



**INSTITUTO FEDERAL**  
Santa Catarina

Ministério da Educação  
Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica  
**INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CÂMPUS URUPEMA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE BEBIDAS ALCOÓLICAS**

**COMPARAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE CERVEJAS AMERICAN  
PALE ALE PRODUZIDAS COM E SEM ENZIMAS DE  
*ASPERGILLUS NIGER***

**ANA CAROLINA LOVATEL**

**Urupema, SC**  
**2021**

ANA CAROLINA LOVATEL

**COMPARAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE CERVEJAS AMERICAN PALE ALE  
PRODUZIDAS COM E SEM ENZIMAS DE *ASPERGILLUS NIGER***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Tecnologia de Bebidas Alcoólicas, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Câmpus Urupema.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Leilane Costa de Conto

**Urupema, SC**

**2021**

## COMPARAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE CERVEJAS AMERICAN PALE ALE PRODUZIDAS COM E SEM ENZIMAS DE *ASPERGILLUS NIGER*

\* Ana Carolina Lovatel

\*\*Orientadora:DR<sup>a</sup>. Leilane Costa de Conto

\* Acadêmico do Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Bebidas Alcoólicas, IFSC – InstitutoFederaldeSantaCatarina,CampusdeUrupema–SC,Brasil.

E-mail:[anacarol.lovatel@hotmail.com](mailto:anacarol.lovatel@hotmail.com)

\*\*Professora dos cursos Técnico, Superior e Pós-graduação, IFSC – InstitutoFederaldeSantaCatarina,CampusdeUrupema–SC,Brasil.

E-mail:[leilane.conto@ifsc.edu.br](mailto:leilane.conto@ifsc.edu.br)

---

### RESUMO

O mercado cervejeiro artesanal está em constante crescimento nos últimos anos. Além de fornecer diferentes estilos com combinação de ingredientes vem buscando atender também ao mercado de pessoas que apresentam intolerância ao glúten, os celíacos. Uma das alternativas para a produção deste tipo de cervejas é utilizar insumos que não derivem de cereais que contenham glúten, bem como a utilização de enzimas de micro-organismos que degradam moléculas de glúten como *Aspergillus niger*. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar características físico-químicas de cervejas artesanais do tipo American Pale Ale (APA) produzidas com e sem adição de enzimas de *Aspergillus niger* para produção de cerveja sem glúten. A cerveja foi produzida através do método BIAB. Para a caracterização físico-química das cervejas do tipo American Pale Ale foram considerados 3 tratamentos, sendo dois tratamentos com as cervejas produzidas de forma artesanal com enzima Clarity Ferm WLN 4000 HB (E); tratamento padrão, sem enzima (P); e um terceiro tratamento constituído de uma cerveja comercial do mesmo estilo e sem glúten (C). As cervejas foram analisadas em duas garrafas com 3 repetições procedendo as avaliações de sólidos solúveis (brix), acidez total, pH, compostos fenólicos totais, teor alcoólico, taninos, cor, flavonóides, turbidez e proteínas. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA com aplicação do teste F e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os resultados apresentados ficaram dentro do limite aceitável para o estilo APA produzido e demonstram que existem diferenças significativas nos parâmetros físico-químicos na acidez total, pH, cor, turbidez e proteína. O tratamento com adição de enzima a base de *Aspergillus niger* apresentou as maiores médias para todos os testes realizados, com exceção da cor que as maiores médias foram para o tratamento padrão sem adição de enzima.

**Palavras-chave:** Cerveja artesanal, *Aspergillus niger*, enzima e glúten.

## **PHYSICAL-CHEMICAL COMPARISON OF AMERICAN PALE ALE BEERS PRODUCED WITH AND WITHOUT *ASPERGILLUS NIGER* ENZYMES**

### **ABSTRACT**

The craft beer market has been constantly growing in recent years. In addition to providing different styles with combination of ingredients, it has also been seeking to serve the market of people who have gluten intolerance, celiacs. One of the alternatives for the production of this type of beers is to use ingredients that are not derived from cereals that contain gluten, as well as the use of enzymes from microorganisms that degrade gluten molecules such as *Aspergillus niger*. From this, the objective of this work was to evaluate the physicochemical characteristics of American Pale Ale (APA) craft beers produced with and without addition of *Aspergillus niger* enzymes for the production of gluten-free beer. Beer was produced using the BIAB method. For the physicochemical characterization of American Pale Ale beers, 3 treatments were considered, being that two treatments were with beers produced artisanally with the enzyme Clarity Ferm WLN 4000 HB (E); standard treatment, no enzyme (P); and a third treatment consisting of a commercial beer of the same style and gluten free (C). The beers were analyzed in two bottles with 3 replications, evaluating soluble solids (brix), total acidity, pH, total phenolic compounds, alcohol content, tannins, color, flavonoids, turbidity and proteins. The data obtained were submitted to ANOVA with application of the F test and the means were compared to each other by the Tukey test at 5% significance. The results presented were within the acceptable limit for the APA style produced and demonstrate that there are significant differences in physicochemical parameters in total acidity, pH, color, turbidity and protein. The treatment with addition of enzyme based on *Aspergillus niger* presented the highest average for all tests performed, with the exception of color, which had the highest average for the standard treatment without addition of enzyme.

**Keywords:** Craft Beer, *Aspergillus niger*, enzyme and gluten.

## **1. Introdução**

A cerveja é definida como uma bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro, de acordo com o Art. 2 da INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 65, DE 10 DE DEZEMBRO DE 2019 (BRASIL, 2019).

Com uma vasta gama de insumos que pode ser combinados para a produção da bebida o setor cervejeiro apresenta forte crescimento ao longo dos últimos anos. Este setor cervejeiro caracteriza-se como um dos mais relevantes da economia brasileira com investimentos na casa dos bilhões de reais (LIMA et al. 2017). O Brasil se destaca e ocupa o lugar de terceiro maior produtor mundial, com mais de 1.190 empresas registradas e produção de 14 bilhões de litros por ano. Essa produção representa cerca de 2% do Produto Interno Bruto (PIB), com faturamento de R\$ 100 bilhões por ano e geração de 2,7 milhões de empregos (MAPA, 2019).

Destes 14 bilhões de litros estimasse que 12 milhões sejam produzidos por cervejarias artesanais, segundo dados do Anuário da Cerveja (BRASIL, 2020) estas por sua vez apresentam um crescimento do número de cervejarias no país, sendo que nos últimos 20 anos este tem sido constante, com uma média de 19,6% de aumento ao ano, com destaque para os últimos 5 anos que este crescimento atingiu 36,4%. Este crescimento se deu em função de atender a demanda de consumidores que apresentem gostos dos mais variados e necessidades muitas vezes específicas, sendo um mercado pouco explorado, mas que merece um destaque o das cervejas sem glúten.

O glúten por sua vez é uma proteína, elástica, aderente, insolúvel em água, responsável pela estrutura das massas alimentícias e está presente em cervejas. Este é constituído por frações de gliadina e de glutenina, que, na farinha de trigo, totalizam 85% da fração proteíca. Ainda, essas proteínas podem estar presentes em outros cereais, como cevada, centeio e aveia, nas formas de hordeína, secalina e avenina, respectivamente (ARAÚJO et al., 2010).

Estes cereais são base na fabricação de cervejas (maltes) e isso tem impacto importante sobre a população de celíacos, uma vez que estas representam 1% da população mundial (WATSON et al, 2019). Os portadores desta doença não têm tratamentos médicos eficazes, como remédios ou vacinas, o que traz como única alternativa das pessoas sensíveis ao glúten seguir uma dieta restrita deste composto ao longo de toda vida (WIESER et al., 2014; SCHERF, 2015; SCHERF et al., 2016).

No Brasil não existe uma legislação que estipula os limites toleráveis de glúten permitidos nos alimentos, porém a Lei nº 10.674/2003 (BRASIL, 2003) estabelece que todo alimento vendido já

embalado deve conter a expressão “CONTÉM GLÚTEN” ou “NÃO CONTÉM GLÚTEN”, como uma medida preventiva. Porém, até 2015 a ANVISA seguia os limites estipulados pelo CODEX ALIMENTARIUS, que estabelecia que os alimentos e bebidas que apresentam até 20 ppm de glúten é seguro para o consumo por pessoas celíacas, isso significa que em 1 kg de alimento são aceitos 20 mg de glúten (CODEX, 2008).

Mesmo sendo um limite considerado baixo, os 20 ppm quando se trata de celíaco agudo pode causar alergias, o que fez com que a ANVISA no ano de 2015 estabelecesse a RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 26, DE 2 DE JULHO DE 2015, que trata de compostos alergênicos, passando a categorizar alimentos sem glúten aqueles que, quando analisados laboratorialmente, apresentem quantidades “indetermináveis” de glúten (ANVISA, 2015), pois admite-se que existem diversos graus da doença celíaca.

Devido a estas restrições os alimentos e bebidas sem glúten devem seguir dois caminhos para sua produção: produtos feitos de grãos sem glúten e produtos contendo glúten processados para obter um teor final abaixo do nível que o organismo tolere (WATSON et al, 2019). Quando se trata de cervejas rotuladas como sem glúten que são feitas com grãos que não contêm glúten, os maltes são provenientes de cereais como o milho, sorgo, trigo sarraceno, arroz, os quais conferem às cervejas um perfil de sabor muito diferente do que cervejas de malte tradicionais e por muito tempo foram as únicas opções para as pessoas com intolerância ao glúten (van ZANDYCKE, 2014).

Uma alternativa bem eficiente para a produção de cervejas sem glúten é a utilização de enzima, esta apresenta prolil (ou prolina-específica – nome comercial Brewers Clarex), uma endoprotease proveniente do *Aspergillus niger* que é amplamente utilizada para estabilização de cerveja (CRAIG; Van ROON, 2007). Com uma pequena adição da enzima no início da fermentação, a cerveja pode ser estabilizada por um período de até um ano, sem qualquer efeito sobre a espuma (que tem pouca prolina) ou sabor (van ZANDYCKE, 2014).

As proteínas sensíveis a essa enzima são também as causadoras de turbidez e estão contidas na fração de hordeína do grão da cevada, assim a enzima tem essencialmente uma aplicação dupla ao quebrar os epítomos tóxicos do glúten, tornando-os não reativos para o organismo dos consumidores (STEPNIAK et al, 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar características físico-químicas de cervejas artesanais do Tipo American Pale Ale produzidas com e sem enzima *Aspergillus niger* buscando uma avaliar cervejas sem glúten.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Matérias-primas**

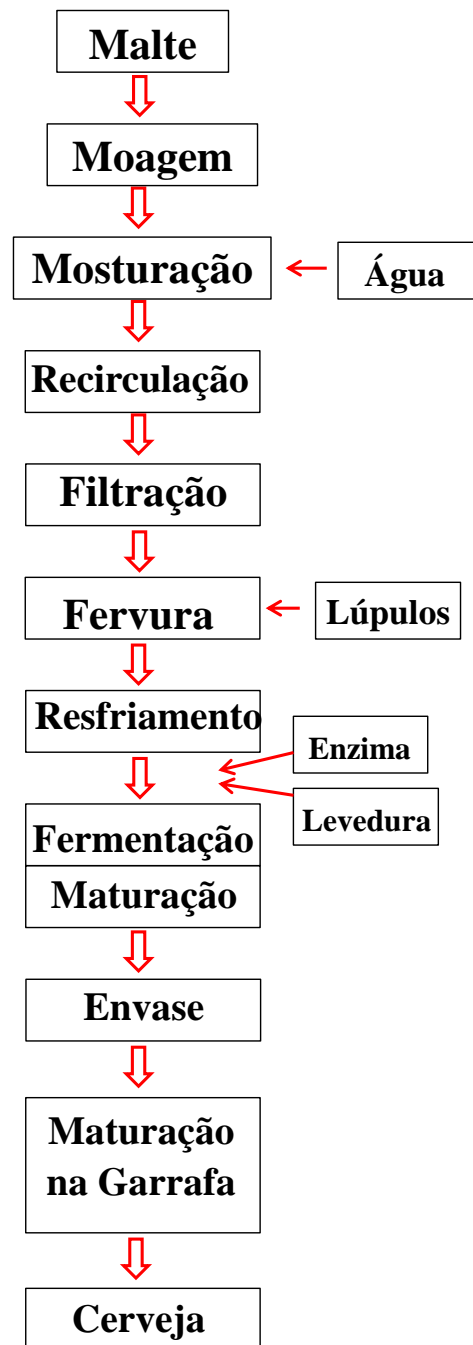
Para a produção da cerveja artesanal foi escolhido o estilo American Pale Ale (APA) versão Malte Pilsen, com volume de 20L. Os insumos usados foram adquiridos no comércio da cidade de Lages, Santa Catarina, com exceção da enzima Clarity Ferm WLN 4000 HB (*Aspergillus niger*) que foi adquirida em loja *online*.

A cerveja apresenta como características desejadas: 1.050OG, 1.011FG, 5,1%ABV, 36,8 IBU e 16,5 EBC. Conforme a receita seguida, foram adquiridos 3 tipos de malte, estes nas proporções de 3kg de malte Pilsen, 1 kg de malte Munich e 0,5kg de malte Cara Ruby, todos triturados pela própria empresa de insumos. Foi utilizada água mineral e dois tipos de lúpulo, sendo 50 g de Chinook e 40 g de Cascade, ainda se fez uso da levedura Sachet US05.

### **2.2 Produção da cerveja**

As cervejas foram produzidas no Instituto Federal Catarinense, Campus de Lages-SC.

O processo de produção da cerveja estilo APA com glúten e sem glúten está descrito no fluxograma abaixo (Figura 1), o qual está descrito as etapas logo em seguida:



**Figura 1-** Fluxograma do processo de produtivo das duas cervejas de estilo APA com e sem enzima para retirada do glúten.

A cerveja foi produzida através do método Brew in a Bag (BIAB), no Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Campus de Lages – Santa Catarina. O passo inicial no processo de produção da cerveja foi a etapa de brasagem, caracterizada principalmente pela mostura. Nesta etapa, ocorreu a adição de 14 litros de água mineral a 45°C em uma panela juntamente com os maltes sobre um tecido para realizar a filtração, sempre controlando a temperatura rigorosamente com auxílio de um



termômetro, conforme indicado na Figura 3-A. Em seguida a mistura foi aquecida até atingir 67°C, esta mantida por 60 minutos (controlado pelo teste de iodo) caracterizando o processo de *Mah in*. A temperatura foi elevada para 78°C por mais 10 minutos para o *Mash out*, assim obtivemos o mosto.

No decorrer deste processo, realizaram-se várias análises de brix utilizando um refratômetro (0-32brix) e teste de iodo. Após estes 70 minutos, realizamos a recirculação do mosto com ajuda de uma bomba e um chuveiro por aproximadamente 60 minutos, para ajudar na clarificação, filtração e oxigenação do mosto, conforme Figura 3-B.

A separação da torta do mosto foi realizada com a retirada do saco que estava retendo a torta (*grain bag*), ficando na panela a parte líquida - mosto e no saco, a parte sólida - torta. Baixou-se a temperatura do mosto para aproximadamente 75,6°C e se procedeu a lavagem da torta com um volume de aproximadamente 12 litros de água mineral.

A parte líquida seguiu para a etapa denominada fervura e a parte sólida descartada. O mosto foi aquecido até atingir fervura a uma temperatura de  $98 \pm 1^\circ\text{C}$  permanecendo nesta condição durante uma hora. Com adição de 50 g do lúpulo Chinook (lúpulo de amargor) no início da fervura (Figura 3-C), 20 g de Cascade na segunda adição com 10 minutos para o término da fervura, e por fim, mais 20 g no de Cascade momento que se desligou a panela cervejeira, contemplando 60 minutos de fervura, conforme Figura 2.

### **FERVURA:**



**Figura 2-** Fervura e tempo de adição dos lúpulos na fabricação da cerveja APA.

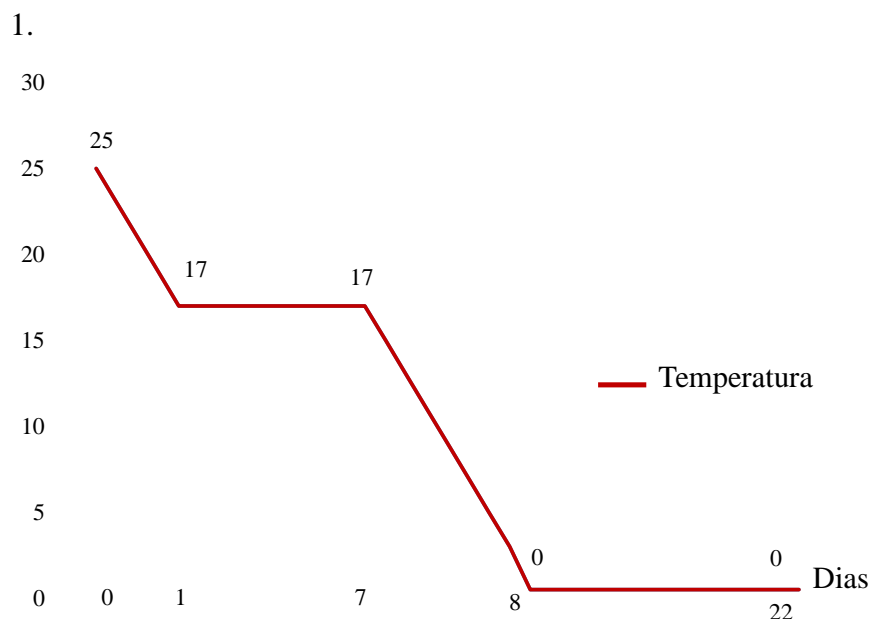
No mosto quente foi inserido um *chiller* de alumínio para auxiliar no rápido resfriamento e assim manter as propriedades desejadas do mesmo (Figura 3-D).



**Figura 3** - Processo de produção de cerveja APA, panela juntamente com os maltes e água mineral acondicionados em um tecido e termômetro para controle da temperatura (A), chuveiro para realizar recirculação da cerveja na panela (B), adição dos lúpulos nos diferentes tempos de fervura (C) e resfriamento rápido com auxílio de um chiller de alumínio (D).

O mosto foi retirado da panela pela torneira, sofrendo ajuste final de açúcares, uma vez que este estava com brix em 19 e o desejado era 12,5. Ao final obtivemos um montante de 15,2 litros de mosto de cerveja estilo APA. Deste montante dividimos em dois baldes com volumes iguais, no primeiro deles adicionou-se a enzima Clarity Ferm WLN 4000 HB (*Aspergillus niger*) juntamente com a levedura para a fermentação e no outro apenas a levedura.

Os dois ensaios foram acondicionados em baldes vedados com airlock. Estes foram levados para BOD onde se deu início a fermentação. No primeiro dia manteve-se a temperatura de 25°C, do segundo até o sétimo dia manteve-se a temperatura em 17°C, do sétimo para oitavo dia reduzindo a temperatura para zero e esta foi mantida até por 14 dias (maturação), conforme indicado no Gráfico 1.



**Gráfico 1-** Tempo e temperaturas que em as cervejas foram submetidas para fermentação e maturação.

Aos 22 dias realizou-se a clarificação com uso de gelatina em ambas cervejas, com  $0,48 \text{ g.L}^{-1}$  de gelatina incolor na cerveja previamente dissolvida em 200 mL de água a  $65^{\circ}\text{C}$ , onde as cervejas foram mantidas entre  $0-2^{\circ}\text{C}$  por 3 dias. Decorridos este período ocorreu o engarrafamento das cervejas, este feito com auxílio de envasadora manual, onde se realizou o *primming* da cerveja com adição de  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose essa adionada nas garrafas de 600 mL que estavam higienizadas.

No momento do engarrafamento a cerveja com enzima apresentava densidade de 1005 e brix de 5,7 e sem enzima (padrão) densidade de 1005 e brix de 5,8 a temperatura de  $22^{\circ}\text{C}$ , conforme Figura 4.



**Figura 4** - Medida de densidade, temperatura e brix das cervejas APA produzidas.

Após o engarrafamento das cervejas obtivemos um total de 12 garrafas de 600 ml para o tratamento com enzima e 12 para o tratamento padrão, sem enzima. Estas por fim foram acondicionadas em uma BOD com temperatura de  $16^{\circ}\text{C}$  durante 7 dias com a finalidade de carbonatar as cervejas, decorrido este período ajustou-se a temperatura da BOD para  $0-2^{\circ}\text{C}$  até se realizar as análises físico-químicas.

### 2.3 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas das cervejas foram realizadas no Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages-SC, da Universidade do Estado de Santa Catarina. Estas por sua vez compostas por 3 tratamentos: padrão (cerveja APA - P); com enzima (sem glúten - E); e uma cerveja comercial sem glúten (C) do estilo APA. Para cada tratamento foram realizadas análises em duas garrafas e estas por sua vez em 3 repetições por garrafa.

O índice de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Folin-Ciocalteu. Um volume de 100 µL da amostra de cerveja em vinte vezes, 1,5 mL de solução de carbonato sódico 20% e 0,5 mL do reativo Folin-Ciocalteu foram misturados. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 765 nm após 2 horas de repouso. Os resultados foram expressos em mg GAE/L (equivalente ácido gálico/L) de amostra, segundo a metodologia Singleton e Rossi (1965) com adaptações.

O teor de flavonóides foi determinado pelo método colorimétrico onde realizaram-se leituras das absorbâncias em espectrofotômetro digital da marca Biospectro, Modelo SP-220, no comprimento de onda de 510 nm. Para a determinação do teor de flavonóides foi utilizada uma curva padrão de catequina e os resultados foram expressos em mg equivalente de catequina por litro de cerveja, conforme metodologia adaptada de Meda et al. (2005) e Ahn et al. (2007).

Para analisar quantidade de taninos as cervejas seguimos a metodologia descrita por Lowenthal (1877), indicando a adição de 1 mL de amostra, 5 mL de uma solução de índigo carmim e 200 mL de água em um erlenmeyer de 250 mL. Após, titulou-se a amostra com uma solução de permanganato de potássio até que o azul se tornasse verde claro e posteriormente amarelo. O valor gasto com a titulação em mL (X) foi registrado. Também foi realizada uma titulação em branco utilizando apenas 5 mL de índigo carmim e 200 mL de água eo valor foi registrado como Y. O cálculo do percentual de taninos totais presentes na amostra (expressos em equivalentes de ácido tânico) foi realizado de acordo com a Eq.1:

$$(\% \text{ taninos totais}) = (X-Y)/10. \quad (\text{Eq.1})$$

A análise de cor foi realizada por espectrofotometria conforme o método padrão de referência *European Brewing Convention* (EBC, 2005). Com o espectrofotômetro digital da marca Biospectro, Modelo SP-220 previamente calibrados com água destilada, as amostras foram submetidas à leitura de comprimento de onda de 430 nm. A unidade de cor foi calculada a partir da Eq.2:

$$(\text{Cor}) = \text{Absorbância (430 nm)} \times 10 \text{ (fator de diluição)} \times 25. \quad (\text{Eq.2})$$

Os sólidos solúveis foram realizados através da leitura direta em refratômetro portátil com valor corrigido a 20°C e os resultados expressos em °Brix.

O pH foi realizado com auxílio do pHmetro da marca Tecnal modelo TEC-7 previamente

calibrado com as soluções padrões de pH 7,0 e 4,0. O eletrodo do equipamento foi emerso na amostra até atingir estabilidade e assim anotado o valor da amostra (EBC, 2005).

Por titulação volumétrica foi determinada a acidez titulável com solução de NaOH 0,1 N, utilizando-se como indicador solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Foi pipetado 10 mL de amostra e 10 mL de água destilada em um béquer e titulado a solução de hidróxido de sódio padronizada até o ponto de viragem (EBC, 2005).

O teor alcoólico foi determinado com uma amostra de 200 mL de cerveja previamente descarbonatada mais de 50 mL de água destilada foi transferida para um conjunto de destilação. O destilado foi recolhido em um erlenmeyer até alcançar aproximadamente 150 mL, este transferido para uma proveta e a graduação alcoólica das cervejas foi determinada com a utilização de um alcoômetro com leitura direta à 20 °C (EBC, 2005).

A turbidez foi quantificada conforme a metodologia descrita por Dale, Tran e Lyddiatt (1995) por espectrofotometria. Alíquotas de 3 mL foram coletadas na região superficial de cada uma das amostras, seguida da leitura da absorbância no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro (modelo ChromTech, Spectrophotometer modelo V 1200) previamente calibrado com água destilada.

A quantificação de proteínas pelo método de biureto foi realizada baseada na metodologia proposta por Gornall, Bardawill e David (1949). Foram adicionados em tubos de vidro 500 µL da amostra de cerveja, 3,5 mL de água destilada e 5 mL de reagente de biureto, agitou-se os tubos com auxílio de um vórtex de bancada e em seguida deixado os mesmos em repouso por 30 min. Logo após, leu-se na absorbância de 540 nm em espectrofotômetro digital da marca ChromTech, Spectrophotometer modelo V 1200, previamente calibrado com uma amostra em branco com o reagente de biureto. Os valores de proteína foram interpolados através da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrão de caseína ( $y = 0,0255x + 0,0016$ ;  $R^2=0,9976$ ) e expressos em gramasequivalente de proteína por litro de cerveja (g/L).

#### *2.4 Análise estatística*

Os dados obtidos atenderam os requisitos de normalidade e homogeneidade, dispensando transformação. Estes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com aplicação do teste F e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade com uso do Software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

### 3. Resultados e discussão

Os parâmetros avaliados para os três tratamentos testados apresentaram diferenças significativas para acidez total, pH, cor, turbidez e proteína. O tratamento com adição de enzima a base de *Aspergillus niger* apresentou as maiores médias em quatro destes, com exceção da cor que as maiores médias foram para o tratamento padrão sem adição de enzima, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1**–Análise dos parâmetros físico-químicos das cervejas de estilo APA para os tratamentos com enzima (E), padrão sem enzima (P) e comercial (C).

PARÂMETROS	TRATAMENTOS		
	E	P	C
Sólidos solúveis (brix)	5,483 ± 0,204 <sup>ns</sup>	5,517 ± 0,248 <sup>ns</sup>	5,683 ± 0,194 <sup>ns</sup>
Acidez Total (meq/L)	43,547 ± 1,224 <sup>a</sup>	40,511 ± 3,164 <sup>ab</sup>	38,824 ± 2,586 <sup>b</sup>
pH	4,213 ± 0,012 <sup>a</sup>	4,051 ± 0,020 <sup>b</sup>	3,902 ± 0,015 <sup>c</sup>
Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/L)	396,946 ± 105,680 <sup>ns</sup>	504,023 ± 19,814 <sup>ns</sup>	393,669 ± 102,8 <sup>ns</sup>
Teor alcoólico (% v/v)	4,633 ± 0,852 <sup>ns</sup>	4,583 ± 0,711 <sup>ns</sup>	5,383 ± 0,828 <sup>ns</sup>
Taninos (%)	0,092 ± 0,023 <sup>ns</sup>	0,087 ± 0,008 <sup>ns</sup>	0,0883 ± 0,008 <sup>ns</sup>
Cor (EBC)	32,333 ± 0,769 <sup>a</sup>	33,208 ± 2,046 <sup>a</sup>	14,708 ± 0,401 <sup>b</sup>
Flavonóides (mg QE/L)	44,456 ± 8,299 <sup>ns</sup>	40,686 ± 6,763 <sup>ns</sup>	25,989 ± 1,295 <sup>ns</sup>
Turbidez (NTU)	0,112 ± 0,024976 <sup>b</sup>	0,084 ± 0,008 <sup>b</sup>	0,237 ± 0,026 <sup>a</sup>
Proteínas (g/L)	4,379 ± 0,464 <sup>a</sup>	3,751 ± 0,047 <sup>b</sup>	1,294 ± 0,085 <sup>c</sup>

As letras diferentes na linha apontam diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e ns aponta que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros físico-químicos das cervejas. n=6

Fonte: produção do próprio autor, 2021.

No que diz respeito à acidez total o tratamento com enzima foi igual à média do padrão, porém diferente da cerveja comercial, valores que por sua vez se situam acima dos esperados para amostras de cerveja de 0,09 a 0,15% para cervejas do tipo APA (COMPTON, 1978).

O pH apresentou maiores valores para o tratamento com enzima (4,213 ± 0,012) que diferiu dos demais, porém todos estão dentro do limite da faixa de 3,8 a 4,7 encontrada na literatura (COMPTON, 1978). O menor valor de pH foi no tratamento comercial (3,902 ± 0,015), onde valores mais baixos de pH diminuem as chances de contaminação por microrganismos e retardam a autólise de leveduras (OLIVEIRA, 2015).

A turbidez que as cervejas apresentaram nos tratamentos com enzima e padrão não tiveram diferença estatística com as menores médias quando comparado ao tratamento comercial que teve a



maior média e diferiu dos demais tratamentos. Os valores que encontramos para turbidez são semelhantes aos encontrados por Oliveira (2016) para o mesmo estilo de cerveja e metodologia (variando de  $0,051 \pm 0,001$  a  $0,083 \pm 0,001$ ), com excessão do tratamento comercial que foi mais elevado.

Segundo Lopez e Edens (2005) quando se produz cervejas com adição de enzimas a base de *Aspergillus niger* estas deveriam apresentar valores menores de turbidez que os de cervejas sem enzimas, uma vez que estes organismos promovem o controle da formação de neblina/turbidez, devido ao fato que a enzima hidrolisa as prolinas, tornando estas incapazes de se ligar aos polifenóis e criar turbidez. Entretanto, por enzimas serem proteínas, estas contabilizam um aumento no valor total protéico das cervejas que são tratadas por estas e não passam por processo de filtração posterior a sua adição.

A propriedade referente à cor, o padrão apresentou maior média, mas não diferiu do tratamento com enzima, porém diferiram da cerveja comercial, esta por sua vez apresentou menores médias, estes apresentados na Tabela 1. No que diz respeito à cor somente o tratamento comercial ( $14,708 \pm 0,401$ ) apresentou valores dentro dos limites, enquanto os tratamentos com enzima ( $32,333 \pm 0,769$ ) e padrão ( $33,208 \pm 2,046$ ) tiveram valores superiores estimados para cervejas APA que variam de 9 – 19 EBC (DIETLER, 2006; MORADO, 2017; ALWORTH, 2015; HUGHES, 2001; HARRISON; ALBANESE, 2009; SPARROW, 2005). A cor tem relação direta com os tipos de malte utilizados na produção da cerveja.

As quantidades de proteínas presentes nas cervejas foram maiores para o tratamento com enzima que diferiu das demais, seguido das médias obtidas no tratamento padrão e com menor média a cerveja comercial. Segundo Anderson et al. (2019) a proteína das cervejas se origina do malte que contém de 10 a 12% de proteína. Um terço dessa proteína é extraído durante a mosturação e uma parcela desta é removida durante o processo de fervura, deixando a cerveja média de 0,2 a 0,6 g/100 mL de material derivado de proteína, principalmente na forma de peptídeos e polipeptídeos (CORTACERO-RAMÍREZ et al. 2003), assim os valores encontrados estão aceitáveis ao citados pelos autores. O tratamento comercial apresentou valores abaixo, enquanto os tratamentos com enzima e padrão valores acima dos que Oliveira (2016) encontrou para o mesmo método e estilo de cerveja (estes variaram de  $1,77 \pm 0,03$  a  $1,98 \pm 0,03$ ). Lembrando que os valores de proteína sofrem variações de acordo com o processo de preparação e o estilo da cerveja (GORINSTEIN et al. 1999).

Além do valor nutricional, os teores de proteínas são muito importantes no fornecimento de aminoácidos que auxiliam no crescimento da levedura e têm substâncias nitrogenadas que desenvolvem um papel importante na formação da espuma (OLIVEIRA, 2015), mas podem ter

efeitos indesejados uma vez que teores elevados de proteína podem influenciar na turbidez, efeito esse demonstrado neste estudo, onde o tratamento com as maiores médias de turbidez e cor (com enzima) foi o que apresentou os maiores teores de proteína. Zupardo (2010) destaca que o excesso de proteínas é indesejado uma vez que dificulta as etapas de filtração, influenciam diretamente na turbidez da cerveja e diminuem o tempo de prateleira deste produto.

Acredita-se que os valores encontrados para proteína tem relação com o método em que se quantificou a mesma, utilizando como fonte proteína a caseína (Gornall, Bardawill e David (1949)), uma vez que a enzima de *Aspergillus niger* tem como uma das suas funções a estabilização da cerveja e complexa as partículas de glúten. Esta complexação aliada a fato de não ter realizado a filtração fez com que as partículas de nitrogênio complexadas estivessem presente nas amostras, assim fazendo com o que tratamento com enzima (E), apresentasse médias maiores os demais tratamentos estudados.

Brix, compostos fenólicos totais, teor alcoólico, taninos e flavonóides não apresentaram diferenças estatísticas significativas para os tratamentos avaliados, conforme Tabela 1.

#### **4. Conclusão**

Existem diferenças nos parâmetros físico-químicos de cervejas produzidas com a enzima Clarity Ferm, sem enzimas e comercial, mas ainda temos um longo caminho a trilhar nesta linha de pesquisa, devido à escassez de trabalhos que tenham os parâmetros avaliados neste experimento e com as mesmas condições. No que diz respeito ao glúten precisamos de metodologias padronizadas, mais fáceis e baratas para que possamos ter mais trabalhos neste âmbito, assim alcançando discussões mais robustas.

A realização de estudos que usam enzimas produzidas por fungos e bactérias para quebrar proteínas foi idealizado em 2002, o que ainda torna esses estudos recentes, elucidando o fato que precisamos realizar mais trabalhos que tratam do assunto.

#### **5. Bibliografia**

AHN, J.; GRÜN; I. U.; MUSTAPHA, A. **Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef.** Food Microbiology, London, v. 24, n. 1, p. 7-14, 2007. <DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.006>>

ALWORTH, J. The Beer Bible, 1a.ed, Workman Publishing Co.: New York, 2015.

ANDERSON, H. E.; SANTOS, I. C., HILDENBRAND, Z. L., & SCHUG, K. A.. **A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control.**



Analytica Chimica Acta, 1085, p.–20. 2019 <DOI:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.061>>

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2015. **Dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares.** RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 26, DE 2 DE JULHO DE 2015. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-26-de-2-de-julho-de-2015.pdf/view>>, Acesso em: 02/03/2021.

ARAÚJO, H. M. C.; ARAÚJO, W. M. C.; BOTELHO, R. B. A.; ZANDONADI, R. P. **Doença Celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida.** Revista de Nutrição, vol. 23, n. 3, maio/jun.,467-474. 2010.

BRASIL. 2003.**Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. LEI Nº 10.674, DE 16 DE MAIO DE 2003.**Disponível em <[planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/2003/110.674.htm](http://planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/110.674.htm)>, Acessado em: 02/03/2021

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário da cerveja: 2019** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/SDA, 2020. 16 p., il. ISBN : 978-65-86803-00-6. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/anuario-da-cerveja-2019>>, Acessado em: 30/01/2021.

BRASIL. **Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria: INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 65, DE 10 DE DEZEMBRO DE 2019.** Disponível em<<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>>, Acessado em: 20/02/2021.

Commission, CODEX ALIMENTARIUS.Report of the 31th Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary.2008. Disponível em: <[http://www.fao.org/input/download/report/732/nf31\\_01e.pdf](http://www.fao.org/input/download/report/732/nf31_01e.pdf)>, Acesso em: 05/03/2021.

COMPTON, J. Beer quality and taste methodology.In: BRODERICK, H. M. (Ed.). **The practical brewer: a manual for the brewing industry.** 2 ed. Madison: MBAA. Cap. 15, p. 288-308, 1978. CORTACERO-RAMÍREZ, S.; HERN AINZ-BERMÚDEZ DE CASTRO. M.; SEGURA-CARRETERO, A.; CRUCES-BLANCO, C.; FERNANDEZ-GUTI ERREZ, A.**Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods,** Trends Anal. Chem. 22, p.440-455.2003.

CRAIG e VAN ROON.**Brew Distill.** The Brewers Journal.Int 3: 35-38, 2007.

DALE, C. J.; TRAN, H. T. N; LYDDIATT, A. **Studies on the mechanism of action ofcopper fining agents (k carrageenan).**Copyright - Journal of the Institute of Brewing.Vol. 102.pp. 285-289, Great Britain, 1995.

DI GHIONNO,L.; MARCONI, O.; SILEONI, V.; DE FRANCESCO, G.; PERRETTI, G. **Brewing with prolyl endopeptidase from Aspergillus niger: The impact of enzymatic treatment on**

**gluten levels, quality attributes and sensory profile.** International Journal of Food Science and Technology, 52, p. 1367-1374, 2017.<DOI:<https://doi.org/10.1111/ijfs.13375>>

DIETLER, M. **Alcohol: Anthropological/ Archaeological Perspectives.**Annual Review of Anthropology, 35, 229.2006.

EBC - EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica – EBC.** 5th ed. Zurique: Brauerei – und Getränke – Rundschau, 2005.

GORINSTEIN, S.; ZEMSER, M.; VARGAS-ALBORES, F.; OCHOA, J.-L.; PAREDES-LOPEZ, O.; SCHELER, CH.; SALNIKOW, J.; MARTIN-BELLOSO, O.; TRAKHTENBERG, S. **Proteins and amino acids in beers, their contents and relationships with other analytical data,** Food Chem. v.67 p.71e78. 1999.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J. & DAVID, M.M. **Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.** *J. biol. Chem.*, **177**:751-66, 1949.

HARRISON, M. A.; ALBANESE, J. B. Em Reference Module in Life Sciences; Schaechter, M., eds.; 3a. ed., Academic Press: London, 2009.

HUGHES, E. D. B. P. S. **Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects,** The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2001.

LIMA, L. A.; FERNANDES, T. L.; SILVA, M.L.; LUIZA, XAVIER & SILVA, L. X.; TENÓRIO, L. X. S.; EVARISTO, R. B. W.; MARTIN, A. R.; GHESTI, G. F. **Sinopse do cenário cervejeiro: o advento da produção e o mercado na região centro oeste.** Cadernos de Prospecção. Salvador v.10, n.4, p.650-664.2017 <D.O.I.:<http://dx.doi.org/10.9771/cp.v10i4.23041>>

LOPEZ, M; EDENS, L. **Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from Aspergillus niger.**Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 7944–7949.2005.

LOWENTHAL, J. **Uber die Bestimmung des Gerbstoffs.** Z. Anal. Chem , 16 p. 3- 48. 1877.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério cria câmara setorial para a cadeia produtiva da cerveja. 2019. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/ministerio-cria-camara-setorial-para-a-cadeia-produtiva-da-cerveja>>, Acessado em: 10/03/2021.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Total de cervejarias registradas no Mapa cresceu 36% em 2019 e chegou a 1.209. 2020. Disponível em<<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/total-de-cervejarias-registradas-no-mapa-cresceu-36-em-2019-e-chegou-a-1.209>>, Acessado em: 10/03/2021.

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O.G.; **Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity.** *Food Chem* 91: 571-577. 2005.

MORADO, R.**Larousse da Cerveja**, 1a. ed, Alaúde Editorial: São Paulo, 2017.

OLIVEIRA, M. D. de. **Aplicação de amido modificado no processo de clarificação de cerveja artesanal.** Dissertação de Mestrado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ (PPGTA). 75p. 2015. Disponível em:

<[http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2165/1/MD\\_PPGTA\\_M\\_Oliveira\\_Mariana%20D%C3%A2maris%20de\\_2015.pdf](http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2165/1/MD_PPGTA_M_Oliveira_Mariana%20D%C3%A2maris%20de_2015.pdf)>, Acesso em: 25/01/2021.

OLIVEIRA, T de. **Avaliação do comportamento de amidos de batata oxidados e utilizados como clarificantes na produção de cerveja artesanal.** 71 f. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão. 2016. Disponível em:

<[http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/6008/1/CM\\_COEAL\\_2016\\_2\\_15.pdf](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/6008/1/CM_COEAL_2016_2_15.pdf)> Acesso em: 20/-4/2021.

SCHERF, K.A. **Gluten-free diet – health trend or vital necessity?**, Cereal Technol. v2, p.64-73. 2015.

SCHERF, K.A., KOEHLER P., WIESER H. **Gluten and wheat sensitivities – An overview**, J. Cereal Sci. V.67, p.2-11. 2016.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent.**American Journal of Enology and Viticulture, v.16, p.144-158, 1965.

SPARROW, J. **Wild brews: beer beyond the influence of brewer's yeast**, Brewers Publications: Boulder, 2005.

STATSOFT, Inc., **STATISTICA** (Data analysis software system). Version 7. Disponível em: [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com), 2004.

STEPNIAK et al. Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol 291: p.621-629, 2006.

van ZANDYCKE, S. (Tradução por FERNANDES, M.). **Não contem glúten: Uma necessidade para as pessoas intolerantes ao glúten, esse produto,torna-se mais uma opção para os fabricantes de cerveja.** Engarrafador moderno. 2014.

Disponível em:<[WATSON, H.G.; VANDERPUTTEN, D.; VAN LANDSCHOOT, A.; DECLOEDT, A. L. \*\*Applicability of different brewhouse technologies and gluten-minimization treatments for the production of gluten-free \(barley\) malt beers: Pilot-to industrial-scale.\*\* Journal of Food Engineering, v.245, p.33-42, 2019.< DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2018.09.015>.](https://engarrafadormoderno.com.br/processos/nao-contemgluten#:~:text=Medi%C3%A7%C3%A3o%20de%20gl%C3%BAten%20na%20cerveja&text=A%20ingest%C3%A3o%20de%20gl%C3%BAten%20m%C3%A1xima,(Codex%20Alimentarius%20Commission%202008)></a>>, Acesso em: 25/03/2021.</p></div><div data-bbox=)

WIESER, H., KOEHLER, P., KONITER K. **Celiac Disease – A Complex Disorder, in Disease and Gluten - Multidisciplinary Challenges and Opportunities.**(Koehler, P.

Wieser, H., Koniter K. Eds.) 1st ed., p. 97- 148, Academic Press Elsevier, London, Waltham, San Diego, 2014.

ZUPPARDO, B. **Uso da goma Oenogum para a estabilização coloidal e de espuma em cerveja.** Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, São Paulo, 2010.