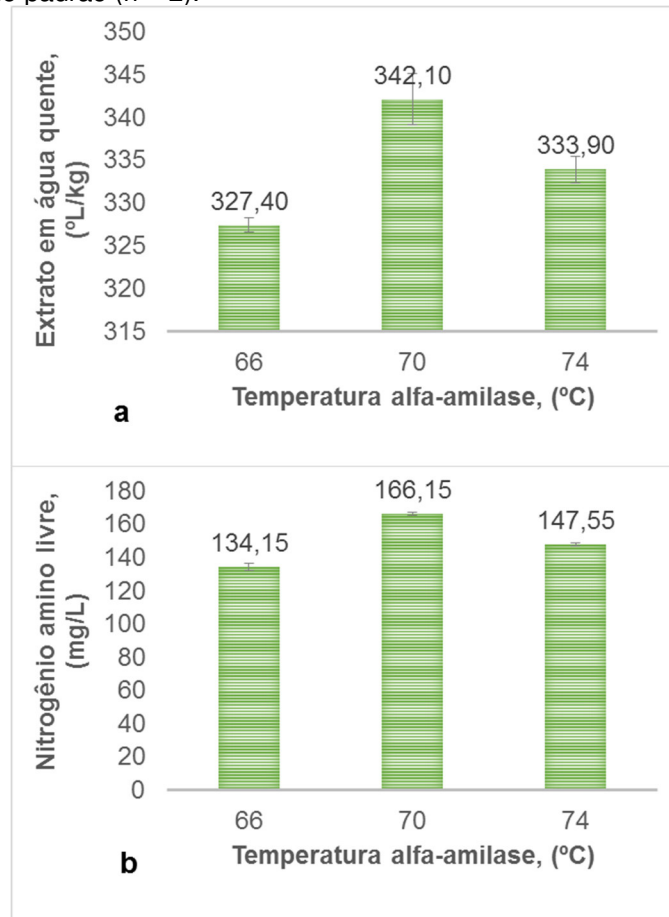
Fonte: Arquivo pessoal

5.3.2.2 Temperatura da atividade α -amilase

A seleção de um intervalo apropriado para a temperatura de atividade da α -amilase foi a próxima fase de estudo. As três diferentes temperaturas estudadas foram 66, 70 e 74 °C. Tanto a temperatura de atividade da β -amilase (55 °C) quanto o pH (5,5) e a temperatura de atividade proteolítica (45 °C), otimizados anteriormente, foram mantidos constantes. A análise estatística revelou um efeito significativo ($p < 0,05$) da temperatura de atividade da α -amilase sobre as duas

variáveis respostas. Os maiores valores de *HWE* (342,10 °L/kg) e de *FAN* (166,15 mg/L) foram atingidos na temperatura de 70 °C. (Figura 19). Assim, foi selecionado 68, 70 e 72 °C como o nível baixo, médio e alto, respectivamente, para a otimização.

Figura 19 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito da temperatura de atividade da α -amilase sobre extrato em água quente (a) e nitrogênio amino livre (b). As barras verticais representam o desvio padrão ($n = 2$).



Fonte: Arquivo pessoal

5.3.3 Metodologia de superfície de resposta

A Tabela 13 mostra que o extrato em água quente oscilou entre 289,00 e 357,56 °L/kg e o nitrogênio amino livre 128,12 e 175,31 mg/L durante a etapa de mosturação.

O valor mais alto do extrato em água quente foi obtido nas condições experimentais dos pontos axiais ($X_1 = 52,00$ e $X_2 = 72,83$), experimento n°. 8; no entanto o maior livre foi obtido em um dos pontos centrais ($X_1 = 52,00$ e $X_2 = 70,00$), experimento n°. 11.

Tabela 13 - Matriz (valores reais) do delineamento composto central rotacional e respostas observadas na etapa de mosturação.

No. ^a	RO ^b	Temperatura β -amilase (°C)	Temperatura α -amilase (°C)	HWE (°L/kg)	FAN (mg/L)
1	4	50	68	310,00	129,42
2	10	54	68	289,00	140,10
3	9	50	72	358,00	160,50
4	8	54	72	337,00	149,20
5	5	49,17	70	339,00	146,45
6	12	54,83	70	300,15	132,00
7	1	52	67,17	295,36	128,12
8	11	52	72,83	357,56	165,23
9	7	52	70	350,24	171,20
10	2	52	70	352,00	170,00
11	6	52	70	349,00	175,31
12	3	52	70	350,00	171,52
13	13	52	70	348,53	174,37

^aOrdem padrão; ^b Ordem de execução aleatório. HWE: extrato em água quente; FAN: nitrogênio amino livre

Fonte: Arquivo pessoal

5.3.4 Composição dos modelos

A seguir mostra-se as Equações 12 e 13 polinomiais de segunda ordem para o extrato em água quente e o nitrogênio amino livre, respectivamente. As equações foram geradas a partir da análise de regressão múltipla, em termos de valores codificados. A ANOVA é apresentada na Tabela 14. A significância de cada coeficiente foi determinada usando *F-test* e p-valor. A significância dos modelos e das variáveis foi avaliada segundo o $F_{\text{calculado}}$ e o p-valor. Como na otimização da maltagem, mostra-se a falta de ajuste, o coeficiente de determinação e o coeficiente de variação, como uma medida da qualidade dos modelos ajustados. Observa-se que o CV (0,69) do modelo do HWE foi menor com 10%. Igualmente, O alto $F_{\text{calculado}}$ do modelo (291,78) e uma baixa probabilidade p-valor (<0,0001) indica a alta significância do modelo. Os termos lineares (X_1 , X_2) e quadráticos (X_1^2 , X_2^2) tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) sob o extrato em água quente. No entanto, a interação (X_1X_2) não teve efeito significativo sobre a resposta. O R^2 (0,9952) do modelo predito foi alto. Além disso, o p-valor ($p = 0,0675$) indica que a falta de ajuste não foi significativa, indicando que esses valores são um bom ajuste para o modelo matemático da Eq. (12). O CV (2,38%) do modelo do FAN foi adequado. O modelo também foi altamente significativo ($p < 0,0001$), com um $F_{\text{calculado}}$ de 56,23. Como no HWE, os termos quadráticos (X_1^2 , X_2^2) tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre o nitrogênio amino livre. Diferentemente, só foi significativo um termo linear

(X_1), e a interação (X_1X_2) teve efeito significativo sobre a resposta. O R^2 (0,9757) e o p-valor (0,0789) da falta de ajuste do modelo predito também foram adequados.

$$Y_1 = 349,95 - 12,12X_1 + 23,00X_2 - 15,07 X_1^2 - 11,63 X_2^2 \quad (12)$$

$$Y_2 = 172,48 - 2,63X_1 + 11,58X_2 - 5,49X_1X_2 - 16,16 X_1^2 - 12,44 X_2^2 \quad (13)$$

Tabela 14 - Análise de variância para o modelo quadrático de superfície de resposta na mosturação

Fonte de variação	SQ	G L	QM	F calculado	p-valor
<i>HWE (°L/Kg)</i>					
Modelo	7645,20	5	1529,04	291,78	< 0,0001
X_1	1174,72	1	1174,72	224,17	< 0,0001
X_2	4230,35	1	4230,35	807,25	< 0,0001
$X_1 X_2$	0,00	1	0,00	0,00	1,0000
X_1^2	1579,62	1	1579,62	301,43	< 0,0001
X_2^2	940,33	1	940,33	179,44	< 0,0001
Resíduos	36,68	7	5,24		
<i>LF</i>	29,48	3	9,83	5,45	0,0675
Erro puro	7,21	4	1,80		
Total (corr.)	7681,89	12			
R^2	0,9952				
R^2A	0,9918				
CV (%)	0,69				
<i>FAN (mg/L)</i>					
Modelo	3822,21	5	764,44	56,23	< 0,0001
X_1	55,42	1	55,42	4,08	0,0833
X_2	1073,27	1	1073,27	78,94	< 0,0001
$X_1 X_2$	120,78	1	120,78	8,88	0,0205
X_1^2	1817,51	1	1817,51	133,68	< 0,0001
X_2^2	1076,33	1	1076,33	79,17	< 0,0001
Resíduos	95,17	7	13,60		
<i>LF</i>	74,88	3	24,96	4,92	0,0789
Erro puro	20,29	4	5,07		
Total (corr.)	3917,38	12			
R^2	0,9757				
R^2A	0,9584				
CV (%)	2,38				

SQ: soma de quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrados médios, *LF*: falta de ajuste; CV: coeficiente de variação. X_1 : temperatura de atividade da β -amilase; X_2 : temperatura de atividade da α -amilase.

Fonte: Arquivo pessoal

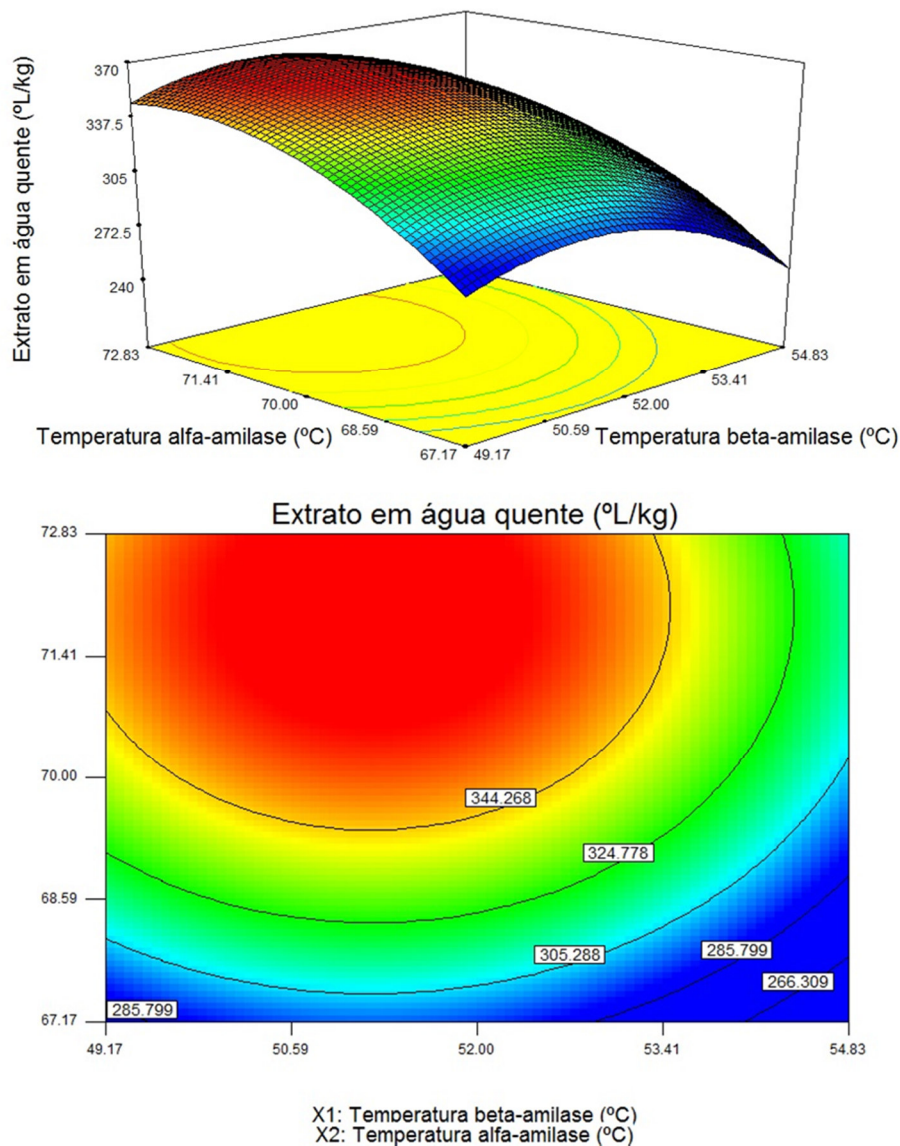
5.3.5 Análise das superfícies de respostas

5.3.5.1 Extrato em água quente

A Figura 20 apresenta a superfície de resposta e curva de contorno do efeito das duas variáveis independentes sobre o extrato em água quente. A temperatura

de atividade da β -amilase teve um efeito quadrático; no entanto o efeito quadrático da temperatura de atividade da α -amilase foi menos acentuado sobre a resposta. O *HWE* (~360 °L/kg) foi superior em temperaturas de atividade da β -amilase e da α -amilase entre 51 e 53 °C, e entre 70 e 72 °C, respectivamente.

Figura 20 - Superfície de resposta e curva de contorno para o extrato em água quente em função da temperatura alfa-amilase e o temperatura beta-amilase



Fonte: Arquivo pessoal

Como pode ser visto, a região ótima encontra-se próxima aos pontos centrais de ambas as temperaturas de atividade. Estes resultados estão em correspondência com o reportado na literatura. Por exemplo, Etokpan (1992) reportaram que a mosturação por decantação em quatro cultivares de sorgo, produziu valores de *HWE* (311 – 352 °L/kg) superiores do que a mosturação por

infusão na cevada, na qual o HWE foi de 301 °L/kg. No entanto, a decantação foi diferente à do presente estudo. As enzimas proteolíticas mostraram atividades em temperatura ambiente (± 30 °C) e, quando gelatinizado o amido, as enzimas amilolíticas foram ativas em 55 °C. A mosturação realizada por Agu e Palmer (2013) foi similar, no entanto ativaram as enzimas amilolíticas em 65 °C. Igualmente o *HWE* do mosto de sorgo, assinalado anteriormente, foi superior quando comparado com o *HWE* do mosto da cevada. No estudo de Etokpan (1992), é válido ressaltar que, no mosto de sorgo, a atividade da α -amilase foi maior do que da β -amilase quando comparado com o mosto de cevada. Assim, a concentração de maltose e maltotriose foi de 15 e de 14 – 16 mg/mL, no mosto de sorgo, e de 50 e 11 mg/mL, no mosto de cevada, respectivamente.

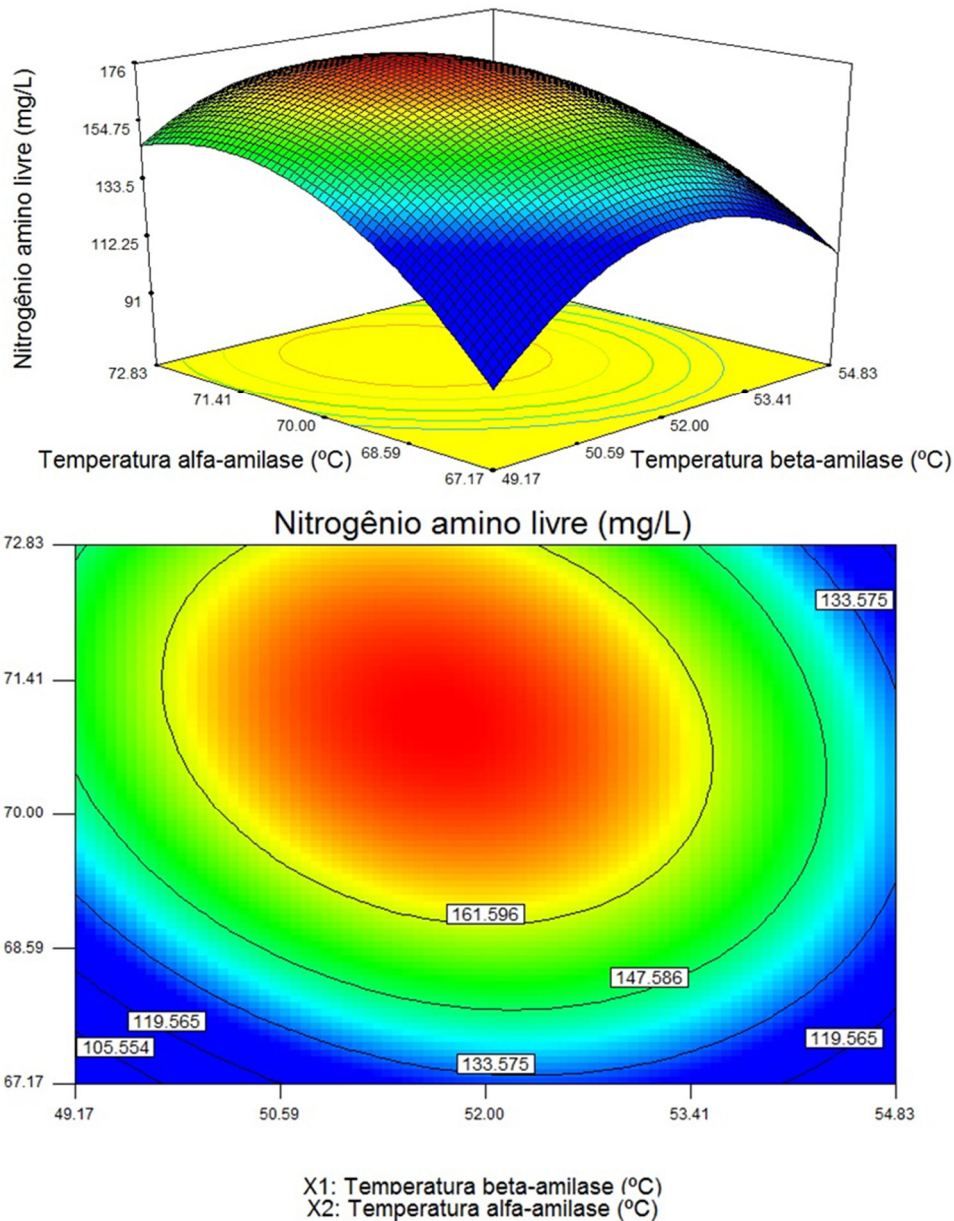
Segundo Egwim e Oloyede (2006), a temperatura e pH ótimos para ativar a α -amilase do sorgo são 70 °C e 5,8, respectivamente. Isto indica que temperaturas próximas favorecem a atividade das enzimas amilolíticas e, conseqüentemente, a produção de extrato, como demonstrado no presente estudo. Na produção de cerveja a partir de cevada, o pH do mosto geralmente está em uma faixa entre 5,4 e 5,7 (FOX et al., 2014). Este estudo demonstra que o pH ótimo do mosto de sorgo pode estar próximo ao pH ótimo do mosto de cevada. Assim, o alto valor de *HWE* atingido aqui pode ser decorrente da otimização prévia do pH (5,5) do mosto nos estudos preliminares.

5.3.5.2 Nitrogênio amino livre

O efeito das duas variáveis independentes sobre o nitrogênio amino livre pode ser visto a partir da superfície de resposta e curva de contorno (Figura 21). Ambas as variáveis independentes manifestaram um efeito quadrático sobre o *FAN*. Temperaturas de atividade da β -amilase e da α -amilase entre 51 e 53 °C, e entre 70 e 72 °C, respectivamente, levaram a os máximos valores de *FAN* (~175 mg/L), como do extrato em água quente. Como no *HWE*, a região ótima encontra-se próxima aos pontos centrais de as temperaturas de atividade da β -amilase e da α -amilase. O similar comportamento no *HWE* e no *FAN* pode ser devido a que, próximo a 50 °C, podem-se ativar, juntamente as enzimas proteolíticas e a β -amilase, resultando na produção de amino ácidos livres e de açúcares fermentáveis. Uma temperatura de atividade de proteases comerciais de 55 °C foi usada por Odibo et al. (2002), e o mosto das cultivares de sorgo *SK 5912* e *Fara*

fara atingiram valores de açúcares redutores totais e de *FAN* de 120 µg/mL e 144 mg/L e de 124 µg/mL e 138 mg/L, respectivamente.

Figura 21 - Superfície de resposta e curva de contorno para o nitrogênio amino livre em função da temperatura alfa-amilase e o temperatura beta-amilase



Fonte: Arquivo pessoal

A mosturação realizada por Etokakpan (1992) forneceu extratos superiores no mosto de sorgo do que no mosto da cevada e proporcionou também maiores valores de *FAN* (141 – 160 mg/L), no mosto de sorgo, do que no *FAN* (135 mg/L), no mosto de cevada. A otimização da mosturação no presente estudo atingiu melhores resultados, conseguindo um valor de *FAN* superior. O nitrogênio amino

livre é um importante parâmetro de qualidade do mosto e das cervejas. Geralmente, para um mosto de malte de cevada de 12 °P, o conteúdo de *FAN* não deve ser inferior a 150 mg/L para uma adequada fermentação, já que uma quantidade baixa de *FAN* promove a superprodução de fermentação por produtos como álcoois superiores (KUNZE, 2004).

5.3.6 Validação experimental

Nota-se que similares condições experimentais maximizam tanto o *HWE* quanto o *FAN*, na etapa de mosturação. No entanto, foi realizado um estudo de otimização numérica, como no processo de maltagem, para obter as condições ótimas que maximizam as duas respostas. De acordo com o programa *Design-Expert*, para obter o máximo *HWE* (359,25 °L/kg) e o máximo *FAN* (175,56 mg/L), as condições ótimas para as atividades das enzimas β -amilase e α -amilase são 51,72 e 70,89 °C, respectivamente. Para confirmar a confiabilidade do método, usaram-se as condições ótimas, oferecidas pelo programa, em experimentos adicionais. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores previstos e experimentais (Tabela 18). Assim, o modelo estabelecido pode se considerar aceitável.

Tabela 15 - Valores preditos e experimentais das variáveis respostas na mosturação sob condições ótimas

Parâmetro	Condições ótimas	Valores experimentais	Valores previstos
Extrato em água quente (°L/kg)	$X_1 = 51,72$ °C	357,00±2,83	359,44
Nitrogênio amino livre (mg/L)	$X_2 = 70,89$ °C	171,65±2,33	175,44

X_1 : temperatura de atividade da β -amilase; X_2 : temperatura de atividade da α -amilase.

Fonte: Arquivo pessoal.

Conforme Owuama e Okafor (1987), a mosturação consiste em (a) dissolução das substâncias solúveis em água, (b) atividade enzimática seguida pela solução de uma série de substâncias importantes para o tipo e característica da cerveja e (c) separação das substâncias dissolvidas. Mediante a otimização dessa etapa, os adequados resultados do *HWE* e *FAN*, sob condições ótimas, mostram que foram atingidos esses objetivos. As condições ótimas, validadas experimentalmente, obtidas neste trabalho, estão em correspondência com a literatura para mosturação do malte de sorgo. Por exemplo, El-Nour e Yagoub

(2010) reportaram para β -amilase e a α -amilase temperaturas ótimas de 50 e 70 °C. Além disso, uma parte do *FAN* é produzido durante a mosturação a 51 °C (TAYLOR; BOYD, 1986). Tem sido reportado temperaturas ótimas para β -amilase (60 – 65 °C) e para a α -amilase (72 – 75 °C) (OGBONNA, 2009).

Nota-se que a faixa de temperatura para a β -amilase está mais afastada do que a temperatura obtida nas condições ótimas; mas, no presente trabalho, usou-se a temperatura de 65 °C, utilizada tanto na mosturação por infusão quanto por decantação, como a temperatura intermédia entre ambas as enzimas. Usando o método de decantação, Nso et al. (2003) reportaram que o cultivar S.35 produziu um *HWE* de 334,0 °L/kg e um *FAN* de 133 mg/L. Os autores apenas usaram uma rampa de 45 °C por 1 h, antes de gelatinização do amido, e 60 °C por 1 h para a sacarificação. No presente estudo os valores de *HWE* (354,0 °L/kg) e de *FAN* (171,65 mg/L) alcançados foram superiores, devido a otimização das temperaturas de ambas as enzimas assinaladas.

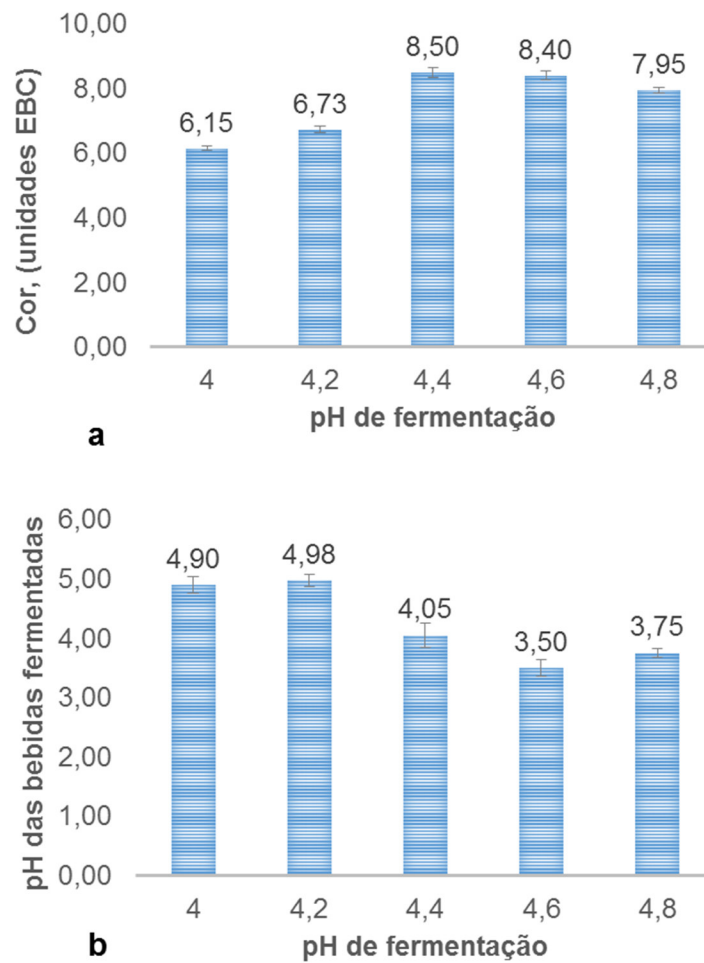
5.4 Otimização da etapa de fermentação do mosto do cultivar 1G244

5.4.1 Seleção do pH de fermentação e do tempo de maturação

Foram realizados estudos preliminares para determinar o melhor pH de fermentação e o melhor tempo de maturação exigidos para atingir os máximos parâmetros de qualidade da etapa. A análise estatística foi realizada usando o programa *IBM SPSS Statistics 20*. Os resultados mostraram que o pH de fermentação teve um efeito significativo sobre a cor e o pH das bebidas fermentadas ($p < 0,05$). Nota-se, a partir da Figura 22, que a cor incrementou com o incremento do pH de fermentação até 4,4, decrescendo gradualmente com o incremento da variável independente.

Por outro lado, o pH das bebidas mostrou um ligeiro aumento com o aumento do pH da fermentação desde 4,0 até 4,2, começando a decrescer até o pH de 4,6, com pouco aumento até pH 4,8. A redução no pH ao longo do processo fermentativo é decorrente da produção de ácidos orgânicos, como ácido láctico, acético e succínico (BRIGGS et al., 2004b). Carvalho e Zambiasi 2011 (2011) reportaram para cervejas *pilsen* um pH de 4,32. Neste estudo, foi selecionado como ótimo, o pH de 4,4 para conduzir a fermentação pelas leveduras.

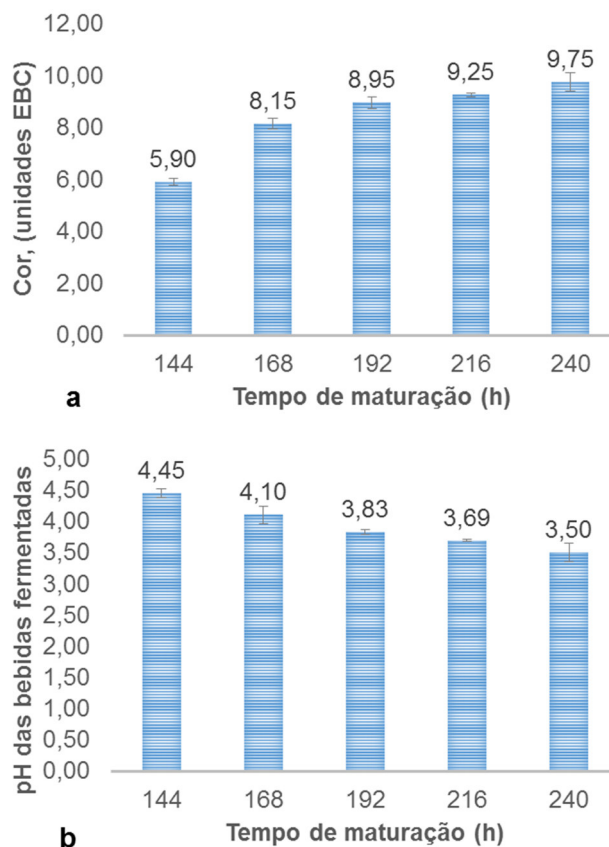
Figura 22 - Efeito do pH de fermentação sobre a cor (a) e pH das bebidas fermentadas (b), usando 120 h e 9 °C na fermentação e 168 h de maturação. As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).



Fonte: Arquivo pessoal

A seguinte etapa foi a seleção de um tempo adequado de maturação. Em seu conceito clássico, a fermentação e a maturação são consideradas etapas separadas na produção de cerveja. No entanto, ela também é considerada como uma fermentação secundária, a qual inclui todas as transformações entre o fim da fermentação primária e a filtração final da cerveja (MASSCHELEIN, 1986). Os resultados mostraram que a cor da bebida incrementou com o aumento do tempo de maturação desde 144 até 240 h. Já o pH das bebidas decresceu com o acréscimo da variável independente (Figura 23).

Figura 23 - Efeito do tempo de maturação sobre a cor (a) e pH das bebidas fermentadas (b), usando pH 4,4, 120 h e 9 °C na fermentação. As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).



Fonte: Arquivo pessoal

A análise estatística revelou que o tempo de maturação teve um efeito significativo sobre os parâmetros de qualidade estudados ($p < 0,05$). Apesar de o pH das bebidas fermentadas foi maior (4,45) com 144 h de maturação, a maior cor (9,75 unidades *EBC*) obtida foi com 240 h (10 dias) de maturação. Portanto, o tempo selecionado para maturar as bebidas foi de 240 h.

Embora, usando leveduras de alta fermentação, cervejas obtidas, a partir de malte de teff tem sido maturadas por 10 dias, atingindo valores similares de cor (9,8 unidades *EBC*) e de pH (4,23), valores próximos aos do presente estudo (DIGHIONNO et al., 2017). Um tempo de maturação maior (30 dias) foi usado para uma cerveja *lager* (POPESCU et al., 2013); a cor (11 – 17 unidades *EBC*) foi maior do que no presente estudo, no entanto o pH (4,1 – 4,3) foi próximo. Apesar de terem sido avaliadas, na produção de cerveja *lager*, respostas diferentes da cor e do pH das bebidas, o tempo de fermentação, 288 h (12 dias) não foi muito afastado do melhor tempo de fermentação obtido no presente estudo (LIN et al., 2014).

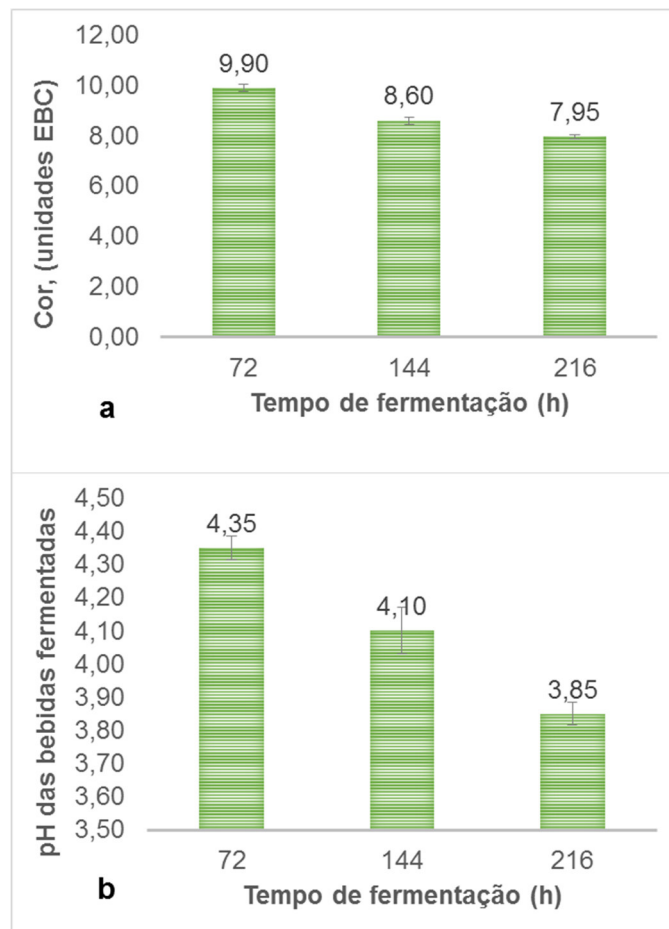
5.4.2 Seleção dos níveis dos fatores do DCCR

O tempo e a temperatura de fermentação são parâmetros chave no desenvolvimento da etapa (DAS et al., 2015). Assim, essas duas variáveis independentes foram selecionadas para o delineamento na MSR.

5.4.2.1 Tempo de fermentação

A primeira etapa consistiu em selecionar um adequado intervalo para tempo de fermentação. Os experimentos foram realizados com diferentes tempos (72, 144 e 216 h). Foram mantidos constantes a temperatura de fermentação (9 °C), e pH (4,4) e o tempo de maturação (240 h), otimizados nos estudos preliminares. A Figura 24 mostra que a maior cor (9,9 unidades *EBC*) e o maior pH (4,4) foram obtidos às 72 h de fermentação.

Figura 24 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito do tempo de fermentação sobre a cor (a) e o pH das bebidas fermentadas (b). As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).



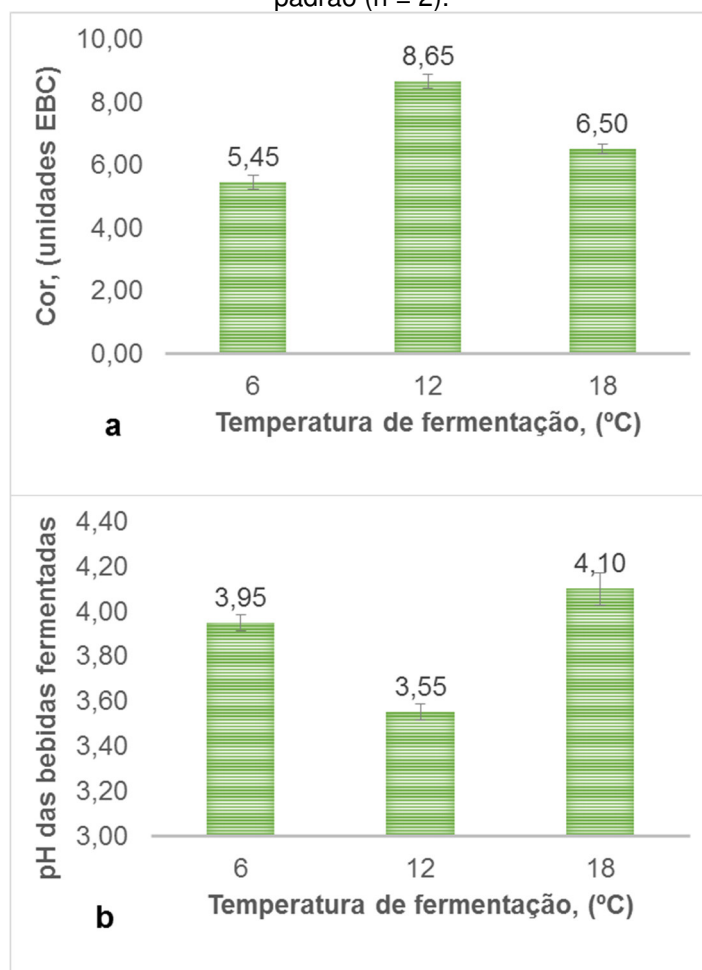
Fonte: Arquivo pessoal

No entanto, apesar de atingir a maior cor e o maior pH com 72 h, os valores sucessivos desses parâmetros podem ser considerados aceitáveis. Por exemplo, Lyumugabe et al. (2012) utilizaram um pH entre 3,3 e 4,0 em cervejas de sorgo. Assim, tendo em consideração os argumentos anteriores, foi selecionado 72, 120 e 168 h como o nível baixo, médio e alto, respectivamente, para a otimização do tempo de fermentação.

5.4.2.2 Temperatura de fermentação

A escolha de um intervalo adequado para a temperatura de fermentação foi segunda etapa, na seleção dos níveis dos parâmetros da fermentação na MSR. As três diferentes temperaturas estudadas foram 6; 12 e 18 h (Figura 25).

Figura 25 - Experimentos com um único fator mostrando o efeito da temperatura de fermentação sobre a cor (a) e o pH das bebidas fermentadas (b). As barras verticais representam o desvio padrão (n = 2).



Fonte: Arquivo pessoal

O tempo de fermentação (120 h) foi mantido constante, igualmente o pH (4,4) e o tempo de maturação (240 h), otimizados previamente. A análise estatística revelou um efeito significativo ($p < 0,05$) da temperatura de fermentação sobre a cor e o pH das bebidas. A cor aumentou desde 5,45 até 8,65 unidades *EBC*, entre 6 e 12 °C; após dessa temperatura, decresceu.

Nessa mesma faixa de temperatura, o pH das bebidas fermentadas decresceu desde 3,95 até 3,55, e logo aumentou. Os maiores valores de cor (8,65 unidades *EBC*) e de pH (4,10) foram obtidos com 12 e 18 °C, respectivamente. Portanto, foi selecionado 9, 12 e 15 °C como o nível baixo, médio e alto, respectivamente, para a otimização da temperatura de fermentação.

5.4.3 Metodologia de superfície de resposta

Apresenta-se as condições experimentais e as respostas observadas na fermentação (Tabela 16). Observa-se que o teor alcoólico, o Yp/s , Qp , o *RDF*, a cor, o pH e o *FAN* oscilaram entre 2,00 e 2,74 %, v/v, 0,33 e 0,48 g/g, 0,10 e 0,30 g/L.h, 66,66 e 79,20%, 6,18 e 9,78 unidades *EBC*, 3,2 e 3,9, e 18,40 e 42,10 mg/L, respectivamente. Foram obtidos, sob condições experimentais de $X_1 = 168$ h e $X_2 = 15$ °C (experimento n° 4), os mais altos valores de etanol (2,74 %, v/v) e Yp/s (0,48 g/g), enquanto a maior a produtividade volumétrica (0,30 g/L.h) e a cor (9,78 unidades *EBC*) foram atingidas com $X_1 = 52,12$ h e $X_2 = 12$ °C (experimento n° 5). O pH (3,9) foi superior tanto com $X_1 = 168$ h e $X_2 = 9$ °C (experimento n° 2) quanto com $X_1 = 120$ e $X_2 = 7,76$ °C (experimento n° 7). Já os menores valores do grau real de fermentação (66,66%) e de *FAN* (18,40 mg/L) foram obtidos sob condições experimentais de $X_1 = 168$ h e $X_2 = 15$ °C (experimento n° 4).

5.4.4 Composição dos modelos

As seguintes equações polinomiais de segunda ordem, com variáveis codificadas, para o etanol (Eq. (14)), fator de conversão de substrato em produto (Eq. (15)), produtividade volumétrica (Eq. (16)), grau real de fermentação (Eq. (17)), cor (Eq. (18)), pH (Eq. (19)) e nitrogênio amino livre (Eq. (20)) foram geradas a partir da análise de regressão múltipla, considerando os dados experimentais.

$$Y_1 = 2,41 + 0,18X_1 + 0,097X_2 - 0,058 X_1^2 + 0,10 X_2^2 \quad (14)$$

$$Y_2 = 0,36 + 0,031X_1 + 0,029X_2 + 0,032 X_2^2 \quad (15)$$

$$Y_3 = 0,14 - 0,068X_1 + 8,536E - 003X_2 + 0,033 X_1^2 + 0,018 X_2^2 \quad (16)$$

$$Y_4 = 77,47 + 0,18X_1 - 0,61X_2 - 2,06X_1X_2 - 4,40 X_1^2 - 3,96 X_2^2 \quad (17)$$

$$Y_5 = 9,44 - 1,28X_1 + 0,12X_2 - 0,75 X_1^2 - 0,69 X_2^2 \quad (18)$$

$$Y_6 = 3,34 + 0,000X_1 - 0,15X_2 + 0,22 X_1^2 + 0,17 X_2^2 \quad (19)$$

$$Y_7 = 23,97 - 6,02 - 4,84X_2 + 4,39 X_1^2 + 2,20 X_2^2 \quad (20)$$

A ANOVA foi realizada para testar se as equações anteriores irão descrever a variabilidade nas variáveis respostas. Os resultados do ajuste dos modelos quadráticos aos dados são mostrados na Tabela 15. A significância de cada coeficiente foi determinada usando *F-test* e p-valor.

A Tabela 17 apresenta a significância dos modelos e das variáveis, segundo o $F_{\text{calculado}}$ e o p-valor. Além disso, como uma medida da qualidade dos modelos ajustados, também mostra a falta de ajuste, o coeficiente de determinação e o coeficiente de variação. Desta forma, pode-se verificar a adequação dos modelos e a reprodutibilidade dos mesmos.

A ANOVA mostra que o CV dos modelos da fermentação foi menor que 10%, como esperado. O $F_{\text{calculado}}$ do modelo de 67,91 com uma baixa probabilidade p-valor ($<0,0001$) para o etanol indica a alta significância do modelo. Existe possibilidade de 0,01% de que um valor $F_{\text{calculado}}$ tão grande do modelo pudesse ocorrer devido ao ruído. Os termos lineares (X_1 , X_2) e quadráticos (X_1^2 , X_2^2) tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre o teor alcoólico. Já a interação (X_1X_2) não teve efeito significativo sobre a resposta. O R^2 (0,9798) do modelo predito foi alto. Por outro lado, o p-valor ($p = 0,1412$) da falta de ajuste foi não significativa indicando que esses valores são um bom ajuste para o modelo matemático da Eq. (14).

Tabela 16 - Matriz (valores reais) do delineamento composto central rotacional e respostas observadas na etapa de fermentação

No. ^a	RO ^b	X ₁ (h)	X ₂ (°C)	Y ₁ (%, v/v)	Y ₂ (g/g)	Y ₃ (g/L.h)	Y ₄ (%)	Y ₅ (u. <i>EBC</i>)	Y ₆	Y ₇ (mg/L)
1	3	72	9	2,18	0,33	0,24	69,24	8,90	3,80	42,10
2	11	168	9	2,57	0,39	0,12	73,09	6,35	3,90	27,20
3	13	72	15	2,43	0,39	0,27	71,06	9,65	3,60	32,00
4	6	168	15	2,74	0,48	0,13	66,66	7,03	3,50	18,40
5	12	52,12	12	2,00	0,33	0,30	67,09	9,78	3,80	40,35
6	2	187,88	12	2,54	0,40	0,10	68,47	6,18	3,80	26,43
7	4	120	7,76	2,46	0,39	0,16	68,75	8,25	3,90	36,00
8	5	120	16,24	2,71	0,45	0,18	68,57	7,93	3,50	22,00
9	7	120	12	2,42	0,35	0,15	76,50	9,60	3,30	24,00
10	9	120	12	2,45	0,34	0,11	79,20	9,50	3,40	25,04
11	10	120	12	2,38	0,36	0,16	78,77	9,56	3,20	23,00
12	8	120	12	2,41	0,39	0,14	76,70	9,42	3,30	25,50
13	1	120	12	2,40	0,35	0,12	76,20	9,14	3,50	22,30

^aOrdem padrão; ^b Ordem de execução aleatório. X₁: tempo; X₂: temperatura; Y₁: etanol; Y₂: fator de conversão de substrato em produto; Y₃: produtividade volumétrica, Y₄: grau real de fermentação; Y₅: cor; Y₆: pH; Y₇: nitrogênio amino livre.

Fonte: Arquivo pessoal.

Um valor de 12,97 para o $F_{\text{calculado}}$ e um p-valor de 0,0020 indicam a significância do modelo do fator de conversão de substrato em produto. Como no etanol, a interação (X_1X_2) não teve efeito significativo sobre o Yp/s , e todos os termos lineares (X_1, X_2) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$); no entanto, diversamente ao teor alcoólico, só foi significativo um termo quadrático (X_2^2). Isto sugere um bom ajuste ao modelo matemático da Eq. (15), o R^2 (0,9026) do modelo predito, superior a 0,75, e o p-valor da falta de ajuste (0,5484). O modelo da produtividade volumétrica foi altamente significativo ($p < 0,0001$), com um $F_{\text{calculado}}$ de 35,20. Como no caso do teor alcoólico e no fator de conversão de substrato em produto, a interação (X_1X_2) não teve efeito significativo. Mas, os termos quadráticos (X_1^2, X_2^2) se tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre a Qp , como no etanol. Diversamente às duas respostas anteriores, só foi significativo um termo linear (X_1). O R^2 (0,9618) e o p-valor (0,9543) da falta de ajuste do modelo predito também foram apropriados.

Em relação ao grau real de fermentação, o modelo foi significativo ($p < 0,0006$), com um $F_{\text{calculado}}$ de 18,96. Contrário ao etanol, ao Yp/s , e à Qp , a interação (X_1X_2) teve efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a resposta. Do mesmo modo, como no etanol e na produtividade volumétrica, os termos quadráticos (X_1^2, X_2^2) tiveram efeitos significativos sobre o RDF . Aqui, os termos lineares não foram significativos. O alto R^2 de 0,9312 e o p-valor de 0,3161 da falta de ajuste indicam o bom ajuste do modelo na Eq. (17). Para a cor, o $F_{\text{calculado}}$ do modelo foi de 47,16 com uma baixa probabilidade, p-valor ($< 0,0001$), indicando a alta significância do mesmo. O termo linear (X_1) e os termos quadráticos (X_1^2, X_2^2) tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) sob a resposta; a interação (X_1X_2) não teve efeito significativo. Foram adequados o R^2 (0,9712) do modelo e o p-valor ($p = 0,0908$) da falta de ajuste. Igualmente, o modelo do pH mostrou uma alta significância, com um $F_{\text{calculado}}$ de 15,82 e p-valor de 0,0011. Não tiveram efeito significativo sobre a resposta o termo (X_1) e a interação (X_1X_2). O R^2 de 0,9187 e o p-valor de 0,9361 da falta de ajuste indicam o bom ajuste do modelo na Eq. (19). O modelo do FAN foi altamente significativo ($p < 0,0001$), com um alto $F_{\text{calculado}}$ de 43,53. Os termos lineares (X_1, X_2) e quadráticos (X_1^2, X_2^2) tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) sob o nitrogênio amino livre; no entanto a interação (X_1X_2) não foi significativa ($p > 0,05$). O R^2 de 0,9688 e o p-valor de 0,2073 da falta de ajuste do modelo predito também foram apropriados.

Tabela 17 - Análise de variância para os modelos da fermentação

SV	DF	Y1		Y2		Y3		Y4		Y5		Y6		Y7	
		(% v/v)		(g/g)		(g/L.h)		(%)		(u. EBC)				(mg/L)	
		F	P	F	P	F	p	F	P	F	P	F	p	F	p
M	5	67,91	<0,0001*	12,97	0,0020*	35,20	<0,0001*	18,96	0,0006*	47,16	<0,0001*	15,82	0,0011*	43,53	<0,0001*
X ₁	1	202,63	<0,0001*	22,74	0,0020*	139,20	<0,0001*	0,099	0,7627	157,97	<0,0001*	0,00	1,0000	100,10	<0,0001*
X ₂	1	56,60	0,0001*	20,23	0,0028*	2,20	0,1814	1,18	0,3131	1,40	0,2758	20,81	0,0026*	64,59	<0,0001*
X ₁ X ₂	1	1,21	0,3076	0,66	0,4432	0,38	0,5582	6,83	0,0347*	0,017	0,9003	1,22	0,3050	0,15	0,7139
X ₁ ²	1	17,63	0,0040*	0,46	0,5192	29,06	0,0010*	54,12	0,0002*	46,55	0,0002*	40,31	0,0004*	46,34	0,0003*
X ₂ ²	1	52,24	0,0002*	21,23	0,025*	8,76	0,0211*	43,81	0,0003*	39,80	0,0004*	23,91	0,0018*	11,60	0,0114*
R	7														
LF	3	3,27	0,1412	0,82	0,5484	0,10	0,9543	1,63	0,3161	4,48	0,0908	0,13	0,9361	2,41	0,2073
EP	4														
TC	12														
R ²			0,9798		0,9026		0,9618		0,9312		0,9712		0,9187		0,9688
R ² A			0,9654		0,8330		0,9344		0,8821		0,9506		0,8607		0,9466
CV			1,49		4,85		9,70		2,18		3,37		2,53		6,07

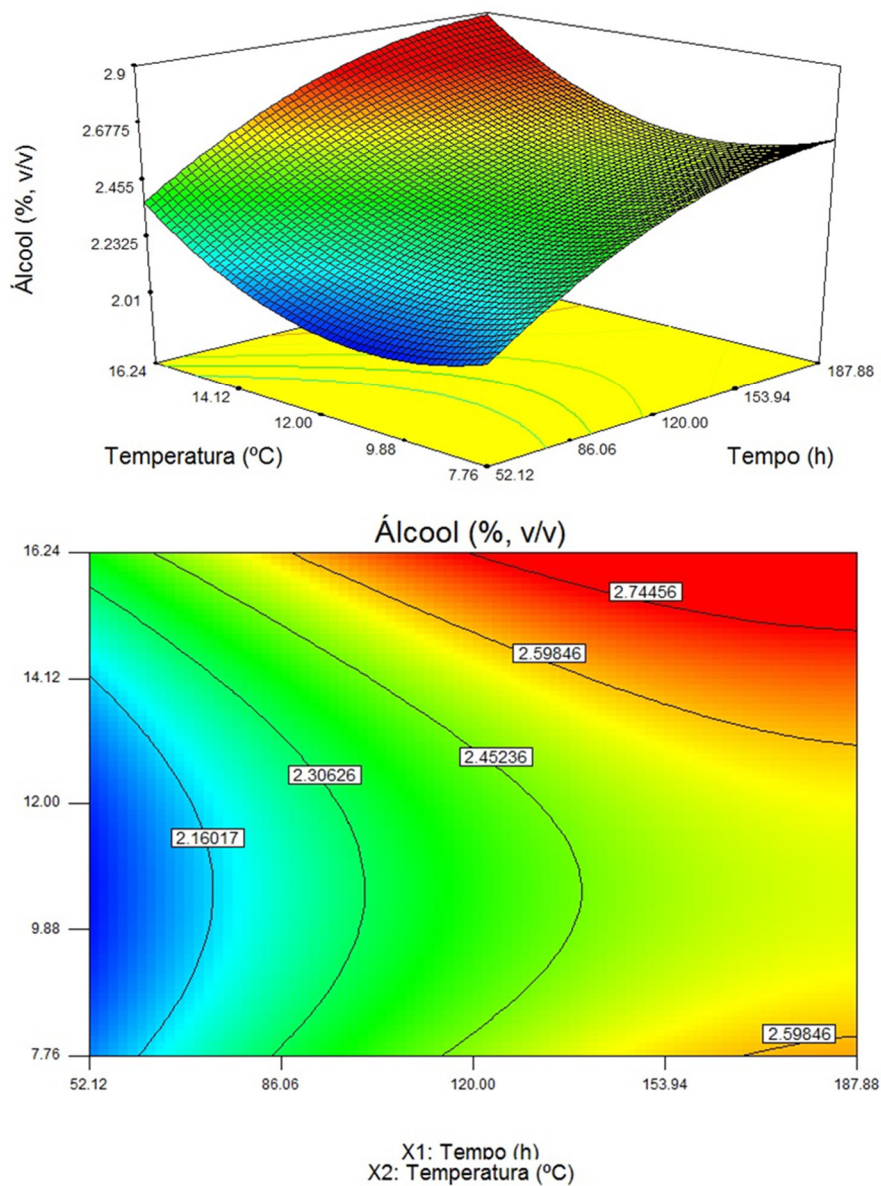
*Indica fatores significativos ($p < 0,05$). Y₁: etanol; Y₂: fator de conversão de substrato em produto; Y₃: produtividade volumétrica, Y₄: grau real de fermentação; Y₅: cor; Y₆: pH; Y₇: nitrogênio amino livre. SV: fonte de variação; M: modelo; R: resíduos; LF: falta de ajuste; EP: erro puro; TC: total corrigido; R²: coeficiente de determinação; R²A: coeficiente de determinação ajustado; CV: coeficiente de variação; DF: graus de liberdade; u. EBC: unidades EBC.
Fonte: Arquivo pessoal

5.4.5 Análise das superfícies de respostas

5.4.5.1 Etanol

A Figura 26 descreve a superfície de resposta e curva de contorno do efeito do tempo e da temperatura de fermentação sobre o etanol. As duas variáveis independentes demonstraram efeito diferentes sobre o etanol.

Figura 26 - Superfície de resposta e curva de contorno para o etanol em função do tempo e da temperatura de fermentação



Fonte: Arquivo pessoal

O tempo de fermentação demonstrou efeito linear sobre a resposta. Já a temperatura demonstrou efeito quadrático. A concentração do etanol aumentou com o aumento do tempo, e foi maior nas temperaturas dos pontos axiais quando comparada com a temperatura do ponto central. Como pode ser visto, a região ótima encontra-se entre as 120 e 188 h, e entre 14,12 e 16,24 °C.

As cervejas *lager* geralmente contêm aproximadamente 5% de álcool (DAS et al., 2015). O baixo teor alcoólico foi apropriado considerando o extrato do mosto (aproximadamente 6,62 °P). Estes resultados estão em correspondência com as cervejas de sorgo tradicionais Africanas. Segundo Lyumugabe (2012), geralmente, essas cervejas contêm um teor de álcool baixo (2 – 4,5% (v/v)). Por exemplo, a cerveja *Ikigage* contém aproximadamente, 2,2% (v/v), enquanto a *Merissa* tem 5% (v/v). No entanto, a fermentação deste tipo de cerveja é realizada em temperaturas ambiente (± 28 °C) por 96 e 40 h, respectivamente, devido ao tipo de fermento usado. No entanto, tem-se reportado valores de álcool entre 2,72 e 3,24 % v/v em bebidas fermentadas de sorgo (EBBAH et al., 2015).

Por outro lado, cervejas sem glúten, com teores alcoólicos um pouco superiores, tem sido elaboradas. Por exemplo, cervejas de malte de teff e de malte de arroz tem atingido teores de 4,68 e 5,08 (% v/v), fermentadas por leveduras de alta fermentação a 20 e 22 °C, respectivamente, ambas por 144 h (DIGHIONNO et al., 2017; CECCARONI et al., 2019). Já teores de álcool entre 3,4 e 3,9% em cervejas light Romênicas, feitas com cevada, tem sido reportados (POPESCU et al., 2013); a fermentação foi conduzida a 10 °C por 15 dias.

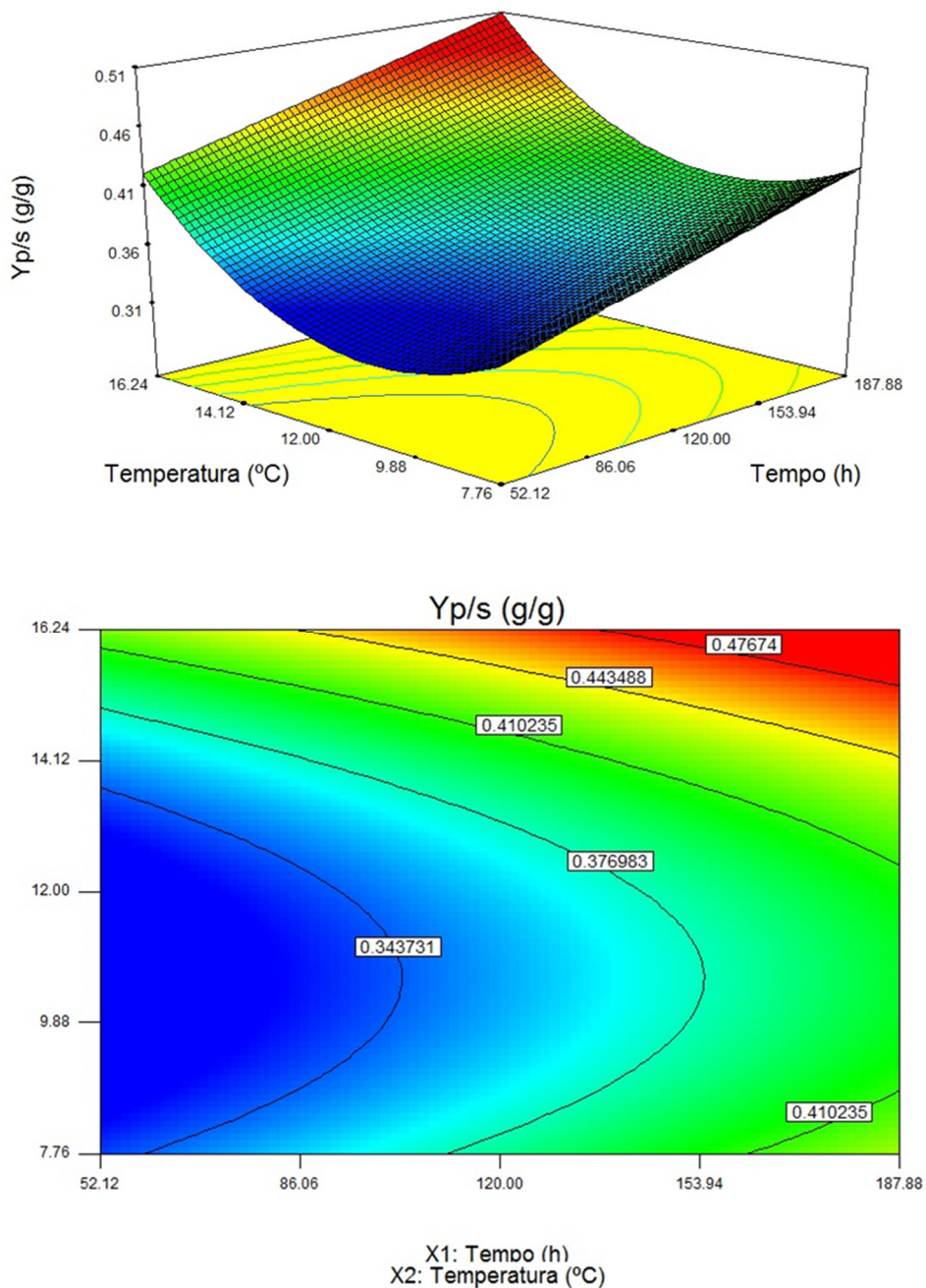
5.4.5.2 Fator de conversão de substrato em produto

A Figura 27 mostra o efeito do tempo e da temperatura de fermentação sobre o fator de conversão de substrato em produto. Como no etanol, o tempo de fermentação demonstrou efeito linear, e a temperatura efeito quadrático sobre a resposta. O fator de conversão de substrato em produto aumentou com o aumento do tempo, atingindo seu máximo valor entre as 120 e 188 h. Já a variável resposta foi superior nos pontos extremos da temperatura, por exemplo, a 7,76 °C e entre 14,12 e 16,24 °C.

Sobre uma base estequiométrica, 1 g de maltose ou 1 g de glicose devem ser teoricamente convertidos em 0,54 ou 0,51 g de etanol, respectivamente.

Contudo, na prática, esta proporção não é frequentemente alcançada, principalmente devido à produção de biomassa e à síntese de compostos à base de carbono, juntamente com diferentes subprodutos metabólicos (PANCHAL; STEWART, 1980). Como o mosto de sorgo contém uma maior composição em glicose do que o mosto de cevada, pode ser assumido o rendimento teórico de glicose (0,51 g/g).

Figura 27 - Superfície de resposta e curva de contorno para o fator de conversão de substrato em produto em função do tempo e da temperatura de fermentação



Fonte: Arquivo pessoal

O máximo fator de conversão de substrato em produto (0,45 – 0,48 g/g) que pode ser obtido, por exemplo, com 188 h de fermentação, é superior quando comparados com os valores (0,33 – 0,41 g/g) encontrados por Aizemberg (2015), às 96 h de fermentação, usando mosto (16 °P) do malte de cevada e adjuntos tais como melado e caldo de cana.

Mesmo que, o objetivo de Lin et al. (2014), produzir uma cerveja com alto teor alcoólico mediante fermentação descontínua alimentada com xarope de glicose como adjunto, tenha sido contrário ao do presente estudo, o Yp/s aqui não é muito diferente do Yp/s (~0,51 g/g) obtido, antes da primeira alimentação com uma concentração do mosto de 12,5 °P, na pesquisa citada.

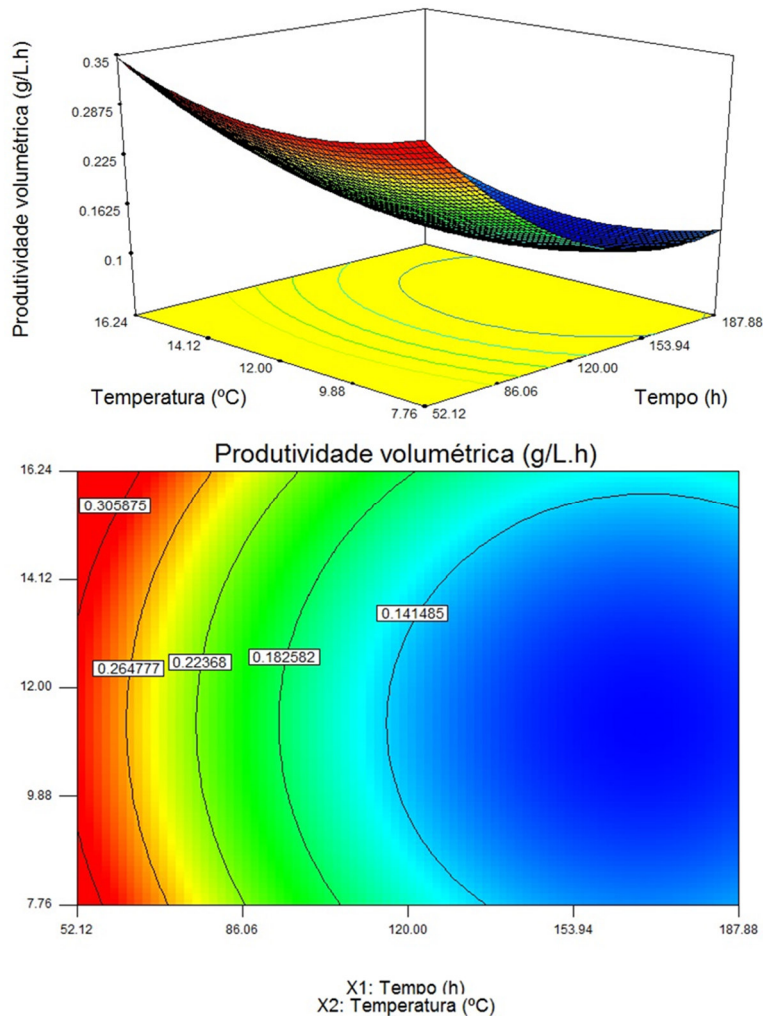
Os adequados valores de *HWE* e de *FAN*, decorrentes da otimização da etapa de mosturação, indicando a grande quantidade de compostos solúveis no mosto devido à ação das α e β -amilases e das enzimas proteolíticas, pode ser a causa do alto rendimento atingido no presente estudo, nas últimas horas de fermentação. Segundo Zhang et al. (2010), a alta viscosidade no mosto devido a altas concentrações de β -glucanos e maltose podem levar a baixos rendimentos de açúcares fermentáveis e, portanto, a fermentações ineficientes. Neste sentido, foi reportado que a diminuição de nutrientes e aminoácidos na cultura podem alterar as vias metabólicas da glicose (DRAGONE; SILVA; SILVA, 2004). Sequencialmente, um decréscimo no rendimento de etanol e superprodução de subprodutos. Além disso, altos níveis de sub-produtos tal como o diacetil podem ser outra razão para o baixo rendimento de etanol (LIN et al., 2014). Assim, é assumido, no presente estudo, que as bebidas fermentadas nas condições ótimas (entre 14,12 e 16,24 °C, e a partir das 120 h), para maximizar o Yp/s , poderiam ter baixos níveis de diacetil.

5.4.5.3 Produtividade volumétrica

O efeito do tempo e da temperatura de fermentação sobre a produtividade volumétrica pode ser observado a partir da Figura 28. As duas variáveis independentes tiveram efeito quadrático sobre a resposta. A produtividade volumétrica foi maior nas primeiras horas de fermentação, entre 52,12 e 86,06 h. Igualmente, atingiu seu maior valor nos pontos axiais da temperatura, 7,76 e 16,24

°C. A fermentação contínua é um processo muito conhecido e amplamente estudado (PIRES et al., 2014b; PIRES et al., 2014c).

Figura 28 - Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade volumétrica em função do tempo e da temperatura de fermentação



Fonte: Arquivo pessoal

Na produção de cerveja de cevada, o uso da tecnologia de células imobilizadas, tem sido explorado em vários estudos devido à alta produtividade volumétrica associada, economia do tempo e baixa demanda de capital (PIRES et al., 2014c). Altas produtividades volumétricas, (1,73 g/L.h) (PIRES et al., 2014c) e (1,54 g/L.h) (PIRES et al., 2014b), têm sido alcançadas, usando mosto (11 °P) do malte de cevada, com a técnica propriamente dita. Diversamente, no presente estudo, visando obter uma bebida fermentada com baixo teor alcoólico, a produtividade volumétrica (~0,30 g/L.h) foi baixa quando comparada com as

produtividades de processo contínuos. Igualmente foi inferior às produtividades (0,42 – 0,62 g/L.h) obtidas usando mosto (16 °P) do malte de cevada e adjuntos tais como melado e caldo de cana com 96 h de fermentação contínua (AIZEMBERG, 2015).

5.4.5.4 Grau real de fermentação

Como na produtividade volumétrica, o tempo e a temperatura de fermentação tiveram efeito quadrático sobre o grau real de fermentação ou fermentabilidade. A atenuação limite do mosto, quando otimizado o *HWE* e o *FAN*, foi de 81%; muito próxima à atenuação limite (83,30%) reportada por Dufour e Mélotte (1992). Uma atenuação limite (76,20%) menor foi reportada quando foram otimizadas as condições da maltagem do sorgo (tempo de imersão e de germinação, e temperatura de secagem) (DJAMEH et al., 2015).

Segundo Brandam et al. (2003), na fabricação de cerveja, o grau real de fermentação é um importante indicador da consistência e rentabilidade do processo de produção de cerveja, bem como a eficiência de fermentação do mosto. O *RDF* descreve as proporções de carboidratos fermentáveis do mosto.

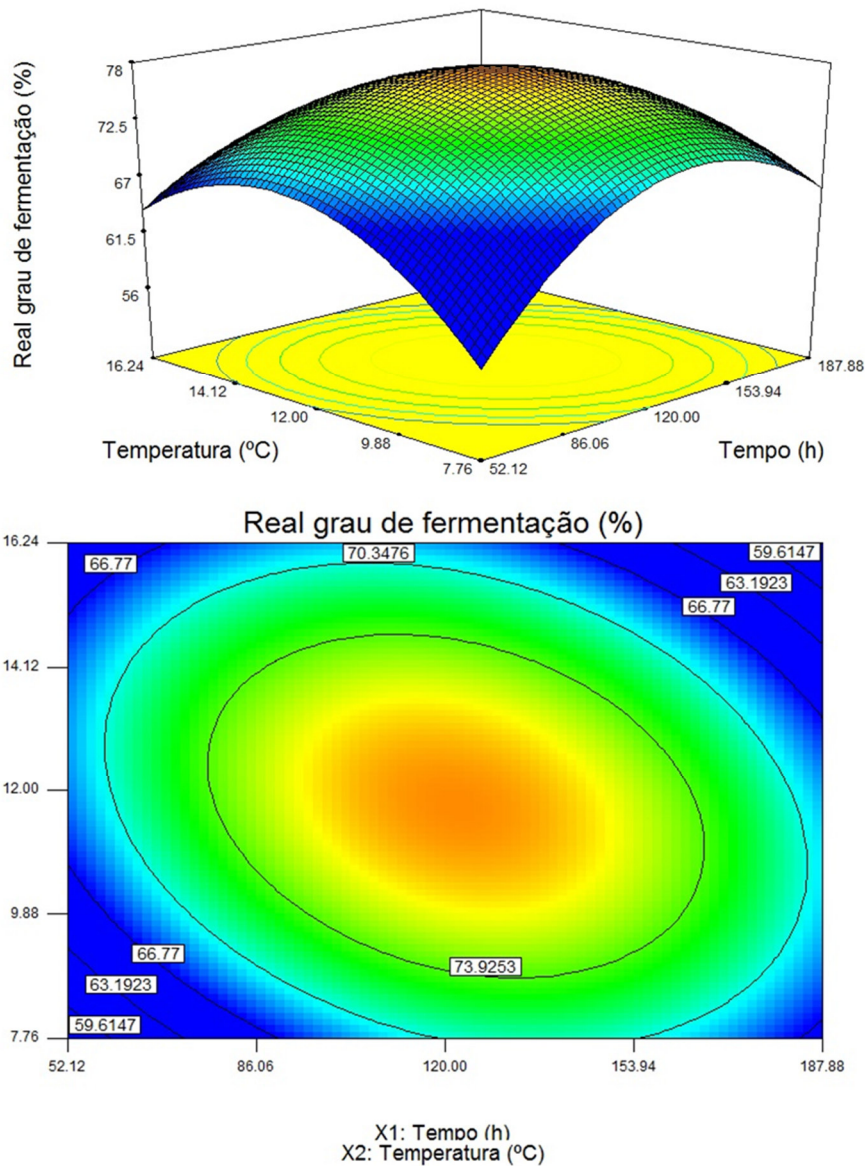
Além disso, o *RDF* pode-se utilizar também como um indicador do corpo da cerveja. Quanto menor o *RDF*, mais encorpado é o sabor e o paladar; e quanto maior é o *RDF*, mais leve e seca é a cerveja (PATINDOL; MENDEZ-MONTEALVO; WANG, 2012). A fermentabilidade é usada para indicar o potencial de fermentabilidade do malte (EVANS; HAMET, 2005).

Neste estudo, o *RDF* foi superior ao reportado por Ceccaroni et al. (2019) (62,2%) para cerveja de arroz, e similar ao *RDF* (74,22%) reportado por Hu et al. (2017) para cerveja de cevada. A Figura 29 mostra que, no estudo da otimização da fermentação, a fermentabilidade esteve muito próxima à obtida sob condições ideais, atingindo seu maior valor (~ 75%) entre 86,06 e 153,94 h, e entre 9,88 e 14,12 °C.

Segundo Hu et al. (2017), a concentração de osmólitos, uma medida recentemente explorada sobre a qualidade do malte, é a osmolalidade (número de partículas osmoticamente ativas de soluto presentes em um quilograma do solvente) é a osmolalidade de todos os compostos em uma solução determinada por um osmômetro de pressão de vapor. É um método rápido e eficaz para avaliar

o *RDF* do mosto, o qual substitui ao método clássico de determinação de *RDF*. Devido às numerosas enzimas envolvidas na degradação de compostos de armazenamento do malte, a concentração de osmólitos é um indicador da atividade das enzimas amilolíticas.

Figura 29 - Superfície de resposta e curva de contorno para o grau real de fermentação em função do tempo e da temperatura de fermentação



Fonte: Arquivo pessoal

Os autores alegam que a concentração de osmólitos quantifica todas as moléculas no mosto; enzimas mais termoestáveis produzem mais moléculas, levando a maior fermentabilidade. Assim, a alta fermentabilidade obtida, no

presente estudo de otimização da fermentação, pode ser devida, embora não determinada, à alta concentração de osmólitos como decorrência da atividade amilolítica atingida na otimização da mosturação. Além disso, a alta fermentabilidade atingida pode ser decorrente do adequado *FAN* do mosto, causando o crescimento apropriado das leveduras e o rápido metabolismo de açúcares fermentáveis durante a fermentação.

5.4.5.5 Cor

A Figura 30 exibe o efeito do tempo e da temperatura de fermentação sobre a cor. Como no grau real de fermentação, as duas variáveis independentes tiveram efeito quadrático sobre a cor. Observa-se que a cor foi mais pronunciada nas primeiras horas de fermentação, entre 52,12 e 86,06 h, e entre 9,88 e 14,12 °C, aproximadamente.

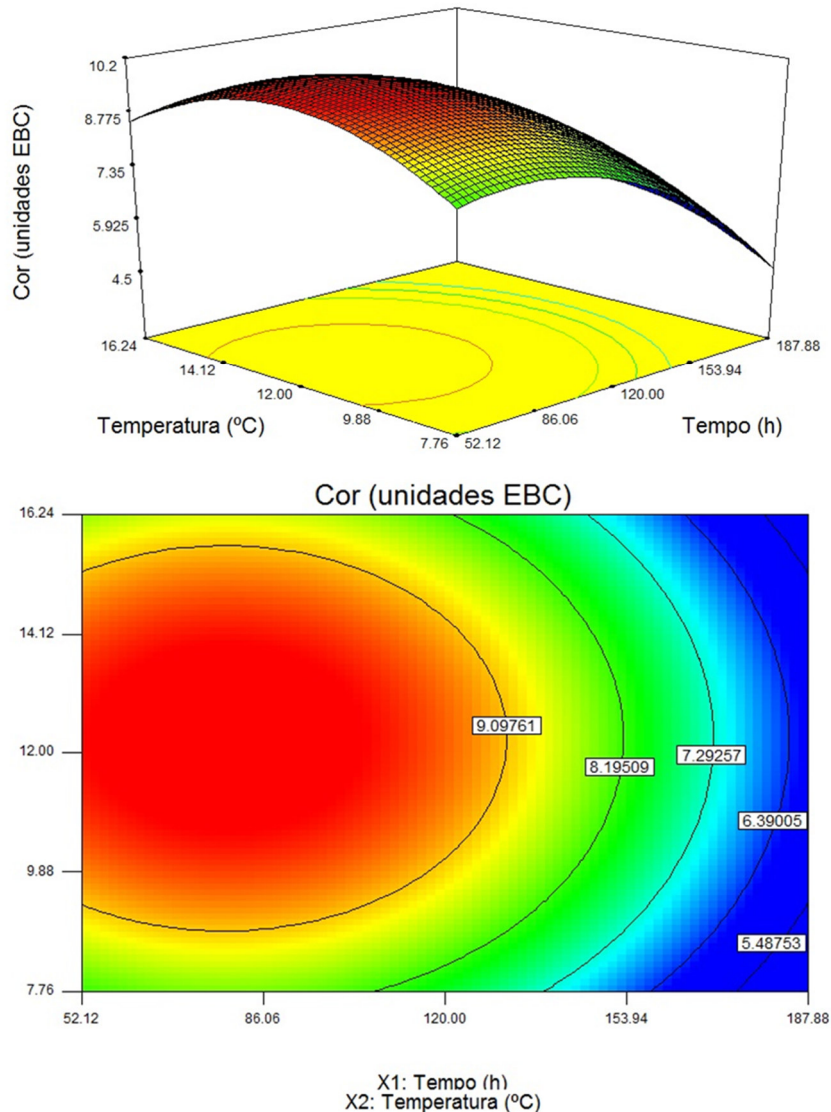
A temperatura de fermentação com leveduras de alta fermentação varia entre 5 e 16 °C. Um aumento da temperatura, além de afetar a estabilidade da espuma da cerveja, pode também diminuir a cor da mesma (SOLGAJOVÁ et al., 2013); o qual justifica a diminuição da cor, a partir de 14 °C. Segundo Steiner et al. (2012), além do malte, os produtos da reação de Maillard (reação química entre um aminoácido ou proteína e um carboidrato redutor) dão uma maior formação de cor.

Neste estudo, embora a concentração do mosto de sorgo tenha sido um adequado nível de *FAN* (111,00 mg/L); para atingir baixas concentrações de etanol, nas bebidas finais, foi fixada uma baixa concentração de extrato original (aproximadamente 6,62 °P). Isto pode explicar a formação de cor nas bebidas.

O maior valor de cor encontrado foi de 10 unidades *EBC*, aproximadamente. Uma cor similar, assinalada anteriormente, foi reportada por Dighionno et al. (2017), em uma cerveja de malte de teff. No entanto, a cor das cervejas de sorgo do presente estudo foram mais intensas quando comparadas com a cor da cerveja de arroz, reportada por Ceccaroni et al. (2019) (5,1 unidades *EBC*).

Por outro lado, Aisien e Muts (1987) encontraram uma cor de 18,4 unidades *EBC*, mais acentuada para uma cerveja *lager* de sorgo, quando a fermentação foi realizada a 9 – 10 °C por 168 h (7 dias). Júrić et al. (2015) tem registrado cores entre 8,2 e 9,8 *EBC* para cervejas *pale lager*, estando no intervalo reportado para as cervejas claras, (8,58 – 27,3 unidades *EBC*).

Figura 30 - Superfície de resposta e curva de contorno para a cor em função do tempo e da temperatura de fermentação



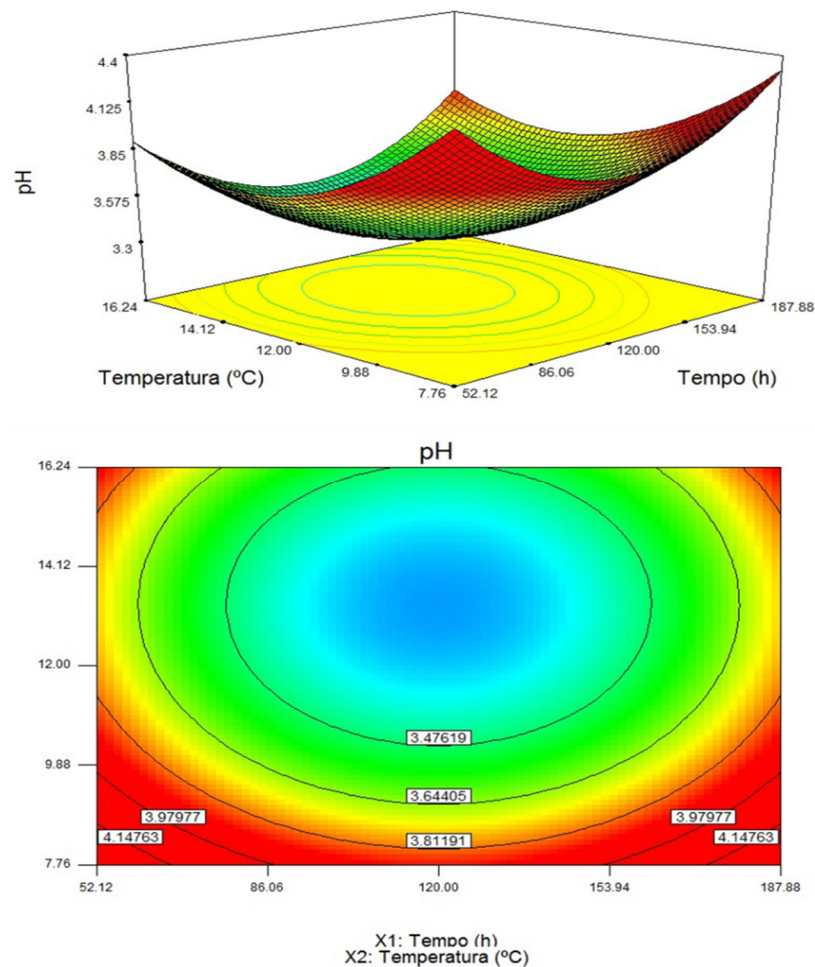
Fonte: Arquivo pessoal

2.1.1.1 pH

Como na produtividade volumétrica, no grau real de fermentação e na cor, o tempo e a temperatura de fermentação tiveram efeito quadrático sobre a resposta. A Figura 31 mostra a influência das duas variáveis independentes sobre o pH. É conhecido que o pH decresce normalmente durante a fermentação (CECCARONI et al., 2019). Uma das causas da diminuição do pH da cerveja é o aumento da temperatura (SOLGAJOVÁ et al., 2013). Assim, foi observado uma diminuição do pH entre 7,76 e 14,12 h de fermentação. Nota-se que o pH mais alto (~3,9) é atingido nas primeiras e nas últimas horas de fermentação, e nas baixas e altas temperaturas, o seja, aproximadamente, nos pontos axiais. Os resultados do pH

estão em correspondência com a literatura. Por exemplo, kayodé et al. (2007) relataram um pH de 3,2 da cerveja de sorgo, *tchoukoutou*, feita em Benim. Já Ceccaroni et al. (2019) reportaram um pH superior (3,93) para uma cerveja feita de malte de arroz. Tem sido revelado um pH de 4,5 em uma cerveja de sorgo (AISIEN; MUTS, 1987).

Figura 31 - Superfície de resposta e curva de contorno para o pH em função do tempo e da temperatura de fermentação



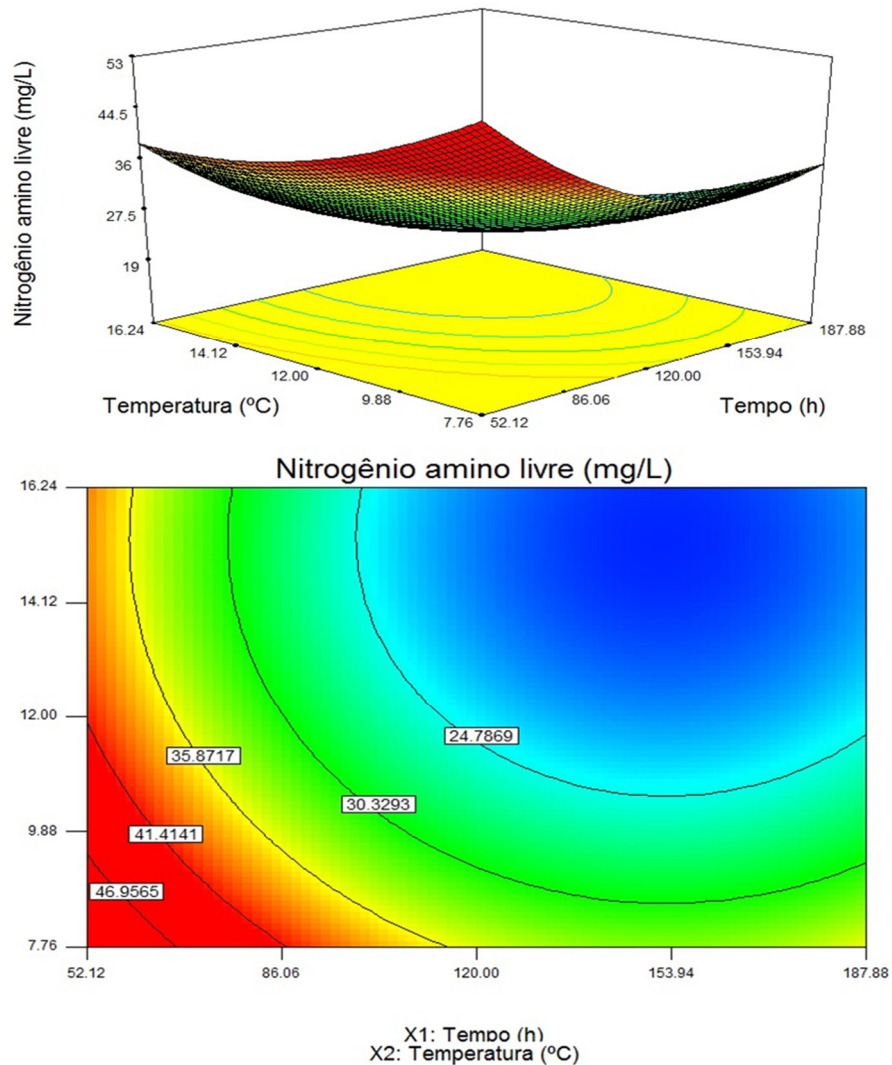
Fonte: Arquivo pessoal

5.4.5.6 Nitrogênio amino livre

A Figura 32 exibe o efeito do tempo e da temperatura de fermentação sobre o nitrogênio amino livre. Como no grau real de fermentação, as duas variáveis independentes tiveram efeito quadrático sobre a resposta. A fabricação de cerveja com baixa proporção de malte pode afetar o sabor das cervejas, decorrentes dos

baixos níveis de *FAN*. Como resultado do esgotamento do *FAN*, durante a fermentação, cessa a reprodução das células de leveduras.

Figura 32 - Superfície de resposta e curva de contorno para o pH em função do tempo e da temperatura de fermentação



Fonte: Arquivo pessoal

Nesse momento, pode-se elevar a temperatura de fermentação para permitir que o pequeno número de leveduras consuma a mesma quantidade de fontes de carbono (açúcares fermentáveis), afetando o metabolismo das leveduras, o que resulta em níveis mais altos de compostos de sabor voláteis (KOBAYASHI; SHIMIZU; SHIOYA, 2008).

Neste estudo, relatam-se níveis adequados de *FAN* (a 6,62 °P) (111,00 mg/L), no mosto, para o crescimento das leveduras durante a fermentação; assim o *FAN* da cerveja oscilou entre 20 e 40 mg/L. Igualmente, Ceccaroni et al. (2019)

reportaram que o mosto e a cerveja de arroz atingiram valores de *FAN* (a 12 °P) de 173 e 29 mg/L, respectivamente.

5.4.6 Validação experimental

Observa-se que diferentes condições experimentais maximizam ou minimizam as diferentes variáveis respostas da fermentação. Portanto, realizou-se um estudo de otimização, como no processo de maltagem e na etapa de mosturação, para obter as condições ótimas para maximizar o etanol, o *Y_p/s*, a *Q_p*, e o pH, minimizar o *RDF* e o *FAN*, enquanto a cor foi fixada a 7 unidades *EBC*. Para conduzir a fermentação, as condições ótimas obtidas foram 153 h e 16,24 °C, usando o programa *Design-Expert*. Usando essas condições ótimas em experimentos adicionais realizados, foi confirmada a confiabilidade do método. A Tabela 18 mostra os valores previstos e experimentais das diferentes variáveis respostas. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores previstos e experimentais. Por conseguinte, o modelo estabelecido pode-se considerar aceitável. Neste trabalho, as condições ótimas, validadas experimentalmente, correspondem-se com o reportado na literatura para cervejas *lager* feitas com malte de cevada. Por exemplo, em cervejarias ocidentais, o tempo de fermentação oscila entre 8 e 15 dias a 10 – 16 °C (LYUMUGABE et al., 2012). Igualmente, Aisien e Muts (1987) realizaram a fermentação do mosto de sorgo por 168 h (7 dias) em uma temperatura de 9 – 10 °C.

Tabela 18 - Valores preditos e experimentais das variáveis respostas na fermentação sob condições ótimas

Parâmetro	Condições ótimas	Valores experimentais	Valores previstos
Etanol (%, v/v)		2,97±0,19	2,85
Fator de conversão de substrato em produto (g/g)		0,42±0,03	0,49
Produtividade volumétrica (g/L.h)		0,12±0,01	0,15
Grau real de fermentação (%)	X ₁ = 153 h X ₂ = 16,24 °C	67,82±1,07	64,75
Cor (unidades <i>EBC</i>)		6,85±0,14	7
pH		3,72±0,24	3,57
Nitrogênio amino livre (mg/L)		21,20±1,56	19,46

X₁: tempo de fermentação; X₂: temperatura de fermentação

Fonte: Arquivo pessoal.

Odibo et al. (2002) conduziram a fermentação do mosto de sorgo por 144 h (6 dias) em 12 °C. Já, no caso de algumas cervejas de sorgo tradicionais Africanas, o tempo de fermentação varia entre 10 e 24 h em temperatura ambiente (LYUMUGABE et al., 2012).

5.5 Análise sensorial das bebidas fermentadas em escala de laboratório

Os consumidores recrutados para o teste de aceitação foram aqueles que declararam consumir cerveja pelo menos uma vez por mês. Os resultados apresentados como média \pm desvio padrão da análise sensorial das bebidas do delineamento composto central rotacional na fermentação mostram-se na Tabela 19.

Observa-se que tanto a impressão global, a cor, a aroma, o sabor, a aparência e a intenção de compra dos pontos centrais atingiram a melhor avaliação pelos participantes quando comparado com os experimentos dos pontos fatoriais e dos axiais. Assim, a bebida de sorgo, fermentada por 120 h (5 dias) a 12 °C, foi a bebida mais aceita e foi a escolhida para a produção em escala piloto (100 L). Segundo Solgajová et al. (2013), a regulação da temperatura melhora as propriedades sensoriais da cerveja. É conhecido que um número de componentes voláteis na cerveja, particularmente aldeídos, afetam negativamente a qualidade e o aroma da cerveja (GONCALVES et al., 2010).

Estudos prévios têm mostrado que, com o incremento da temperatura de fermentação, os níveis de diacetil e 2,3-pentanodiona são reduzidos (MASSCHELEIN, 1986). Saerens et al. (2008) têm mostrado que um incremento na temperatura desde 12 até 15 °C causou a redução de teor de diacetil, aproximadamente 20%. Por outro lado, o incremento da temperatura de fermentação desde 10 até 11,5 °C causou o decréscimo na concentração final de acetaldeído (~35%) (KUCHARCZYK; TUSZYŃSKI, 2018). Assim, possivelmente, a concentração de componentes voláteis da bebida fermentada em 12 °C ajudou à seleção, apresentando as melhores características sensoriais.

Conforme Della (2008), uma vez que a satisfação do consumidor provém de sua percepção positiva acerca da qualidade do alimento, deve-se ter em mente que o próprio consumidor é quem deve ditar os parâmetros de qualidade desse produto.

Tabela 19 - As notas das 13 amostras do DCCR na análise sensorial

Amostra	IG	Cor	Aroma	Sabor	Aparência	Intenção de compra
1	6,70±1,58 ^{b,c}	6,55±1,61 ^b	6,83±1,77 ^{a,b}	6,58±1,76 ^{a,b}	6,70±1,43 ^{c,d}	3,58±1,06 ^{a,b,c,d}
2	6,50±1,52 ^c	6,65±1,68 ^b	6,25±1,67 ^{b,c}	6,02±1,68 ^b	6,53±1,68 ^d	3,23±0,10 ^d
3	6,55±1,50 ^c	6,67±1,39 ^b	6,35±1,57 ^{b,c}	6,12±1,79 ^b	6,85±1,27 ^{b,c,d}	3,40±0,99 ^{b,c,d}
4	6,75±1,51 ^{b,c}	6,90±1,55 ^{a,b}	6,37±1,56 ^{b,c}	6,37±1,73	6,78±1,45 ^{c,d}	3,42±1,18 ^{b,c,d}
5	6,73±1,26 ^{b,c}	6,80±1,69 ^b	6,53±1,67 ^{b,c}	6,63±1,61 ^{a,b}	6,72±1,54 ^{c,d}	3,67±1,07 ^{a,b,c}
6	6,22±1,5 ^c	6,60±1,49 ^b	6,18±1,73 ^{b,c}	5,98±1,89 ^b	6,50±1,38 ^d	3,25±1,05 ^{c,d}
7	6,45±1,38 ^c	6,70±1,50 ^b	5,92±1,56 ^c	6,05±1,73 ^b	6,40±1,44 ^d	3,27±1,04 ^{c,d}
8	6,77±1,28 ^{b,c}	6,87±1,47 ^{a,b}	6,38±1,43 ^{b,c}	6,43±1,61 ^{a,b}	6,65±1,42 ^{c,d}	3,47±0,96 ^{b,c,d}
9	7,20±1,41 ^{a,b}	6,88±1,66 ^{a,b}	7,35±1,31 ^a	6,87±1,88 ^a	7,13±1,72 ^{a,b,c}	3,80±0,93 ^{a,b}
10	7,37±1,26 ^a	7,42±1,27 ^a	6,75±1,43 ^{a,b}	7,05±1,53 ^a	7,42±1,27 ^{a,b}	3,93±0,95 ^a
11	7,38±1,28 ^a	7,43±1,28 ^a	6,77±1,44 ^{a,b}	7,07±1,55 ^a	7,43±1,28 ^a	3,95±0,96 ^a
12	7,37±1,26 ^a	7,42±1,27 ^a	6,75±1,43 ^{a,b}	7,05±1,53 ^a	7,42±1,27 ^{a,b}	3,92±0,96 ^a
13	7,37±1,26 ^a	7,42±1,27 ^a	6,75±1,43 ^{a,b}	7,05±1,53 ^a	7,42±1,27 ^{a,b}	3,93±0,95 ^a

Médias na mesma coluna seguida pela mesma letra (s) não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.6 Produção em escala piloto das bebidas fermentadas

Foi realizada a produção da bebida fermentada de sorgo em escala piloto (100 L), conforme os resultados da análise sensorial, ou seja, sob as mesmas condições dos pontos centrais do delineamento composto central rotacional, na Planta Piloto de Bebidas da Escola de Engenharia de Lorena. Igualmente, produziu-se uma cerveja de cevada, usada como controle, nas mesmas condições. A Tabela 20 mostra a comparação dos parâmetros físicos e de análises físico-químicas entre as bebidas fermentadas em escala de laboratório (pontos centrais do DCCR) e em escala piloto.

Nota-se que o teor alcoólico, o fator de conversão de substrato produto e a produtividade volumétrica foram similares nas bebidas fermentadas de sorgo na escala de laboratório e na escala piloto. No entanto, o grau real de fermentação foi maior na bebida fermentada de sorgo em escala de laboratório do que, em escala piloto devido a que o extrato real, no fim da fermentação, da escala de laboratório foi menor do que o extrato real da escala piloto. Já os parâmetros cinéticos das bebidas fermentadas, de sorgo e cerveja, em escala piloto foram muitos próximos.

Tabela 20 - Comparação dos parâmetros físicos e análises físico-químicas entre as bebidas fermentadas em escala de laboratório e em escala piloto

Parâmetros cinéticos	Escala de laboratório		Escala piloto
	Bebida fermentada de malte sorgo	Bebida fermentada de malte sorgo	Cerveja
Etanol (% v/v)	2,41	2,66	2,59
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,36	0,44	0,42
Q_p (g/L.h)	0,14	0,17	0,17
RDF (%)	77,47	68,26	68,62
Cor (unidades EBC)	9,44	9,22	9,05
pH	3,34	3,76	3,52
Nitrogênio amino livre (mg/L)	23,97	25,83	26,54

Fonte: Arquivo pessoal.

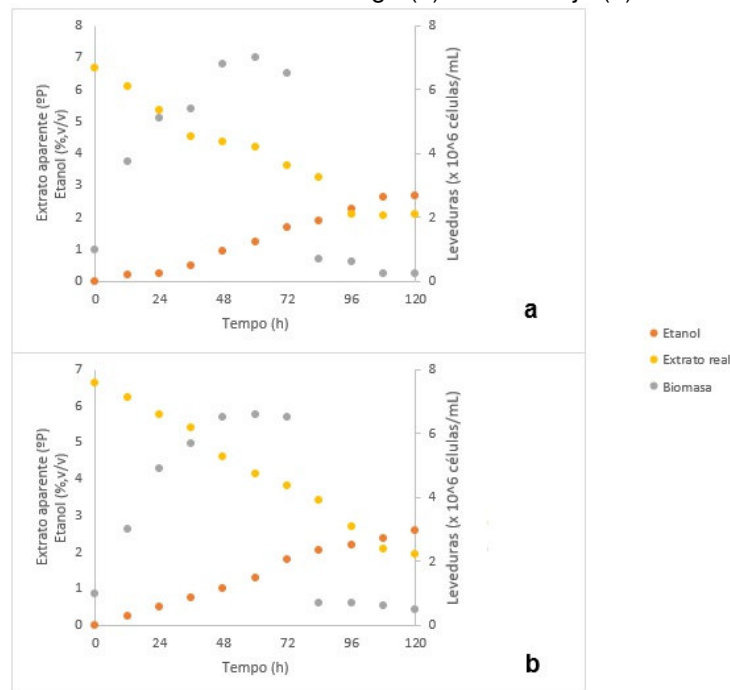
5.6.1 Fermentação em escala piloto

Foi realizado um estudo fermentativo, em escala piloto, para avaliar o crescimento da levedura nos mostos de sorgo e de cevada. A Figura 33 apresenta a evolução da concentração do extrato real do mosto, da concentração celular e da concentração de etanol em ambas as bebidas.

A viabilidade celular manteve-se elevada durante a fermentação, atingindo aproximadamente entre 99 e 95% ao final do processo. A multiplicação celular foi mais rápida na fase inicial já que nesse momento ainda havia concentrações de oxigênio e por isso as células estavam em alta atividade celular fazendo respiração.

Em ambas as fermentações, em 60 h, verifica-se que a concentração celular é mais elevada, e em seguida decresce. Esta queda ocorreu pela sedimentação das leveduras à medida que a concentração de extrato vai sendo consumida durante a fermentação.

Figura 33 - Concentração do extrato real do mosto, da concentração celular e da concentração de etanol em escala piloto da bebida fermentada de sorgo (a) e da cerveja (b)



Fonte: Arquivo pessoal

5.6.2 Análise sensorial das bebidas em escala piloto

A análise sensorial consistiu em avaliar a bebida fermentada de sorgo (escolhida anteriormente na primeira análise sensorial), amostra 1, a cerveja de

cevada (controle), amostra 2, e uma cerveja sem glúten, a partir de cevada, comercializada no mercado, amostra 3 (Tabela 21).

Tabela 21 - As notas na análise sensorial das bebidas realizadas em escala piloto e da bebida comercial

	Amostras		
	1	2	3
Impressão global	6,32 ^a	4,70 ^b	7,32 ^c
Cor	5,80 ^a	5,77 ^a	7,47 ^b
Aroma	5,97 ^a	4,23 ^b	7,20 ^c
Sabor	6,60 ^a	3,80 ^b	7,07 ^a
Aparência	5,93 ^a	5,80 ^a	7,53 ^b
Intenção de compra	3,83 ^a	2,17 ^b	4,20 ^a

Fonte: Arquivo pessoal

Nota-se que tanto o sabor quanto a intensão de compra da bebida fermentada de sorgo e da cerveja comercial não tiveram diferenças significativas ($p > 0,05$). A diferença entre essas bebidas é observada na impressão global e no aroma. Houve uma diferença altamente significativa em todas as notas e na intenção de compra entre a cerveja de cevada feita em escala piloto e a comercial. Embora a cerveja comercial tenha sido bem avaliada, numericamente, pelos participantes, a bebida fermentada de sorgo também foi muito bem aceita, mostrando que o malte de sorgo é sensorialmente adequado na produção de bebidas fermentadas. No entanto, alguns atributos precisam ser melhorados, tais como a impressão global, a cor, o aroma e a aparência, estudando, a fermentação com outros tipos de leveduras, por exemplo, *ale*.

6 CONCLUSÕES

- Tanto a cultivar BRS511, usado na maltagem, como a cultivar 1G244, usado na mosturação e na fermentação, mostraram adequados parâmetros de qualidade tais como umidade, peso de 1000 grãos, energia de germinação, teor de proteína, sendo os mesmos de 2,59 e 3,53%, 27,24 e 27,66 g, 98,17 e 97,33, 10,8 e 9,75%, respectivamente. A textura do endosperma de ambas as cultivares foi classificada de farinhosa.
- A análise de variância indicou que as três variáveis independentes estudadas, no processo de maltagem, tiveram efeito significativo sobre as variáveis respostas. Sob condições ótimas de 0,17% de NaOH, 39,81 h de imersão e 120,62 h de germinação podem ser obtidos adequados parâmetros de qualidade tais como poder diastático (40,45 °L), extrato em água quente (324,37 °L/kg), nitrogênio amino livre (148,98 mg/L) e perdas da maltagem (15,85%).
- A análise de variância, da etapa de mosturação, indicou que a temperatura de atividade da α -amilase teve maior efeito significativo sobre o extrato em água quente e sobre o nitrogênio amino livre quando comparado com a temperatura de atividade da β -amilase. Podem ser alcançados altos valores de extrato em água quente (357,00 °L/kg) e de nitrogênio amino livre (171,65 mg/L), sob as condições ótimas para a atividade das enzimas β -amilase e α -amilase de 51,47 e 71,14 °C, respectivamente.
- O tempo de fermentação teve maior influência sobre a produtividade volumétrica e sobre a cor do que a temperatura de fermentação. É possível atingir adequados valores de etanol (2,97 %, v/v), fator de conversão de substrato em produto (0,42 g/g), produtividade (0,12 g/L.h), grau real de fermentação (67,82 %), cor (6,85 unidades *EBC*), pH (3,72) e nitrogênio amino livre (21,20 mg/L), similares aos preditos pelo modelo na fermentação com condições ótimas de tempo (153 h) e de temperatura (16,24 °C).
- A análise sensorial da bebida fermentada em escala de laboratório revelou que o tempo de 120 h e a temperatura de 12 °C são as condições ótimas para a aceitabilidade da bebida. Na análise sensorial, das bebidas produzidas em escala piloto, foi observado que o sabor e a intenção de compra da bebida fermentada de sorgo não apresentaram diferenças

significativas com as da cerveja sem glúten, comercializada no mercado. Fato que demonstra que o malte de sorgo é uma matéria prima promissora para a fabricação de bebidas.

7 RECOMENDAÇÕES

- Avaliar outras variedades de grãos de sorgo, assim como o talo da planta, para obter bebidas com características sensoriais e visuais diferentes.
- Estudar a etapa de fermentação do mosto de sorgo com leveduras *ale* para avaliar as características sensoriais das bebidas fermentadas.
- Realizar uma análise económica do processo de produção de bebidas fermentadas a partir do malte de sorgo.

REFERÊNCIAS

AALBERS, V. J.; VAN.EERDE, P. Centenary review evaluation of malt quality. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 92, p. 420-425, 1986. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04434.x/pdf>. Acesso em: 19 nov. 2015.

ABUJAH, C. I.; OGBONNA, A. C.; ONWUKA, N. U.; UMOREN, P. E.; OJUKWU, M. Effect of varietal differences and germination period on some malting and brewing potentials of new improved sorghum varieties (SAMSORG17, SAMSORG14, and SAMSORG40) from Nigeria. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 4, p.1600-1608, 2016a. Disponível em: [http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20\(04\)%202016/\(33\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20(04)%202016/(33).pdf). Acesso em: 12 ago. 2016.

ABUJAH, C. I.; OGBONNA, A. C.; SONDE, C. U.; OFFIA-OLUA, B.; OWHOKE, E. Variety and germination time effect on total β -glucan, water-insoluble β -glucan, water-soluble β -glucan components and β -glucanase levels in improved sorghum varieties SK5912, KSV8 and ICSV400 before and after malting and their relationships to wort viscosity. **Journal of Institute of Brewing**, v. 122, p. 93-101, 2016b. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.300/epdf>. Acesso em: 3 mar. 2018.

ADEGBOLA, J.; AWAGU, F.; KAMALDEEN, S.; KASHETU, Q. Sorghum: most under-utilized grain of the semi-arid Africa. **Scholarly Journal of Agricultural Science**, v. 3, n. 4, p. 147-153, 2013. Disponível em: <http://scholarly-journals.com/sjas/archive/2013/april/pdf/Adegbola%20et%20al.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2017.

ADEOLA, A. A. The effect of kernel size and texture on the malting properties of sorghum. **Journal of Food Technology in Africa**, v. 7, n. 3, p. 78-81, 2002. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/27794550_The_Effect_of_Kernel_Size_and_Texture_on_the_Malting_Properties_of_Sorghum. Acesso em: 03 ago. 2018.

ADETUNJI, A. I.; KHOZA, S.; DE-KOCK, H. L.; TAYLOR, J. R. N. Influence of sorghum grain type on wort physico-chemical and sensory quality in a whole-grain and commercial enzyme mashing process. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, p. 156-163, 2013. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.76/pdf>. Acesso em: 31 jul. 2015.

AGU, R. C.; PALMER, G. H. Enzymic breakdown of endosperm proteins of sorghum at different malting temperatures. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 102, p. 415-418, 1996. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1996.tb00924.x/abstract>. Acesso em: 31 jul. 2015.

AGU, R. C.; PALMER, G. H. Effect of mashing procedures on some sorghum varieties germinated at different temperatures. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 147-158, 1997b. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S003295929600074X/1->

s2.0-S003295929600074X-main.pdf?_tid=5b61150f-863b-4bd1-ba7f-16161b34fe5c&acdnat=1549743047_9e9fb65cbdef018d5b79b83c089075de. Acesso em: 26 fev. 2017.

AGU, R. C.; PALMER, G. H. The effect of temperature on the modification of sorghum and barley during malting. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 6, p. 501-507, 1997c. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959297000022>. Acesso em: 26 fev. 2017.

AGU, R. C.; PALMER, G. H. A reassessment of sorghum for lager-beer brewing. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 253-261, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852498000479>. Acesso em: 26 fev. 2017.

AGU, R. C.; PALMER, G. H. Evaluation of the potentials of millet, sorghum and barley with similar nitrogen contents malted at their optimum germination temperatures for use in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, 119, 258-264, 2013. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.91/full>. Acesso em: 21 ago. 2013.

AISIEN, A. O.; GOSH, B. P. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 850, 1978.

AISIEN, A. O.; MUTS, G. C. Micro-scale malting and brewing studies of some sorghum varieties. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 93, p. 328-331, 1987. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1987.tb04513.x/pdf>. Acesso em: 31 jul. 2015.

AISIEN, A. O.; PALMER, G. H. The sorghum embryo in relation to the hydrolysis of the endosperm during germination and seedling growth. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 34, 113 - 121, 1983. Disponível em: <https://eurekamag.com/pdf.php?pdf=001142646>. Acesso em: 26 fev. 2017.

AISIEN, A. O.; PALMER, G. H.; STARK, J. R. The development of enzymes during germination and seedling growth in nigerian sorghum. **Starch/Starke**, v. 35, p. 316, 1983.

AIZEMBERG, R. **Emprego do caldo de cana e do melado como adjunto de malte de cevada na produção de cervejas**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências)-Escola de Engenharia de Lorena-Universidade de São Paulo. Lorena, 2015.

ANGLANI, C. Sorghum for human food – a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 52, p. 85-95, 1998. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008065519820>. Acesso em: 12 ago. 2016.

AOAC **Association of Official Analytical Chemists. Official methods of the analysis of association of official analytical chemists**. 15th ed. Virginia: Association of official analytical chemists, 1995.

ARCHIBONG, E. J.; ONUORA, V. C.; USOEGBU, O.; EZEMBA, C. C. Mashing studies of two (2) improved sorghum varieties (SK5912 and CSR01) using crude enzyme extract from *Aspergillus sydowii*. **World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 113-125, 2015. Disponível em: <https://oer.coalcityuniversity.edu.ng/read/mashing-studies-of-two-2-improved-sorghum-varieties-sk5912-and-csr01-using-crude-enzyme-extract-from-aspergillus-sydowii-1?rdr=1>. Acesso em: 05 ago. 2016.

ARENDT, E. K.; SCHNITZENBAUMER, B. Brewing with up to 40% unmalted oats (*Avena sativa*) and sorghum (*Sorghum bicolor*): a review. **Journal of Institute of Brewing**, v. 120, p. 315-330, 2014. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.152/epdf>. Acesso em: 29 jun. 2017.

ARRIETA, Á. A.; RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L.; DE-SAJA, J. A.; BLANCO, C. A.; NIMUBONA, D. Prediction of bitterness and alcoholic strength in beer using an electronic tongue. **Food Chemistry**, v. 123, p. 642-646, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610005662>. Acesso em: 14 fev. 2019.

ASBC **Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists**. 8th ed. Saint Paul, Minnesota, USA: American Society of Brewing Chemists, 2008. p. 1975-1976.

BAMFORTH, C. W. **Standards of Brewing: A Practical Approach to Consistency and Excellence**. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2002.

BAMFORTH, C. W. **Beer. Health and Nutrition**. Oxford: Blackwell Science: , 2004. p. 1-184.

BARIKMO, I.; OUATTARA, F.; OSHAUG, A. Protein, carbohydrate and fibre in cereals from Mali - how to fit the results in a food composition table and database. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 291-300, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157504000341>. Acesso em: 15 jan. 2019.

BEKELE, A.; BULTOSA, G.; BELETE, K. The effect of germination time on malt quality of six sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties grown at Melkassa, Ethiopia. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, p. 76-81, 2012. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.19/abstract>. Acesso em: 31 jul. 2015.

BETA, T.; CORKE, H. Genetic and environmental variation in sorghum starch properties. **Journal of Cereal Science**, v. 34, p. 261-268, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521000903795>. Acesso em: 12 ago. 2016.

BETA, T.; CORKE, H.; TAYLOR, J. R. N. Starch properties of Barnard Red, a South African red sorghum variety of significance in traditional African brewing. **Starch/Stärke**, v. 52, p. 467-470, 2000. Disponível em:

[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-379X\(200012\)52:12%3C%3E1.0.CO;2-3/issuetoc](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-379X(200012)52:12%3C%3E1.0.CO;2-3/issuetoc). Acesso em: 12 nov. 2015.

BETA, T.; ROONEY, L. W.; MAROVATSANGA, L. T.; TAYLOR, J. R. N. Effect of chemical treatments on polyphenols and malt quality in sorghum. **Journal of Cereal Science** v. 31, p. 295-302, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521000903102?via%3Dihub>. Acesso em: 5 jul. 2017.

BICUDO, M.; FERREIRA, S. M.; SAMPAIO, C. Avaliação do atendimento às boas práticas de fabricação relacionada à possível contaminação acidental por glúten em uma unidade de fabricação de produtos panificados. **Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas**, v. 20, n. 1, p. 96-110, 2013.

BORZANI, W. Cinética de processos fermentativos. **Revista Brasileira de Engenharia**, v. 3, n. 2, p. 1-59, 1986.

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, p. 43-52, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X02001006>. Acesso em: 30 ago. 2018.

BRASIL. 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 8.543 de 23 de dezembro de 1992. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 de dez. 1992.

BRIGGS, D. E. **Malts and Malting**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p. 133-244

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing: Science and Practice**. Boca Raton, FL.: CRC Press, 2004a.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing: Science and Practice**. . New York: CRC Press., 2004b.

BWANGANGA, J. C.; BÉRA, F.; THONART, P. Optimizing red sorghum malt quality when *Bacillus subtilis* is used during steeping to control mould growth. **Journal of the Institute of Brewing**, 2012. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.36/epdf>. Acesso em: 26 fev. 2017.

CABALLERO, I.; BLANCO, C. A.; PORRAS, M. Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, p. 21-30, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224412000039>. Acesso em: 14 fev. 2019.

CARVALHO, D. S.; ZAMBIAZI, R. C. Avaliação do processo fermentativo de cerveja pilsen pelo uso de diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae*. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 3, p. 351-357, 2011.

CATASSI, C.; GATTI, S.; FASANO, A. The new epidemiology of celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 59, p. S7-S9, 2014. Disponível em: https://journals.lww.com/jpgn/fulltext/2014/07001/The_New_Epidemiology_of_Celiac_Disease.5.aspx. Acesso em: 11 fev. 2019.

CECCARONI, D.; MARCONI, O.; SILEONI, V.; WRAYC, E.; PERRETTIA, G. Rice malting optimization for the production of top-fermented gluten-free beer. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 2726-2734, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.9440>. Acesso em: 25 abr. 2019.

CHAUHAN, B.; GUPTA, R. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2115-2122, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959203004102>. Acesso em: 20 jan. 2018.

CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S.; GHONISIKAR, C. P.; D.K.SALUNKHE **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1319, 1979.

CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 1319, 1981.

CHIREMBA, C.; ROONEY, L. W.; TAYLOR, J. R. N. Relationships between simple grain quality parameters for the estimation of sorghum and maize hardness in commercial hybrid cultivars. **Cereal Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 570-575, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1094/CCHEM-06-11-0078>. Acesso em: 20 jan. 2018.

CHIREMBA, C.; SIWELA, M.; ROONEY, L. W.; TAYLOR, J. R. N. Hardness changes and endosperm modification during sorghum malting in grains of varying hardness and malt quality. **Cereal Chemistry**, v. 90, p. 138-144, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1094/CCHEM-08-12-0106-R>. Acesso em: 19 jun. 2018.

CODEX. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Report of the 28th Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, Joint FAO/WHO Food Standards Program**, 28th Session, ALINORM 07/30/26-Rev., 2006.

CODEX. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Draft Revised Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten, Joint FAO/WHO Food Standards Program**, 30th Session, ALINORM08/31/26 Appendix III, 2008., 2008.

DAS, A. J.; SETH, D.; MIYAJI, T.; DEKA, S. C. Fermentation optimization for a probiotic local northeastern Indian rice beer and application to local cassava and plantain beer production. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, p. 273-282, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.211>. Acesso em: 16 mar. 2018.

DELLA, S. M. **Métodos estatísticos para a avaliação da influência de características não sensoriais na aceitação, intenção de compra e escolha do consumidor**. 2008. 116. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.

DEWAR, J.; OROVAN, E.; TAYLOR, J. R. N. Effect of alkaline steeping on water uptake and malt quality in sorghum. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 103 p. 283-285, 1997. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1997.tb00957.x/pdf>. Acesso em: 31 jul. 2015.

DEWAR, J.; TAYLOR, J. R. N.; BERJAK, P. Determination of improved steeping conditions for Sorghum malting. **Journal of Cereal Science**, v. 26, p. 129-136, 1997a. Disponível em: http://researchspace.csir.co.za/dspace/bitstream/10204/1659/3/dewar_1997.pdf. Acesso em: 12 nov. 2015.

DEWAR, J.; TAYLOR, J. R. N.; BERJAK, P. Effect of germination conditions, with optimised steeping, on sorghum malt quality-with particular reference to free amino nitrogen. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 103, p. 171-175, 1997b. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1997.tb00946.x/pdf>. Acesso em: 12 nov. 2015.

DEWAR, J.; TAYLOR, J. R. N.; JOUSTRA, S. M. **Accepted methods of sorghum malting and brewing analysis**. Pretoria: CISR Food Science and Technology, 1995.

DIAZ-AMIGO, C.; POPPING, B. Gluten and gluten-free: issues and considerations of labeling regulations, detection methods, and assay validation. **Journal of AOAC International**, v. 95, n.2, p.337-348, 2012.

DIGHIONNO, L.; SILEONI, V.; MARCONI, O.; DEFRANCESCO, G.; PERRETTIAB, G. Comparative study on quality attributes of gluten-free beer from malted and unmalted teff [*Eragrostis tef* (zucc.) trotter]. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 746-752, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817304486?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jan. 2018.

DJAMEH, C.; KWESI, F.; SINAYOBYE, E.; BUDU, A.; ESSILFIE, G.; MENSAH-BROWN, H.; SEFA-DEDEH, S. Optimization of the sorghum malting process for pito production in Ghana. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, p. 106-112, 2015. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.191/epdf>. Acesso em: 22 nov. 2015.

DRAGONE, G.; SILVA, D. P.; SILVA, J. B. D. A. E. Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 37, p. 797-802, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643804000738>. Acesso em: 20 jan. 2018.

DUFOUR, J. P.; MÉLOTTE, L. Sorghum malts for the production of a lager beer. **ASBC Journal**, v. 50, n. 3, 1992. Disponível em: http://www.agraria.com.br/extranet/arquivos/agromalte_arquivo/malte_de_sorgo_para_produzir_lager.pdf. Acesso em: 6 mar. 2017.

DUNN, G. **Photochemistry**, v. 13, p. 1341-1343, 1974.

DYKES, L.; ROONEY, L. W. Sorghum and millet phenols and antioxidants: Review. **Journal of Cereal Science**, v. 44, p. 236-251, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521006000877>. Acesso em: 31 jul. 2015.

DYKES, L.; ROONEY, L. W. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. **Cereal Food World**, v. 52, p. 105-111, 2007. Disponível em: <https://www.aaccnet.org/publications/plexus/cfw/pastissues/2007/Documents/CFW-52-3-0105.pdf>. Acesso em: 16 set. 2018.

DYKES, L.; ROONEY, L. W.; WANISKA, R. D.; ROONEY, W. L. Phenolic compounds and antioxidant activity of sorghum grains of varying genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6813-6818, 2005. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf050419e>. Acesso em: 18 ago. 2018.

EBBAH, L.; LARYEA, D.; BARIMAH, J.; DJAMEH, C. Effect of steeping temperature on the quality of malt and Pito (an indigenous Ghanaian drink). **Journal of Institute of Brewing**, v. 121, p. 518-523, 2015. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.265/epdf>. Acesso em: 23 jun. 2017.

EBC **European Brewing Convention, Analytica-EBC**. 4th ed. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 1987. Section 3 Barley, Method 3.6.2.

EGWIM, E. C.; OLOYEDE, O. B. Comparison of α -amylase activity in some sprouting Nigerian cereals. **Nigerian Society for Experimental Biology**, v. 18, n. 1, p. 15-20, 2006.

EL-NOUR, M. E. M.; YAGOUB, S. O. Partial purification and characterization of α and β -Amylase isolated from *Sorghum bicolor* c.v. (Feterita) malt. **Journal of Applied Sciences**, 2010. Disponível em: <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/jas/0000/18488-18488.pdf>. Acesso em: 27 set. 2017.

ELGORASHI, A. G. M.; ELKHALIFA, E. A.; SULIEMAN, A. E. The effect of malting conditions on the production of non alcoholic sorghum malt beverage. **International Journal of Food Science and Nutrition Engineering**, v. 6, n. 4, p. 81-86, 2016. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/309379230> The Effect of Malting Conditions on the Production of Non alcoholic Sorghum Malt Beverage. Acesso em: 1 mar. 2017.

ELLIS, H. J.; DOYLE, A. P.; DAY, P.; WIESER, H.; CICLITIRA, P. J. Demonstration of the presence of coeliac-activating gliadin-like epitopes in malted barley. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 104, p. 308-310, 1994.

ENARI, T. M.; SOPANEN, T. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 92, p. 25, 1986.

ERDAL, K. Proanthocyanidin-free barley-malting and brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 92, p. 220-224, 1986. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04404.x/epdf>. Acesso em: 6 mar. 2017.

ETOKAKPAN, O. U. Amylolytic potentials and wort fermenting components of Nigerian sorghums and barley. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 287-289, 1992. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F01201881.pdf>. Acesso em: 09 jun. 2019.

EVANS, D. E.; HAMET, M. A. The selection of a dried yeast strain for use in the apparent attenuation limit malt analysis (AAL) procedure. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, p. 209-214, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00668.x>. Acesso em: 17 jun. 2019.

EVANS, D. J.; TAYLOR, J. R. N. Extraction and assay of proteolytic activities in sorghum malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, p. 201-207, 1990a. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1990.tb01028.x/pdf>. Acesso em: 12 ago. 2016.

EVANS, D. J.; TAYLOR, J. R. N. Influence of cultivar and germination conditions on proteolytic activities in sorghum malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, p. 399-402, 1990b.

EZEUGU, L. I.; DUODU, K. G.; EMMANBUX, M. N.; TAYLOR, J. R. N. Influence of cooking conditions on the protein matrix of sorghum and maize endosperm flours. **Cereal Chemistry**, v. 85, p. 397-402, 2008.

EZEUGU, L. I.; OKOLO, B. N. Effects of air rest periods on malting sorghum response to final warm water steep. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 101, p. 39-45, 1995. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1995.tb00848.x/pdf>. Acesso em: 26 fev. 2017.

EZEUGU, L. I.; OKOLO, B. N. Influence of cultivar and steep regime on some protein related properties of sorghum malts. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 102, p. 321-325, 1996. Disponível em:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1996.tb00917.x/pdf>. Acesso em: 26 fev. 2017.

EZEOGU, L. I.; OKOLO, B. N. Relationship between some sorghum malt quality characteristics and nature of alkaline steep. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 105, p. 49-54, 1999. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1999.tb00005.x/epdf>. Acesso em: 26 fev. 2017.

FAO. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/PP>. Accessed 30 marc. 2015

FĂRCAȘ, A.; TOFANĂ, M.; SOCACI, S.; SCROB, S.; SALANȚĂ, L.; BORȘA, A. Preliminary study on antioxidant activity and polyphenols content in discharged waste from beer production. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 19, p. 319-324, 2013.

FASANO, A.; CATASSI, C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. **Gastroenterology**, v. 24, n. 6, p. 636-651, 2001. Disponível em: [http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(01\)25187-7/pdf](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(01)25187-7/pdf). Acesso em: 26 fev. 2017.

FOX, G.; VISSER, J.; SKOV, T.; MEIJERING, I.; MANLEY, M. Effect of different analysis conditions on rapid visco analyser malt viscograms in relation to malt of varying fermentability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, p. 183-192, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.137>. Acesso em: 16 jun. 2019.

FRIC, P.; GABROVSKA, D.; NEVORAL, J. Celiac disease, gluten-free diet, and oats. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 2, p. 107-115, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21294744>. Acesso em: 30 jul. 2018.

GARZÓN, A. G.; DRAGO, S. R. Aptitude of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) hybrids for brewery or bio-functional malted beverages. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1-11, 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/requests/r53364929>. Acesso em: 2 fev. 2019.

GOMES, L. O. F.; SANTIAGO, R. A. C.; KOAKUZU, S. N.; BASSINELLO, P. Z. Estabilidade microbiológica e físico-química de misturas para bolo sem glúten e qualidade dos bolos prontos para consumo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 283-295, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.0914>. Acesso em: 12 nov. 2015.

GONCALVES, L. M.; MAGALHAES, P. J.; VALENTE, I. M.; PACHECO, J. G.; DOSTALEK, P.; SYKORA, D.; RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. Analysis of aldehydes in beer by gas-diffusion microextraction: characterization by high-performance liquid chromatography-diode-array detection-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3717-3722, 2010. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967310004620>. Acesso em: 30 mar. 2016.

GRAHAM, R.; SKURRAY, G.; CAIGER, P. Nutritional studies on yeasts during batch and continuous fermentation. I. Changes in vitamin concentrations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, p. 366-371, 1970.

GUERRA, N. P.; TORRADO, A.; LOPEZ, C.; MARTINEZ, E.; GARCIA, S.; SIMAL, J.; PASTRANA, L. M. Use of amylolytic enzymes in brewing. In: GUERRA, N. P.; TORRADO, A.; LOPEZ, C.; MARTINEZ, E.; GARCIA, S.; SIMAL, J.; PASTRANA, L. M. **Beer in health disease prevention**. London: Elsevier, 2009. p. 113-126.

GULDFELDT, U.; ARNEBORG, N. The effect of yeast trehalose content at pitching on fermentation performance during brewing fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, p. 37-39, 1998. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.2050-0416.1998.tb00972.x>. Acesso em: 30 mar. 2016.

GUPTA, M.; ABU-GHANNAM, N.; GALLAGHAR, E. Barley for brewing: characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** v. 318-328, v. 9, 2010.

HABOUCHA, J.; MASSCHCLEIN, C. A. **Cerevisia**, v. 1, p. 97, 1976.

HARDIE, D. G.; MANNERS, D. J.; YELLOWLEES, D. The limit dextrinase from malted sorghum. **Carbohydrate Research**, v. 50, p. 75-85, 1976. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621500840847>. Acesso em: 28 set. 2017.

HASSANI, A.; ZARNKOW, M.; BECKER, T. Influence of malting conditions on sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) as a raw material for fermented beverages. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 6, p. 453-463, 2014. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1082013213490710>. Acesso em: 30 mar. 2016.

HOFFMANN, E. M.; MUETZEL, S.; BECKER, K. A modified dot-blot method of protein determination applied in the tannin-protein precipitation assay to facilitate the evaluation of tannin activity in animal feeds. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 421-426, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010581>. Acesso em: 4 fev. 2018.

HOUGH, J. S.; BRIGGS, D. E.; STEVENS, R. **Mailing and Brewing Science**. London: Chapman & Hall, 1971. Cap. 4-6.

HOUSE LR. 1987. MANUEL POUR LA SÉLECTION DU SORGHO. 2E ÉDITION F ICRISAT PATANCHERU, A., INDE.186-189.,

HU, S.; FAN, W.; DONG, J.; YIN, H.; YU, J.; LIU, J.; HUANG, S.; HUANG, S.; ZHANG, C. Validation and application of osmolyte concentration as an indicator to

evaluate fermentability of wort and malt. v. 123, p. 488-496, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jib.454>. Acesso em: 30 mar. 2018.

IGYOR, M. A.; OGBONNA, A. C.; PALMER, G. H. Effect of malting temperature and time on enzyme development and sorghum wort properties. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, p. 101-104, 1998. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1998.tb00982.x/pdf>. Acesso em: 2 Fev. 2018.

IGYOR, M. A.; OGBONNA, A. C.; PALMER, G. H. Effect of malting temperature and mashing methods on sorghum wort composition and beer flavour. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1039-1044, 2001. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0032959200002673/1-s2.0-S0032959200002673main.pdf?tid=5a9feefc-ff4b-11e6-b0a30000aab0f01&acdnat=1488461159b1a71937cbc0cea5da7d737a5ea92d92>. Acesso em: 31 jul. 2015.

INGLEDEW, M. Fuel ethanol. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 5, p. 31-35, 2012.

IZYDORCZYK, M. S.; DEXTER, J. E. Barley β -glucans and arabinoxylans: molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products-a Review. **Food Research International**, v. 41, p. 850-868, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996908000707>. Acesso em: 31 jul. 2015.

JURIĆ, A.; ĆORIĆ, N.; ODAK, A.; HERCEG, Z.; TIŠMA, M. Analysis of total polyphenols, bitterness and haze in pale and dark lager beers produced under different mashing and boiling conditions. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, p. 541-547, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.254>. Acesso em: 16 fev. 2019.

KAYODÉ, A. P. P.; HOUNHOUIGAN, D. J.; NOUT, M. J. R.; NIEHOF, A. Household production of sorghum beer in Benin: technological and socio-economic aspects. **International Journal of Consumer Studies**, v. 31, p. 258-264, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1470-6431.2006.00546.x>. Acesso em: 30 mar. 2016.

KERPES, R.; FISCHER, S.; BECKER, T. The production of gluten-free beer: Degradation of hordeins during malting and brewing and the application of modern process technology focusing on endogenous malt peptidases. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 129-138, 2017. Disponível em: <https://www.elsevier.com/search-results?query=celiac%20disease%20prevalence&labels=journals&page=1>. Acesso em: 30 jul. 2017.

KNATCHBULL, F. B.; SLAUGHTER, C. The effect of low CO₂ pressure on the absorption of amino acids and production of flavouractive volatiles by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 93, p. 420-424, 1987. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1987.tb04530.x>. Acesso em: 30 jan. 2019.

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, p. 317-323, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172308701907?via%3Dihub>. Acesso em: 30 mar. 2018.

KOBUE-LEKALAKE, R.; TAYLOR, J. R. N.; DE-KOCK, H. L. Effects of phenolics in sorghum grain on its bitterness, astringency and other sensory properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1940-1948, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jsfa.2940>. Acesso em: 16 fev. 2019.

KUCHARCZYK, K.; TUSZYŃSKI, T. The effect of temperature on fermentation and beer volatiles at an industrial scale. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, p. 230-235, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jib.491>. Acesso em: 30 mar. 2018.

KUMAR, D.; KUMAR, V.; VERMA, R. P. S.; KHARUB, A. S.; SHARMA, I. Quality parameter requirement and standards for malt barley-a review. **Agricultural Reviews**, v. 34, n. 4, p. 313-317, 2013. Disponível em: <http://www.arccjournals.com/uploads/articles/R3449.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2016.

KUMAR, R. S. S.; SINGH, S. A.; RAO, A. G. A. Thermal stability of α -amylase from malted jowar (*Sorghum bicolor*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6883-6888, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104815>. Acesso em: 30 mar. 2016.

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. Berlin, Germany: VLB Berlin, 2004. p. 949.

LEE, C. A.; ISMAIL, B.; VICKERS, Z. M. The role of salivary proteins in the mechanism of astringency. **J. Food Sci.**, v. 77, p. 381-387, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3841.2012.02644.x>. Acesso em: 16 fev. 2019.

LEFYEDI, M. L.; TAYLOR, J. R. N. Effect of dilute alkaline steeping on the microbial contamination, toxicity and diastatic power of sorghum malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 2, p. 108-116, 2006. Disponível em: file:///C:/Users/cliente/Downloads/Lefyedi_et_al-2006-Journal_of_the_Institute_of_Brewing.pdf. Acesso em: 19 nov. 2015.

LIN, J.; JIA, B.; SHAN, S.; XU, S. Fed-batch fermentation with glucose syrup as an adjunct for high-ethanol beer brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, p. 426-432, 2014.

LIU, Y.; GU, X.; TANG, J.; LIU, K. Antioxidant activities of hops (*Humulus lupulus*) and their products. **Journal American Society Brewery Chemistry**, v. 65, p. 116-121, 2007. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1094/ASBCJ-2007-0211-01>. Acesso em: 5 mar. 2018.

LYUMUGABE, F.; GROS, J.; J.NZUNGIZE; BAJYANA, E.; THONART, P. Characteristics of African traditional beers brewed with sorghum malt: a review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 16, n. 4, p. 509-530, 2012. Disponível em:

https://www.uclouvain.be/cps/ucl/doc/inbr/documents/Lyumugabe_2012_BASE_af_rican-sorghum-beers.pdf. Acesso em: 12 nov. 2015.

LYUMUGABE, F.; PRIMITIVE, J.; BAJYANA, E.; THONART, P. Production of traditional sorghum beer “*Ikigage*” using *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum* and *Issatckenkia orientalis* as starter cultures. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 507-515, 2014. Disponível em: http://file.scirp.org/pdf/FNS_2014031109481998.pdf. Acesso em: 26 fev. 2017.

MAOURA, N.; POURQUIE, J. Sorghum beer: production, nutritional value and impact upon human health. In: MAOURA, N.; POURQUIE, J. **Beer in health disease prevention**. Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press, 2009. p. 53-60.

MARIANI, M.; OLIVEIRA, V. R.; FACCIN, R.; RIOS, A. O.; VENZKE, J. G. Elaboração e avaliação de biscoitos sem glúten a partir de farelo de arroz e farinhas de arroz e de soja. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 1, p. 70-78, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.6514>. Acesso em: 12 nov. 2015.

MASSCHELEIN, C. A. The biochemistry of maturation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 92, p. 213-219, 1986. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04403.x>. Acesso em: 05 jun. 2019.

MATUMBA, L.; MONJEREZI, M.; KHONGA, E. B.; LAKUDZALA, D. D. Aflatoxins in sorghum, sorghum malt and traditional opaque beer in southern Malawi. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 266-268, 2011. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S095671351000229X/1-s2.0-S095671351000229Xmain.pdf?_tid=cc77c2a4-ff49-11e6-8bc50000aab0f01&acdnat=1488460491_c4b9368852bf7485bc68ccfa4f3f8e7c. Acesso em: 26 fev. 2017.

MAYER, H.; CECCARONI, D.; MARCONI, O.; SILEONI, V.; PERRETTI, G.; FANTOZZI, P. Development of an all rice malt beer: a gluten free alternative. **Food Science and Technology**, v. 67, p. 67-73, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815303297>. Acesso em: 30 mar. 2018.

MEILGAARD, M. Effects on flavor of innovations in brewery equipment and processing: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 107, p. 271-286, 2001. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.2050-0416.2001.tb00098.x>. Acesso em: 30 mar. 2016.

MORRALL, P.; BOYD, H. K.; TAYLOR, J. R. N. Effect of germination time, temperature and moisture on malting of sorghum. **Journal of the Institute of Brewing**, 92, 439 - 445, 1986a. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04437.x/pdf>. Acesso em: 31 jul. 2015.

MORRALL, P.; BOYD, H. K.; TAYLOR, J. R. N. Effect of germination time, temperature and moisture on malting of sorghum. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 92, p. 439-445, 1986b. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04437.x/pdf>. Acesso em: 31 jul. 2015.

MULTANI, D. S.; BRIGGS, S. P.; CHAMBERLIN, M. A.; BLAKESLEE, J. J.; MURPHY, A. S.; JOHAL, G. S. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants. **Science**, v. 302, p. 81-84, 2003. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/302/5642/81.long>. Acesso em: 29 jul. 2018.

MUSIGAKUN, P.; THONGNGAM, M. Characteristics and functional properties of sorghum protein (kafirin). **Kasetsart Journal : Natural Science**, v. 41, p. 313-318, 2007. Disponível em: <http://www.thaiscience.info/journals/Article/TKJN/10471506.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2016.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: process and product optimization using designed experiments**. New York: John Wiley & Sons 1995. p. 728.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons Inc., 2002.

NDUBISI, C. F.; OKAFOR, E. T.; AMADI, O. C.; NWAGU, T. N.; OKOLO, B. N.; MONEKE, A. N.; ODIBO, F. J. C.; OKORO, P. M.; AGU, R. C. Effect of malting time, mashing temperature and added commercial enzymes on extract recovery from a Nigerian malted yellow sorghum variety. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, p. 156-161, 2016. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.307/pdf>. Acesso em: 12 ago. 2016.

NNAMCHI, C. I.; OKOLO, B. N.; MONEKE, A. N. Grain and malt quality properties of some improved Nigerian sorghum varieties. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, p. 353-359, 2014. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.164/pdf>. Acesso em: 12 ago. 2016.

NORRIS, K.; LEWIS, M. I. **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas**, v. 22, p. 154, 1965.

NOUT, M. J. R.; DAVIES, B. J. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 86, p. 18, 1980.

NOVELLIE, L. Kaffircorn malting and brewing studies. III. Determination of amylases in kaffircorn malts. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 441-449, 1959. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740100808/pdf>. Acesso em: 20 fev. 2017.

NOVELLIE, L. Kaffir corn malting and brewing studies XII. Effect of malting conditions on malting losses and total amylases activity. **Journal Science Food Agriculture**, v. 13, p. 121-123, 1962a. Disponível em: [file:///C:/Users/EEL/Downloads/Novellie-1962-Journal_of_the_Science_of_Food_and_Agriculture%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/EEL/Downloads/Novellie-1962-Journal_of_the_Science_of_Food_and_Agriculture%20(1).pdf). Acesso em: 20 fev. 2017.

NOVELLIE, L. Kaffircorn malting and brewing studies XI. Effect of malting conditions on the diastatic power of kaffircorn malts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 13, p. 115-120, 1962b. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740130210/pdf>. Acesso em: 20 fev. 2017.

NOVELLIE, L. Kaffircorn malting and brewing studies. XIII.-Variation of diastatic power with variety, season, maturity and age of grain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 13, p.124-126, 1962c. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740130212/pdf>. Acesso em: 20 fev. 2016.

NSO, E. J.; AJEBESOME, P. E.; MBOFUNG, C. M.; PALMER, G. H. Properties of three sorghum cultivars used for the production of bili-bili beverage in north Cameroon. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, n. 3, p. 245-250, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00165.x>. Acesso em: 9 ago. 2018.

ODIBO, F. J. C.; NWANKWO, L. N.; AGU, R. C. Production of malt extract and beer from Nigerian sorghum varieties. **Process Biochemistry** v. 37, p. 851-855, 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959201002862?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2017.

OGBONNA, A. C. Proteolytic enzymes and protein modification in malting sorghum: a review. **MBAA TQ**, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/249300347_Proteolytic_Enzymes_and_Protein_Modification_in_Malting_Sorghum_A_Review. Acesso em: 30 set. 2017.

OGBONNA, A. C. Current developments in malting and brewing trials with sorghum in Nigeria: a review. **Journal of Institute of Brewing**, v. 117, n. 3 p. 394-400, 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00485.x/epdf>. Acesso em: 26 fev. 2017.

OGU, E. O.; ODIBO, F. J. C.; AGU, R. C.; PALMER, G. H. Quality assessment of different sorghum varieties for their brewing potential. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 2, p. 117-121, 2006. Disponível em:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00241.x/pdf>. Acesso em: 19 nov. 2015.

OKAFOR, N.; ANICHE, G. N. Brewing a larger beer from Nigerian sorghum. **Brewing and Distilling International**, v. 10 p. 32-35, 1980.

OKOLI, E. V.; OKOLO, B. N.; MONEKE, A. N.; IRE, F. S. Effects of cultivar and germination time on amylolytic potential, extract yield and wort fermenting properties of malting sorghum. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 14-26, 2010. Disponível em: <http://scialert.net/qredirect.php?doi=ajbkr.2010.14.26&linkid=pdf>. Acesso em: 12 ago. 2016.

OKOLO, B. N.; EZEUGU, L. I. Enhancement of amylolytic potential of sorghum malts by alkaline steep treatment. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 102, p. 79-85, 1996. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1996.tb00897.x/epdf>. Acesso em: 12 ago. 2016.

OLATUNJI, O.; JIBOGUN, A. C.; ANIBABA, T. S.; OLIYIDE, V. P.; OZUMBA, A. U.; ONIWINDE, K. O. Effect of different mashing procedures on the quality of sorghum beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 51, p. 67-70, 1993.

OVVUAMA, C. I. Brewing beer with sorghum. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 105, n. 1, p. 23-34, 1999. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1999.tb00002.x/pdf>. Acesso em: 1 mar. 2017.

OWUAMA, C. I. Sorghum: a cereal with lager beer brewing potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, n. 3, p. 253-260, 1997.

OWUAMA, C. I.; ASHENO, I. Studies on malting conditions for sorghum. **Food Chemistry**, v. 49, p. 257-260, 1994. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0308814694901694>. Acesso em: 19 nov. 2015.

OWUAMA, C. I.; OKAFOR, N. Studies on mashing methods for beer brewing with sorghum. **MIRCEN Journal of Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 3, p. 243-253, 1987. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00933578.pdf>. Acesso em: 3 jul. 2017.

PALMER, G. H. Cereals in malting and brewing. In: PALMER, G. H. **Cereal Science and Technology**. Aberdeen, Scotland: Aberdeen University Press, 1989. p. 61-242.

PALMER, G. H.; ETOKAKPAN, O. U.; IGYOR, M. A. Review: Sorghum as brewing material. **MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 5, p. 265-275, 1989. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01741756>. Acesso em: 6 mar. 2017.

PANCHAL, C. J.; STEWART, G. G. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 86, p. 207-210, 1980.

PATHIRANA, R. A.; SIVAYOGASUNDARAM, K.; JAYATISSA, P. M. Optimisation of conditions for malting of sorghum. **Journal of Food Science and Technology**, v. 20, n. 3, p. 108 -111, 1983. Disponível em: <http://eprints.icrisat.ac.in/id/eprint/3484>. Acesso em: 31 jul. 2015.

PATINDOL, J.; MENDEZ-MONTEALVO, G.; WANG, Y.-J. Starch properties of malted barley in relation to realdegree of fermentation. **Starch/Stärke**, v. 64, p. 517-523, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/star.201100171>. Acesso em: 30 ago. 2016.

PERÄÄHO, M.; KAUKINEN, K.; MUSTALAHTI, N.; VUOLTEENAHO, N.; MÄKI, M.; LAIPPALA, P.; COLLIN, P. Effects of an oats-containing gluten-free diet on symptoms and quality of life in celiac disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 39, p. 27-31, 2004.

PIERCE, J. S. The role of nitrogen in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 93, p. 378-381, 1987. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1987.tb04520.x/epdf>. Acesso em: 19 nov. 2015.

PIRES, E. J.; J.A.TEIXEIRA; BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A. Yeast: the soul of beer's aroma - a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, p. 1937-1949, 2014a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384752>. Acesso em: 30 ago. 2016.

PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A. Carrier-free, continuous primary beer fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, p. 500-506, 2014b. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jib.177>. Acesso em: 30 jan. 2018.

PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; T.BRÁNYIK; CÔRTE-REAL, M.; VICENTE, A. A. Maintaining yeast viability in continuous primary beer fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, p. 52-59, 2014c. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jib.111>. Acesso em: 30 jan. 2018.

POPESCU, V.; SOCEANU, A.; DOBRINAS, S.; STANCIU, G. A study of beer bitterness loss during the various stages of the Romanian beer production process. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, p. 111-115, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.82>. Acesso em: 12 fev. 2019.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JAIN, N.; JOSHI, H. C. Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 2415-2420, 2007. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/233746455>. Acesso em: 12 nov. 2015.

PSOTA, V.; VEJRAZKA, K.; FAMERA, O.; HRCKA, M. Relationship between grain hardness and malting quality of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, p. 80-86, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.2050-0416.2007.tb00260.x>. Acesso em: 19 jun. 2018.

RODRÍGUEZ, Y. B.; AGUILAR, I. G.; ALMEIDA-E-SILVA, J. B. A. Use of sorghum malt in brewing: review. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 2-10, 2018. Disponível em: <http://bjft.ital.sp.gov.br/>. Acesso em: 30 jan. 2019.

ROONEY, L. W.; MILLER, F. R. Variations in the structure and kernel characteristics of sorghum. In: ROONEY, L. W.; MILLER, F. R. **Proceedings of International Symposium on Sorghum Grain Quality**. Patancheru, India, 1982. p. 143-162.

ROSELL, C. M.; BARRO, F.; SOUSA, C.; MENA, M. C. Cereals for developing gluten-free products and analytical tools for gluten detection. **Journal of Cereal Science**, v. 59, p. 354-364, 2014.

ROSSI, S.; SILEONI, V.; PERRETTI, G.; MARCONI, O. Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 919-928, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23929274>. Acesso em: 30 jan. 2018.

SAERENS, S.; VERBELEN, P.; VANBENEDEN, N. Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 80, p. 1039-1051, 2008.

SENAI 1997. Conheça a cerveja. Vassouras: Setor de documentação bibliográfica do CENATEC de produtos alimentares do SENAI-DR/RJ.

SECKINGER, H. L.; WOLF, M. J. Sorghum protein ultrastructure as it relates to composition. **Cereal Chemistry**, v. 50, p. 455-465, 1973. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=31052&content=PDF>. Acesso em: 12 ago. 2016.

SERNA-SALDIVAR, S. O.; TELLES-GIRON, A.; ROONEY, L. W. Production of tortilla chips from sorghum and maize. **Journal of Cereal Science**, v. 8, p. 275-284, 1988.

SILVA, C.; BRITO, J.; SOUZA, M. Z.; A.SILVEIRA; LUVIELMO, M. M.; SALAS, M. M. Adição de colágeno em pão sem glúten elaborado com farinha de arroz. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. 2-10, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjft/v20/1981-6723-bjft-1981-672310516.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2017.

SOLGAJOVÁ, M.; FRANČÁKOVÁ, H.; DRÁB, S.; TÓTH, Ž. Effect of temperature on the process of primary fermentation. **Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, p. 1791-1799, 2013. Disponível em:

<https://pt.scribd.com/document/211905300/Effect-of-Temperature-on-the-Process-of-Beer-Primary-Fermentation>. Acesso em: 4 jan. 2019.

STEINER, E.; AUER, A.; BECKER, T.; GASTL, M. Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 803-813, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jsfa.4651>. Acesso em: 4 jan. 2019.

TAYLOR, J. P.; ARENDT, E. K. A fundamental study on the relationship between barley cultivar and hordeins in single cultivar beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, p. 243-250, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.321>. Acesso em: 11 fev. 2019.

TAYLOR, J. P.; JACOB, F.; ARENDT, E. K. Fundamental study on the impact of silica gel and tannic acid on hordein levels in beer. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 31, p. 177-184, 2015a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856415001538>. Acesso em: 11 fev. 2019.

TAYLOR, J. P.; JACOB, F.; ARENDT, E. K. Fundamental study on the impact of transglutaminase on hordein levels in beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 73, p. 253-260, 2015b. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1094/ASBCJ-2015-0527-01>. Acesso em: 11 fev. 2019.

TAYLOR, J. R. N.; BOYD, H. K. Free α -amino nitrogen production in sorghum beer mashing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 37, p. 1109-1117, 1986.

TAYLOR, J. R. N.; DEWAR, J. Role of alpha-glucosidase in the fermentable sugar composition of sorghum malt mashes. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 100, p. 417-419, 1994. Disponível em: http://researchspace.csir.co.za/dspace/bitstream/10204/2032/3/taylor_1994.pdf. Acesso em: 28 fev. 2017.

TAYLOR, J. R. N.; DLAMINI, B. C.; KRUGER, J. 125th Anniversary Review: The science of the tropical cereals sorghum, maize and rice in relation to lager beer brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v.119, p. 1-14, 2013. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.68/epdf>. Acesso em: 26 fev. 2017.

TAYLOR, J. R. N.; NOVELLIE, L.; LIEBENBERG, N. V. D. W. Sorghum protein body composition and ultrastructure. **Cereal Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 69-73, 1984. Disponível em: http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1984/Documents/chem61_69.pdf. Acesso em: 12 ago. 2016.

TAYLOR, J. R. N.; ROBBINS, D. J. Factors influencing beta-amylase activity in sorghum malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 99, p. 413-416, 1993.

Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1993.tb01181.x/epdf>. Acesso em: 6 jan. 2007.

TAYLOR, J. R. N.; SCHOBBER, T. J.; BEAN, S. R. Novel food and non-food uses for sorghum and millets. **Journal of Cereal Science**, v. 44, p. 252-271, 2006. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/30200510/Publications-2006/2006%20-%20Novel%20and%20non-food%20uses%20for%20sorghum%20and%20millets.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2015.

URIYO, M.; EIGEL, W. E. Duration of kilning treatment on α -amylase, β -amylase and endo-(1, 3) (1, 4)- β -D- glucanase activity of malted sorghum (*Sorghum bicolor*). **Process Biochemistry**, v. 35, p. 433-436, 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/13595113/35/5?sd=2>. Acesso em: 1 jun. 2017.

WANISKA, R. D.; POE, J. H.; BANDYOPADHYAY, R. Effects of growth conditions on grain molding and phenols in sorghum caryopsis. **Journal of Cereal Science**, v. 10, p. 217-225, 1989. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521089800517>. Acesso em: 02 ago. 2018.

WONG, J. H.; LAU, T.; CAI, N.; SINGH, J.; PEDERSEN, J. F.; VENSEL, W. H.; HURKMAN, W. J.; WILSON, J. D.; LEMAUX, P. G.; BUCHANAN, B. B. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 73-82, 2009. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=31910&content=PDF>. Acesso em: 4 jan. 2019.

ZARNKOW, M.; KEßLER, M.; BURBERG, F.; BACK, W.; ARENDT, E. K.; KREISZ, S. The use of response surface methodology to optimise malting conditions of proso millet (*Panicum miliaceum* L.) as a raw material for gluten-free foods. **Journal of Institute of Brewing**, v. 113, n. 3, p. 280-292, 2007. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.2007.tb00288.x/pdf>. Acesso em: 23 ago. 2017.

ZHANG, L.; CHEN, Q.; JIN, Y.; XUE, H.; GUAN, J.; WANG, Z.; ZHAO, H. Energy-saving direct ethanol production from viscosity reduction mash of sweet potato at very high gravity (VHG). **Fuel Processing Technology**, v. 91, p. 1845-1850, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378382010002638>. Acesso em: 4 jan. 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Ficha de avaliação análise sensorial

Nome: _____ Data: _____

Por favor, avalie a amostra codificada da esquerda para a direita e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou da mesma.

Código da amostra: _____

9 – Gostei extremamente	Notas:
8 – Gostei muito	Impressão global: _____
7 – Gostei moderadamente	Cor: _____
6 – Gostei ligeiramente	Aroma: _____
5 – Nem gostei / nem desgostei	Sabor: _____
4 – Desgostei ligeiramente	Aparência: _____
3 – Desgostei moderadamente	
2 – Desgostei muito	
1 – Desgostei extremamente	

Código da amostra: _____ ()

Assinale qual seria sua atitude quanto à compra do produto.

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	_____ ()

Comentários: _____

APÊNDICE B – Modelo do TCLE aplicado aos participantes antes do teste de aceitabilidade

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: **Emprego de sorgo para a produção de cerveja sem glúten.**

Pesquisador Responsável: Yanet Boffill Rodríguez, Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (12) 98201-9715. Pesquisador participante: João Batista de Almeida Silva, Telefones para contato: (12) 3159 5044, (12) 8116 2490

O objetivo do trabalho é produzir uma cerveja sem glúten, a partir de sorgo, com teor de álcool reduzido, que atinja as características sensoriais adequadas para ter uma boa aceitação pelos consumidores. Segundo a CODEX ALIMENTARIUS, um alimento com até 20 ppm de glúten é seguro para o consumo por pessoas celíacas. Se os ingredientes tiveram qualquer contato com outros produtos com glúten se categoriza a chamada contaminação cruzada. Portanto, serão obtidas cervejas com até 20 ppm de glúten, por possível contaminação cruzada devido a que as cervejas de sorgo serão feitas com os mesmos equipamentos das cervejas de cevada. A análise sensorial será feita em duas etapas, por meio de testes afetivos. Em um primeiro momento, será feito um teste para a escolha dos melhores tempos e temperaturas de fermentação; e em outro momento, as variantes escolhidas serão comparadas com uma cerveja comercial. As análises serão realizadas no laboratório de sensorial da Microcervejaria da EEL, em cabines individuais sob condições adequadas de iluminação e temperatura. Os testes serão realizados por consumidores comuns, convocados por intermédio de informativos distribuídos nos campi da Escola de Engenharia de Lorena e selecionados quando consumidores habituais do produto, superiores a 18 anos de idade. Não há nenhum risco,

prejuízo, desconforto ou lesões que podem ser provocados pela pesquisa, com garantia de sigilo e direito de retirar o consentimento a qualquer tempo. Este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para o desenvolvimento de novos produtos.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. Que o trabalho tem por finalidade desenvolver uma tecnologia de produção de cervejas sem glúten, a partir de sorgo, as quais contém até 20 ppm de glúten, por possível contaminação cruzada devido a que serão feitas com os mesmos equipamentos das cervejas de cevada;
2. Que como voluntário deste estudo, terei que participar do teste de aceitação das cervejas e informar o quanto gostei ou desgostei do produto;
3. Que a minha participação como voluntário se limitará a uma seção de avaliação sensorial de aproximadamente 15 minutos em um único dia;
4. Que terei risco mínimo ao participar dessa pesquisa; já que será apenas uma seção com consumo de um pequeno volume do produto, sendo a quantidade de etanol consumida eliminada do sangue em um tempo máximo de 30 minutos;
5. Que necessitarei comparecer ao laboratório de análise sensorial da Microcervejaria da EEL para a realização do teste de aceitação do produto;
6. Que não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
7. Que meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
8. Que poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo ou penalização;
9. Eu não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa;
10. Concordo que este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para o desenvolvimento de novos produtos;
11. Que em caso de qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica pelo telefone (Yanet Boffill Rodríguez, tel: 12 3157 6043 ou 12 98201- 9715);

12. Que tenho conhecimento que este projeto foi avaliado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos, da EACH USP, localizado na Rua Arlindo Bétio, 1000 - Jardim Keralux, São Paulo - SP, 03828-000.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária(o), do estudo **Emprego de sorgo para a produção de cerveja sem glúten**.

Nome e Assinatura do pesquisador

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO PARTICIPANTE

Eu,

_____,
 RG _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **Emprego de sorgo para a produção de cerveja sem glúten**, como participante. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Yanet Boffill Rodríguez sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data _____/_____/_____

Assinatura do Voluntário _____

Assinatura do Pesquisador _____ (MSc.
 Yanet Boffill Rodríguez)

Assinatura do Orientador _____ (Prof. Dr. João
 Batista de Almeida e Silva)