

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

CURSO DE BIOMEDICINA

JEFTÉ MACÁRIO LOURENÇO

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NOS PROCESSOS INDUSTRIAIS PARA
FABRICAÇÃO DE CERVEJAS**

CRICIÚMA

2021

JEFTÉ MACÁRIO LOURENÇO

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NOS PROCESSOS INDUSTRIAIS PARA
FABRICAÇÃO DE CERVEJAS**

Projeto apresentado como parte de avaliação da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, no curso de Biomedicina da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof. Esp. Antônio Cleber Gonçalves
Júnior

**CRICIÚMA
2021**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha mãe, que nesse momento difícil de sua vida, continuou me dando apoio e se mantendo forte.

Agradeço ao irmão Miguel Macário, familiar mais próximo que sempre me deu suporte nesta jornada acadêmica. A minha namorada, que foi importante ao corrigir minha postura em relação ao trabalho e me manteve na linha para não perder o foco.

Ao meu chefe e mentor, Dr. Rubison Olivo, que compreendeu e flexibilizou a jornada de trabalho para dedicação a esse momento e disponibilizou livros para auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos da faculdade, em especial André Cascavel, Lara Loss e Pietro Zanatta, que fizeram do curso um lugar melhor com suas presenças, salvaram meu semestre e persistiram em eu ser capaz de escrever e finalizar a obra.

Agradeço aos professores e funcionários do curso de Biomedicina, em especial meu orientador Antônio Cleber e a excelente equipe docente.

E por fim, a todos que participaram de forma direta ou indireta nessa jornada e fizeram da minha vida algo melhor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de produção de cerveja.	14
Figura 2 - Representação esquemática da ação hidrolítica de enzimas degradantes de β -glucana.	17
Figura 3 - Atuação da enzima Amilase.	19
Figura 4 - Formação de diacetil na cerveja e ação da ALDC.	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Enzimas cervejeiras e seus efeitos.	15
--	----

RESUMO

A fabricação de cervejas se caracteriza como um dos processos de produção de alimentos mais antigos da humanidade. Os primeiros relatos da produção da bebida remontam entre 6000 a 8000 anos atrás, sendo feitas por civilizações antigas que habitavam a região da Mesopotâmia. Atualmente, a indústria da cerveja representa posição de destaque na economia mundial figurando como a terceira na escala de importância em volume de consumo de bebidas no mundo. Para o processo produtivo ter competitividade e tornar o produto mais acessível e com menores desperdícios, o emprego de enzimas se mostra bastante atrativo na etapa de fabricação da bebida, oferecendo amplo benefício ao processo e consequentemente ao produto. Em geral, os processos enzimáticos são tecnologicamente mais desenvolvidos e conferem maior valor agregado aos produtos. Muitos destes produtos têm propostas de ação bastante específicas o que faz seu uso muito importante em situações de alta complexidade bioquímica dos processos que elas estão envolvidas. Essa revisão possui o objetivo de abordar algumas enzimas utilizadas na indústria com a descrição de seu mecanismo de ação. Dentre as enzimas abordadas, Beta-Glucanase, Amilases, Proteases e Alpha Acetolactate Decarboxylase (ALDC), por apresentarem seu uso relacionado a considerável resultado para a indústria devido sua alta funcionalidade. Discutiu-se também os caracteres das enzimas, sendo endógenos ou comerciais, o que influencia diretamente na fabricação da cerveja e defeitos sensoriais gerados quando não empregados, gerando uma análise crítica sobre os padrões exigidos pelo mercado para o atendimento da alta demanda mundial pelo produto.

Palavras-chave: Cerveja. Enzimas. Processos cervejeiros. Indústria Cervejeira.

ABSTRACT

Brewing is characterized as one of the oldest food production processes in humanity. The first reports of the production of the drink go back between 6000 to 8000 years ago, being made by ancient civilizations that inhabited the Mesopotamian region. Currently, the beer industry represents a prominent position in the world economy, ranking third in the scale of importance in volume of beverage consumption in the world. For the production process to be competitive and make the product more accessible and with less waste, the use of enzymes is very attractive in the beverage manufacturing stage, offering a broad benefit to the process and consequently to the product. In general, enzymatic processes are more technologically developed and provide greater added value to products. Many of these products have very specific action proposals, which makes their use very important in situations of high biochemical complexity of the processes they are involved in. This review aims to address some enzymes used in industry with the description of their mechanism of action in production processes. Among the addressed enzymes, Beta-Glucanase, Amylases, Proteases and Alpha Acetolactate Decarboxylase (ALDC), since their use is related to considerable result for the industry due to its high functionality. The characteristics of the enzymes, whether endogenous or commercial, which directly influence the brewing of beer and sensory defects generated when not used, were also discussed, generating a critical analysis of the standards required by the market to meet the high worldwide demand for the product.

Palavras-chave: Beer. Enzymes. Brewing processes. Beer Industry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. OBJETIVO GERAL.....	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. METODOLOGIA	11
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
4.1 ENZIMAS E SUAS CARACTERÍSTICAS	12
4.2. PROCESSOS NA FABRICAÇÃO DE CERVEJAS	12
4.3. ENZIMAS UTILIZADAS NO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE CERVEJA.....	14
4.2.1. Beta-Glucanase	16
4.2.2. Amilase.....	18
4.2.3. Proteases	20
4.2.4. Alpha Acetolactate Decarboxylase	21
5. CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

A Instrução Normativa nº 65 de 10 de Dezembro de 2019, define a cerveja como uma bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, e “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” (BRASIL, 2019). A Instrução Normativa também aborda os padrões para fiscalização utilizados pelos órgãos responsáveis e diversas regulamentações sobre possíveis ingredientes ou aditivos utilizados no processo de fabricação.

Segundo Hornsey (2003), a cerveja foi criada entre 6000 a 8000 anos atrás e é considerada uma das primeiras bebidas alcoólicas produzidas pelo homem. Os processos de fabricação da cerveja foram descobertos de forma empírica e costumavam utilizar uma mistura de frutas e grãos como base, sendo próximas das bebidas alcólicas que conhecemos hoje, como o vinho, por exemplo.

Evidências mostram que os caminhos percorridos pelas técnicas de fabricação cervejeira começaram em 3500 a.C na Mesopotâmia. Após isso, a bebida tornou-se popular em outras áreas do Oriente Médio, principalmente em Israel e Egito Antigo, onde os registros indicam que a fabricação de cerveja já era uma atividade doméstica importante para a época. Estima-se que os egípcios já dominavam as técnicas de fermentação, compreendendo a produção de cervejas e pães (HORNSEY 2016). A adição de outros ingredientes como o lúpulo na fabricação de cerveja, se tornou uma prática comum a partir do século XVI, devido em grande parte à sua contribuição para o sabor e a estabilidade biológica da cerveja. A fervura do preparado de cereais e a adição do lúpulo tornava a bebida mais segura para o consumo humano do que a própria água, visto que na época a água disponível não passava por nenhum processo de purificação e não existiam sistemas de tratamento de água e esgoto (HARRISON, ALBANES, 2017).

O *Humulus lupulus*, nome científico do lúpulo, é uma planta trepadeira dioica onde é empregada a inflorescência feminina no processo de fervura na produção da cerveja de onde visam ser extraído resinas e óleos essenciais para conferir amargor e aroma à bebida (DURELLO *et al*, 2019).

De acordo com Nelson e Cox (2019), as enzimas são definidas como catalisadores biológicos específicos, que permitem uma aceleração (catálise) no metabolismo da reação e são principalmente proteínas. Sua participação nas reações não afeta o equilíbrio da reação catalisada (NELSON e COX, 2019).

A demanda por alimentos preparados aumentou acima do crescimento populacional por conta da industrialização e mudanças comportamentais no consumo. Os processos produtivos evoluíram de forma a se tornarem mais eficientes para atender a essa crescente demanda a ponto de acelerar processos e diminuir a quantidade de desperdícios nas indústrias. O emprego de enzimas trabalha justamente neste caminho aonde auxiliam diversos aspectos tecnológicos acelerando e otimizando processos produtivos trazendo redução de desperdícios e consequentemente redução de custos (WHITEHURST e OORT, 2009).

Pode ser observada a utilização de enzimas nos mais diversos processos produtivos e na indústria de alimentos é possível citar como exemplo a produção de queijos, vinhos, sucos, derivados cárneos e cervejas (WONG DW, 1995).

Em 2018 aproximadamente 190 bilhões de litros de cerveja foram produzidos no mundo. A China lidera o *ranking* dos países que mais produzem cerveja tendo mais de 20% do *Production Share* (fração da produção) mundial seguida dos Estados Unidos, Brasil, México e Alemanha, respectivamente (KIRIN, 2019).

Entre os anos de 1998 a 2019, a produção de cerveja no mundo teve um aumento de 60 bilhões de litros (CONWAY, 2020). Esse aumento gradativo na produção está relacionado ao fato de que a cerveja é a terceira bebida mais consumida no mundo, ficando atrás apenas da água e do chá (ALWORTH, 2015; HORNSEY, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral abordar o processo de fabricação de cerveja com a aplicação de diferentes enzimas e seus mecanismos de ação, relatando as vantagens do emprego de enzimas em diferentes etapas de fabricação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Apontar quatro enzimas empregadas na indústria cervejeira;
- Descrever aspectos tecnológicos de cada enzima apontada;
- Relacionar a aplicação das enzimas com o ganho industrial.

3. METODOLOGIA

A abordagem se dá na forma de revisão científica a respeito da utilização de enzimas nos processos cervejeiros baseada em dados da literatura e pesquisa com fornecedores destes insumos. A pesquisa consistiu em utilizar diversos bancos de dados para consulta, sendo a maioria online como *Science Direct* (www.sciencedirect.com) e *Google Academic/Scholar* (<https://scholar.google.com/>). Também foram consultados livros acadêmicos, repositórios científicos e fornecedores/produtores destes ingredientes. As palavras-chave utilizadas foram: “beer”, “beer consumption”, “application in brewing”, “brewing”, “beer and enzymes” e “alcohol consumption”, alternando a ordem do conjunto de palavras-chave. Os artigos escolhidos foram preferencialmente de língua inglesa e com disponibilidade online obrigatória. Para refinar a pesquisa, foram realizados processos de verificação dos resumos e metodologias dos artigos selecionados, buscando encontrar apenas material relacionado ao tema da pesquisa nos últimos 20 anos. Os critérios de exclusão foram para os trabalhos que não apresentassem resultados com ganhos industriais e estudos sobre microrganismos produtores de enzimas e não sobre a enzima em si.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 ENZIMAS E SUAS CARACTERÍSTICAS

Enzimas são materiais bioquímicos vitais que comprovadamente não são apenas críticos para organismos vivos, mas também no campo da ciência e tecnologia de alimentos. As enzimas participam de muitas reações importantes no corpo humano, como regulação celular, geração de movimento, digestão, absorção e metabolismo (WHITEHURST e OORT, 2009). As enzimas são principalmente de estrutura terciária e sua estrutura primária é composta por até milhares de aminoácidos, que estão ligados entre si por meio de ligações peptídicas em uma cadeia linear (NELSON e COX, 2019).

Toda enzima serve exclusivamente para uma determinada reação e seu funcionamento eficaz só ocorre se a sua estrutura tridimensional estiver intacta (terciária e quaternária). Possuem uma região chamada de sítio ativo, no qual será ligado um substrato e ocorrerá a ativação dessa enzima (NELSON e COX, 2019).

Sua funcionalidade atua diretamente nas variações de entropia das reações, evitando que os substratos necessários para que a reação ocorra de forma correta, se liguem de forma aleatória, aumentando a eficiência da reação. No momento em que a enzima começa a atuar, a energia de ativação diminui e o equilíbrio se mantém. A atividade enzimática é controlada normalmente pela própria célula devido a codificação da proteína e pode ser desativada por meios externos, quando se altera os parâmetros de funcionalidade da enzima (NELSON e COX, 2019).

No final das reações, as enzimas retornam ao seu estado padrão, se desligando do substrato e disponível para uma nova reação. Por ser da classe das proteínas, a desnaturação pode ocorrer devido a uma exposição em altas temperaturas ou variações extremas de pH, degradando suas ligações e consequentemente, inibindo suas funções. As desnaturações são causadas por uma interferência no grau de ionização das moléculas, gerando mudanças nas estruturas proteicas das enzimas (NELSON e COX, 2019).

4.2. PROCESSOS NA FABRICAÇÃO DE CERVEJAS

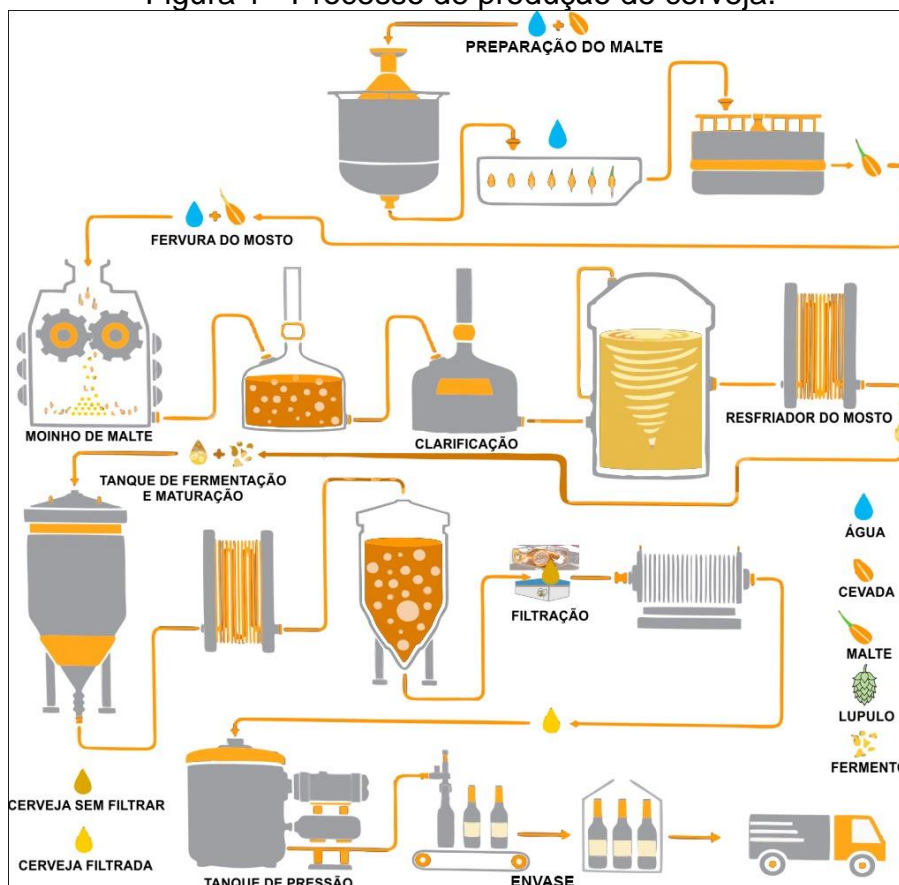
Didaticamente, o processo de produção de cerveja pode ser descrito em 8 etapas essenciais, conforme Figura 1: malteação, moagem, mostura, fervura, fermentação, maturação, filtração e envase (HUI, 2005; NETO *et al*, 2020).

A primeira parte do processo é a malteação onde os grãos, normalmente a cevada, passam por um processo de germinação controlada com interrupção da germinação por secagem para se tornarem malte daquele cereal. Este processo ocorre em unidades separadas do processo de produção de cerveja. O intuito desta etapa é a disponibilização das enzimas embrionárias da semente para serem utilizadas na conversão de carboidratos complexos em maltose e dextrina na etapa posterior chamada de mostura. A malteação é composta por três processos principais sequenciais que são, maceração (14-18 °C), germinação (16-20 °C), e secagem (50-110 °C) utilizando água, calor e a ação das primeiras enzimas, α -amilases e proteases presentes no próprio grão (HUI, 2005; BAMFORTH, 2017; MORADO, 2017).

O processo produtivo de cerveja propriamente dito inicia-se com a moagem do malte. O malte moído é infundido em água aquecida para a maceração do grão e formação do pré-mosto. O mosto é resultante do processo de filtração utilizando a própria casca do malte como agente filtrante e separado para a etapa de fervura (HUI, 2005; BAMFORTH, 2017).

A fervura (100 °C a nível do mar) é o momento em que acontece a adição do lúpulo, além de visar a concentração do mosto e a pasteurização do mesmo. Também é na fervura que os componentes insolúveis do lúpulo, que conferem amargor à bebida, são isomerizados ao longo deste período, se tornando solúveis. O tempo para essa reação finalizar são 60 minutos. Por fim, ainda como objetivo da etapa de fervura, proteínas de alto peso molecular são desnaturadas e precipitam conferindo maior estabilidade coloidal à bebida reduzindo problemas com turbidez a frio. Após a fervura, o mosto é recirculado e resfriado, reduzindo a temperatura do mosto entre 6 e 25 °C em trocadores de calor ao mesmo tempo em que é bombeado para o fermentador. O mosto já resfriado e no tanque de fermentação, ocorre o inóculo de levedura cervejeira e tem-se o início da etapa de fermentação dos açúcares transformando-os em substâncias mais estáveis como o etanol e gás carbônico (HUI, 2005; BAMFORTH, 2017; PALMER, 2017).

Figura 1 - Processo de produção de cerveja.



Fonte: Adaptado conforme Capim Branco Cervejaria (2021).

Após a fermentação a atividade das leveduras reduz com a escassez dos açúcares (substrato) e então a temperatura dos tanques contendo o mosto fermentado é reduzida até atingir 0 °C, auxiliando na precipitação das leveduras e de partículas que possam interferir no sabor e aroma da cerveja (HUI, 2005; BAMFORTH, 2017). Posteriormente a cerveja, dependendo do processo e estilo, pode passar por uma etapa de filtração, para remover ainda mais partículas e leveduras que possam ter restado (HORNSEY, 2003; BAMFORTH, 2017).

A finalização do processo de produção de cerveja é o momento de envase. Nesta etapa a bebida pode ser embalada em barris, garrafas ou latas. Essa é uma operação tida como crítica no processo tendo a redução do contato com o oxigênio de extrema importância para evitar a deterioração do produto (GOMAA, 2018).

4.3. ENZIMAS UTILIZADAS NO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE CERVEJA

De acordo com Sindhu (2021), a tecnologia de enzimas no processamento de alimentos é uma arte milenar mesmo que de forma inconsciente. Dentre as

vantagens obtidas com o uso de enzimas no processamento de alimentos está a conversão de matérias-primas em ingredientes com características desejáveis e ou com transformações necessárias para processamentos posteriores. Sua ação sobre moléculas complexas convertendo-as em moléculas mais simples e estáveis, formam a base de suas aplicações no processamento de alimentos (SINDHU, 2021).

A indústria cervejeira se beneficia de algumas enzimas com contribuições no processo em diferentes etapas. É possível dividi-las em 4 classes de acordo com a etapa do processo produtivo que são empregadas: germinação, mosturação, fermentação e clarificação ou, remoção da turbidez (BAMFORTH, 2009). Serão abordadas quatro enzimas com destaque na fabricação de cervejas que são: Beta-glucanase, Amilases, Proteases e *Alpha Acetolactate Decarboxylase* (ALDC).

A Tabela 1 esquematiza as enzimas abordadas no trabalho com suas propriedades (CHOI *et al*, 2015; MATHIAS *et al*, 2017; BRASIL *et al*, 2019; VIADER *et al*, 2021).

Tabela 1- Enzimas cervejeiras e seus efeitos.

Enzima	Processo	Função	Ganho Industrial
Beta-Glucanase	Malteação	Aceleração da malteação e clarificação da cerveja	Redução no tempo de processo na malteação em 30%
Amilases	Malteação e Mosturação	Aceleração da Mosturação	Redução no tempo de Mosturação em 20 minutos (27%)
Protease	Malteação	Aprimoramento da Mosturação e da Fermentação	Aumento do extrato, nitrogênio e aminoácidos no mosto em até 26%
ALDC	Fermentação	Redução no tempo de Fermentação	Redução de 2 dias do processo e 25% de Diacetil

Fonte: Brasil *et al.*, 2019; Viader *et al.*, 2021; Mathias *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2015.

Atualmente, o caráter precursor das enzimas pode ser endógeno, ou seja, da própria matéria prima ou exógeno, ou seja, adicionada ao longo do processamento (HUI, 2005; OLSEN, 2008; BAMFORTH, 2009). A utilização dessas enzimas de forma exógena, normalmente são necessárias quando a própria matéria prima não possui carga enzimática para a realização do processo acarretando em possível redução de

rendimento ou mesmo não atingindo padrões de qualidade pré estabelecidos (HUI, 2005; OLSEN, 2008).

Entretanto, é importante citar que a adequação processual de cada etapa tem o intuito de evitar *off-flavors* ao produto final, pois isso pode acarretar em experiências negativas ao consumidor (NETO *et al*, 2020). O termo *off-flavors* se refere a sabores ou odores indesejados e diferentes do padrão apresentado normalmente ao produto final. Quando ocorrem, podem gerar custos maiores à produção gerando prejuízos e depreciação do produto (COSTA, 2019).

4.2.1. Beta-Glucanase

A Beta-Glucanase é uma das enzimas atuantes nos processos de malteação e mosturação (BAMFORTH 2009). Dentro dos grupos de enzimas, as celulases, responsáveis pela degradação da celulose, são as primeiras a atuarem nos grânulos de amido pelo mecanismo de gelatinização, consumindo a camada externa dos grãos e, junto d'água quente, permite uma melhor abertura facilitando a entrada de outras enzimas hidrolisantes no amido interno (NELSON e COX, 2019; OLSEN, 2008).

A Beta-Glucanase normalmente atua hidrolisando as ligações 1-3 Beta-glicosídicas, que estão situadas entre as moléculas de glicose e polissacarídeos conforme representado na Figura 2 (MEGAZYME, 2021). No processo de fabricação cervejeira, essa reação é positiva pois facilita o trabalho de outras enzimas ao abrandar os grãos facilitando o acesso intramolecular.

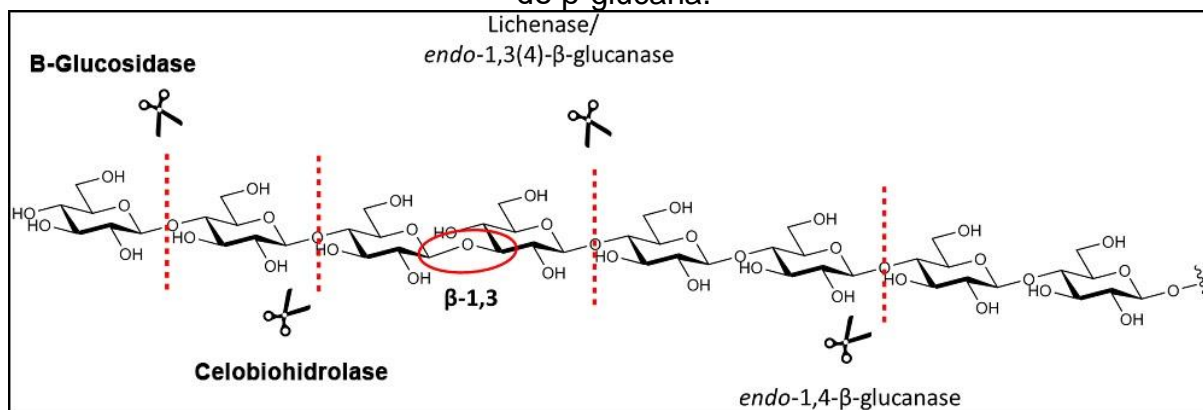
Esta enzima é encontrada de forma endógena na própria cevada e recebe o nome de Endo-beta-1,3-glucanase. Pode-se encontrar sua versão comercial oriunda de microrganismos a qual é empregada normalmente para produtores de cervejas *light*, as quais necessitam de um menor tempo de maturação e redução da turbidez da cerveja, permitindo uma melhor textura e coloração (GOMAA, 2018).

Devido a existência de muitos tipos de cerveja, a turbidez pode ser desejável em algumas cervejas. Entretanto, a Beta-Glucanase comercial pode ser adicionada como uma enzima extra que clarifica a cerveja pois ela consegue hidrolisar algumas ligações de proteínas com polifenóis e amidos que são substâncias precursoras da turbidez. A utilização ou não da enzima nesse quesito extra, fica a critério do cervejeiro (BAMFORTH, 2017).

Segundo Brasil *et al* (2019), notou-se que é possível acelerar o processo de malteação utilizando β -glucanase comercial. O tempo de redução varia de acordo com a quantidade utilizada, e a enzima atua acelerando o processo de germinação dos grãos. Normalmente a indústria leva 96 horas para a realização do processo germinativo enquanto com o uso da β -glucanase este tempo é reduzido para 64 horas podendo reduzir até 32 horas, cerca de 33% de otimização. Como todo processo pode variar de empresa para empresa, uma análise de quanto utilizar deve ser feita pelos cervejeiros para garantir um produto final de boa aceitação pelo consumidor (BRASIL *et al*, 2019).

Conforme Ferreira (2014), a adição de 50 mg de β -glucanase para cada 1 kg de malte de cevada, reduz o tempo de germinação dos grãos de 96 para 64 horas, aproximadamente 33% do tempo total, sem alterar a qualidade final do produto, garantindo uma otimização desta etapa no processo (FERREIRA, 2014).

Figura 2 - Representação esquemática da ação hidrolítica de enzimas degradantes de β -glucana.



Fonte: Adaptado conforme Megazyme (2021).

Abordando as características de ação desta enzima, observa-se um valor de pH 6,0, além de temperatura funcional entre 45 °C a 50 °C, sendo sua desnaturação a 60 °C, valor comum dentre as enzimas hidrolisantes de paredes celulares que trabalham em média, na faixa mínima dos 45 °C (SAMMARTINO, 2015).

A recomendação de uso varia de 200 a 400 mL por tonelada de grãos (malte) utilizados na fabricação na etapa de malteação ou de 0,1 a 0,3 mL por hectolitro de cerveja nas etapas seguintes (LALLEMAND, 2021).

4.2.2. Amilase

As amilases são enzimas que quebram amidos como polissacarídeos e açúcares complexos, conforme figura 3 (NELSON e COX, 2019). Sua principal função é transformar esses polissacarídeos em açúcares menores como dextrinas, maltose e moléculas de glicose, oriundas do processo de malteação. Durante o processo de maceração a transformação de amidos em açúcares de menor peso molecular, as enzimas amiloíticas α e β desempenham a função de tornar o amido, em açúcares fermentáveis (OLSEN, 2008; BAMFORTH, 2017).

A α -amilase é uma enzima catalisadora de reações que atua nas macromoléculas de amido (amilose, cadeia linear de amido dos grãos) e a amilopectina (cadeia ramificada dos grãos) e nas suas degradações em açúcares menores. O processo bioquímico ocorre de forma em que a α -amilase quebra as ligações 1-4 α -glicosídicas internas, enquanto a β -amilase catalisa a hidrólise dos mesmos amidos, porém quebrando as ligações 1-4 α -glicosídicas externas (SAMMARTINO, 2015).

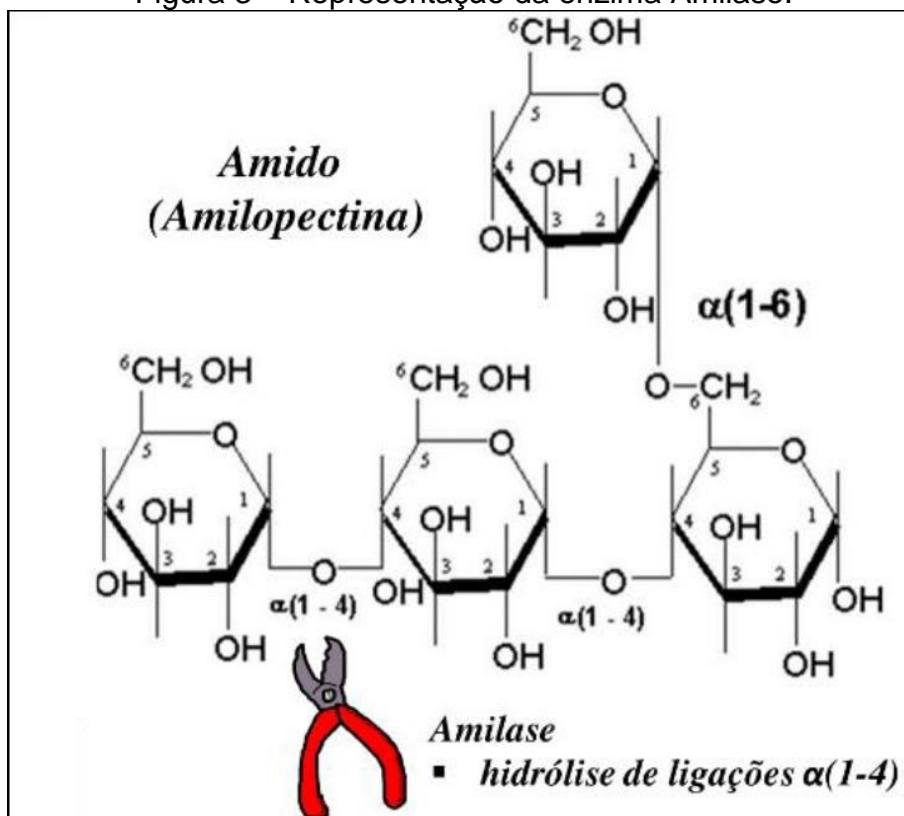
Conforme descrito acima, a β -glucanase no processo de malteação, hidrolisa as camadas externas dos grãos de amidos, liberando do seu interior as α e β amilases (enzimas endógenas). Assim que liberadas, seus processos de degradação e hidrólise dos amidos complexos começam resultando em açúcares simples para serem fermentados (GUERRA, 2009; SAMMARTINO, 2015).

As cervejas *lights* também se beneficiam dessa enzima, pois durante a fermentação, suas aplicações resultam em um melhor rendimento dos carboidratos fermentados, processo importante quando se trata de uma cerveja de baixa caloria. Essa categoria de cerveja necessita que os carboidratos de alto peso molecular (maior densidade) sejam degradados para reduzir o corpo no produto final e, consequentemente, as calorias (OLSEN, 2008).

O teor de álcool na bebida final é proporcional a concentração de açúcares no mosto, pois é possível adicionar mais amilase (comercial, oriundo dos *Bacillus* sp) (OLIVEIRA, 2016) e consequentemente ocorrerá mais fermentação pois a disponibilidade de açúcares fermentáveis aumentará devido a degradação dos açúcares não fermentáveis pela amilase. Baixos teores de açúcar, geram cervejas com baixo teor de álcool, respectivamente (GUERRA, 2009).

Viader *et al* (2021) estudou as alterações na temperatura durante o processo comparadas com a adição de α e β amilases. A medição dessas enzimas, se feita de forma correta, pode atingir uma redução de tempo no processo de mosturação em até 20 minutos, equivalente a 27% do tempo total, o que otimiza tempo e custo para a indústria (VIADER *et al*, 2021).

Figura 3 – Representação da enzima Amilase.



Fonte: Adaptado conforme Aula prática bioquímica (2019).

Sobre as características dos dois tipos de amilases, seus valores de pH e temperatura para funcionalidade variam, sendo a α -amilase com pH médio de 5,2 e temperatura de 73 °C, considerada alta, enquanto que a β -amilase trabalha com o pH de 5,5 e temperatura de 62 °C (SAMMARTINO, 2015). Devido a essas enzimas atuarem juntas, é difícil manter uma temperatura ideal para ambas trabalharem com a máxima eficiência. Os valores de temperatura afetam a proporção de açúcar fermentado e álcool no produto final (SAMMARTINO, 2015).

Em relação às suas formas comerciais, alguns fabricantes recomendam o uso de 1 a 2 quilos de enzima α -amilase por tonelada de cevada para obter um bom resultado com o amido (SAMMARTINO, 2015). A sua outra forma, β -amilase, tem uma

maior recomendação de uso devido aos seus mecanismos de ação no processo de sacarificação, ou quebra dos açúcares maiores em menores (SAMMARTINO, 2015).

4.2.3. Proteases

As proteases são enzimas catalisadoras da hidrólise de ligações peptídicas entre as proteínas. Sua utilização fornece dois benefícios ao processo, sendo a clarificação da cerveja por degradação das proteínas e como facilitadora do processo de malteação (HUI, 2005).

Por degradar as ligações entre proteínas, o grau de solubilidade diminui, o que acaba reduzindo a viscosidade do pré mosto (HUI, 2005), função essa que atinge diretamente a qualidade do produto. Ademais, o crescimento das leveduras é estimulado pois as proteases atuam na disponibilidade de nitrogênio com aminas livres, necessárias para o crescimento das leveduras (HUI, 2005; OLSEN, 2008; LEI, 2013).

Dentre suas funções, também está o amolecimento dos grãos na fase de mosturação, processo em que atua fazendo hidrólise da parede celular, que leva a uma exposição dos amidos internos às enzimas ali atuantes (SAMMARTINO, 2015). Em consequência, essa enzima auxilia o processo de mosturação.

Mathias *et al* (2017) comparou mostos com e sem adição de proteases comerciais e os resultados indicaram alterações significantes nas características finais. Ocorreu um aumento do extrato, nitrogênio e aminoácidos em até 26% no mosto em que foi empregado proteases comerciais, garantindo maior eficiência fermentativa quando comparado ao mosto padrão (MATHIAS *et al*, 2017).

Johnston (2014) obteve resultados positivos ao adicionar protease no processo de fermentação quando comparado a cerveja sem adição desta enzima. Sua adição resultou em um aumento da produção de álcool em 3%, uma redução no tempo de fermentação de 11%, reduzindo a necessidade de nitrogênio suplementar e uma redução de custos significativa de até 0,04 centavos de dólar por galão (JOHNSTON, 2014).

O seu uso deve ser feito com cuidado, pois pesquisas indicam que uma quantidade irregular de protease afeta a consistência da espuma, sendo essa uma característica muito importante nas cervejas (LEI, 2013). Uma superdosagem pode

afetar também outras enzimas do processo, prejudicando o processo de fabricação da bebida (SAMMARTINO, 2015).

Dentre as características para a faixa ideal de trabalho da protease, a temperatura ideal é 52 °C e sua desnaturação ocorre a partir dos 70 °C. O pH tem um valor considerado ácido quando comparada às outras enzimas disponíveis, variando entre 4 e 4,5, sendo que quando utilizada em valores mais altos, ainda mantém efetividade (SARKER, 2013; SAMMARTINO, 2015).

Sua disponibilidade endógena no grão de malte não costuma ser o suficiente para uma boa produção de cerveja. A adição de enzima comercial é indicada para atingir alta taxa de conversão com os parâmetros de qualidade do produto dentro dos padrões, principalmente quando os ingredientes (amido) são de baixa qualidade (PIDDOCKE, 2011).

4.2.4. Alpha Acetolactate Decarboxylase

A última enzima abordada neste trabalho será a *Alpha Acetolactate Decarboxylase*, conhecida também pela sigla ALDC, sendo esta pertencente ao grupo das liases (BOULTON, 2013). Sua atuação consiste em catalisar a conversão do acetolactato em acetoína (DULIEU, 2008; OLSEN, 2008), conforme figura 4 (FANGLING *et al*, 2018).

O diacetil é um subproduto natural da fermentação. É uma das duas principais dicetinas vicinais (VDKs) produzidas durante a fermentação, sendo a outra a pentanedione. Tem como característica sensorial o gosto de manteiga e de fato é usado na produção de sabores artificiais deste produto. Pentanedione fornece um sabor de mel. Ambos podem ser prejudiciais para a cerveja e são considerados off flavors se forem muito presentes. A enzima ALDC auxilia no processo de metabolismo de açúcares evitando a produção do diacetil um já conhecido como precursor de *off-flavor* e reações indesejáveis no processo cervejeiro (COSTA, 2019).

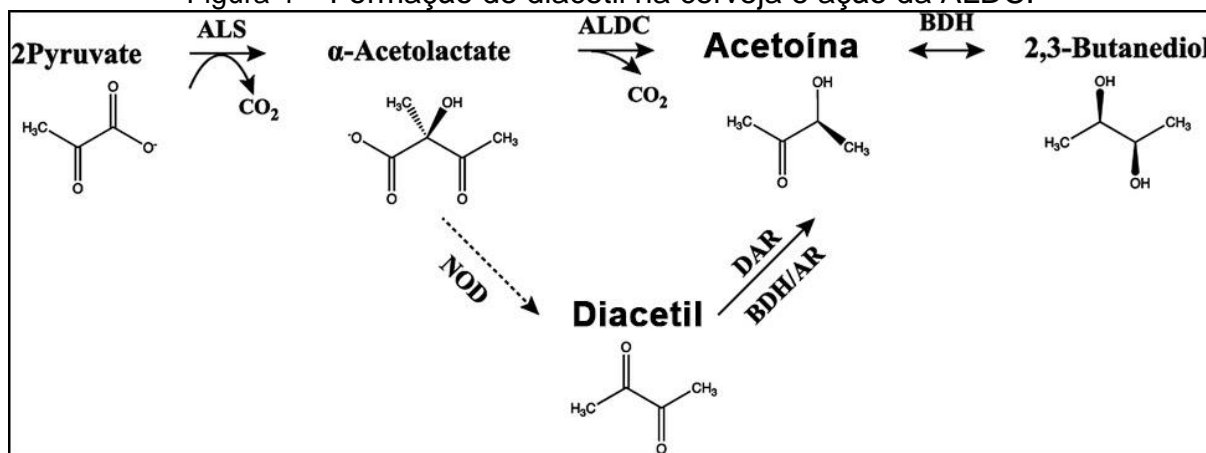
Em grandes indústrias cervejeiras que atendem alta demanda de produção, qualquer redução de tempo no processo garante um maior rendimento na produtividade. A ALDC faz justamente essa função ao reduzir o tempo de fermentação, sem alterar na qualidade da cerveja final. Uma redução de 30 a 35% no tempo de fermentação foi encontrada quando utilizada a ALDC em concentração de

18 (ppm) no processo de fermentação (DULIEU, 2008). Estudos antigos também indicam uma redução no tempo de maturação (GODTFREDSEN E OTTESEN, 1982).

Choi *et al* (2015) estudou a aplicação da ALDC em dois tipos de mosto cervejeiro a ser fermentado e seus resultados concluíram que a adição de ALDC comercial está ligada à redução do diacetil, em proporcionalidade. A redução chegou até 25% no produto e reduziu o tempo de fermentação sem afetar as propriedades sensoriais da cerveja (CHOI *et al*, 2015).

Soares (2019) avaliou a utilização de ALDC proveniente de uma bactéria e relatou que a presença da enzima converteu o diacetil em acetoína e CO₂ no sexto dia de maturação enquanto que o controle, sem adição de enzima, ainda tinha diacetil no oitavo dia de maturação. Sua utilização promoveu uma redução de 25% no tempo de maturação sem afetar o sabor da cerveja (SOARES, 2019).

Figura 4 - Formação de diacetil na cerveja e ação da ALDC.



Fonte: Adaptado conforme Fangling *et al.* (2018).

Os parâmetros de temperatura para se trabalhar com a ALDC variam de 9 a 40 °C, enquanto o pH tende entre 5 e 7. A quantidade de enzima no início da fermentação a ser adicionada varia de 10 a 50 ppm (MURPHY e SON, 2015). Esses valores não são aplicados em escala industrial, devido às produções de cerveja Lager não ultrapassarem 9 °C na fermentação e esse ser o tipo de cerveja onde essa enzima é mais utilizada. Entretanto, outros fabricantes indicam que uma dosagem típica de 10-15 g / 1000 L (10-15 ppm) deve ser adicionada ao mosto frio no início da fermentação (LALLEMAN, 2021).

5. CONCLUSÃO

Conforme as abordagens do presente trabalho, é possível notar que a utilização de enzimas é uma parte vital dos processos cervejeiros. Suas funções catalisadoras biológicas atuam diretamente em diversos momentos da fabricação da bebida. As quatro enzimas citadas têm seus benefícios e impactam de forma distinta em cada processo. Seguindo o roteiro do trabalho, a Beta-Glucanase é encontrada de forma endógena e atua nas etapas de malteação e mosturação, e seu uso afeta diretamente o amolecimento dos grãos para o rompimento das barreiras proteicas e posterior ação de outras enzimas. Sua adição comercial ocorre como removedor de turbidez e clarificador do mosto cervejeiro.

A α -amilase detém o papel crítico de degradação dos açúcares para posteriormente ocorrer a fermentação. Seu uso comercial é feito para acelerar a quantidade de açúcares disponíveis no mosto e a fração utilizada influencia no teor de álcool final das cervejas. As proteases têm diversas funções, as quais pode-se destacar como facilitador do processo de malteação, a etapa de clarificação do mosto e aprimoramento do crescimento da levedura. Por último, foi abordado a ALDC, enzima essa muito eficaz para reduzir o tempo de fermentação e remover alguns off-flavors que podem alterar o sabor do produto, afetando diretamente o consumidor. Todas essas enzimas são utilizadas nas indústrias e têm papel importante ao promover melhorias aos processos de fabricação.

Sendo assim, a aplicação das enzimas tende a auxiliar o atendimento do aumento da demanda mundial por essa bebida. Contudo, doses abusivas trazem características negativas ao produto final e o emprego varia de acordo com a descrição de cada fabricante.

REFERÊNCIAS

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

AULA PRÁTICA BIOQUÍMICA - 2019. **Determinação da atividade da amilase salivar**. Disponível em: <http://sgcd.foa.unesp.br/home/departamentos/ciencias/basicas/2019-determinacao-da-atividade-da-amilase-salivar.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2021.

BAMFORTH, C.W. Progress in brewing science and beer production. **Annu Rev Chem Biomol Eng**. v.8, p. 161-176, 2017.

BAMFORTH, C.W. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. **Journal of Cereal Science**. v.50, p. 353-357, 2009.

BRASIL. **Decreto nº 9.902, de 8 DE Julho de 2019**. Brasília, DF: Presidência da República, 2019. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2019-2022/2019/Decreto/D9902.htm#art2. Acesso em: 21 out. 2020.

BRASIL, C.; OLIVEIRA, D.F.; DUARTE, R.A.; *et al.* β -Glucanase Addition in Brewing Malt Produced by Reduced Time of Germination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.52, 2019.

BOULTON, C. Encyclopedia of brewing. 1ª ed. Hawthorne: **Wiley-Blackwell**. 2013.

CAPIM BRANCO CERVEJARIA. **Produção de puro malte: Produza sua cerveja**. Capim Branco Cervejaria 2021. Disponível em: <http://cervejariacapimbranco.com.br/produza-sua-cerveja/>. Acesso em 24 abr. 2021.

COSTA, G.P. **Imobilização de α -acetolactato descarboxilase e aplicação no processo de maturação de cervejas**. Tese. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2019.

CONWAY, J. **Beer production worldwide from 1998 to 2019 (in billion hectoliters)**. Statista 2020. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production>. Acesso em: 30 out. 2020.

CHOI, E.J.; AHN, H.W.; KIM, W.J. Effect of α -Acetolactate Decarboxylase on Diacetyl Content of Beer. **Food Science Biotechnology**. v.24, n.4, p.1373-1380, 2015.

DULIEU, C.; MOLL, M.; BOUDRANT, J.; *et al.* Improved performances and control of beer fermentation using encapsulated alpha-acetolactate decarboxylase and modeling. **Biotechnol Prog**. v.16, n.6, p.958-965, 2008.

DURELLO, R.S.; SILVA, L.M.; BOGUSZ, S. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900-919, 2019.

FANGLING, J.I.; FENG, Y.; LIA, M.; *et al.* Studies on structure-function relationships of acetolactate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. **The Royal Society of Chemistry**. v.8, p.39066-39073, 2018.

FERREIRA, A.S; BENKA, C.L. **Produção de cerveja artesanal a partir de malte germinado pelo método convencional e tempo reduzido de germinação**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2014.

GUERRA, N.P.; TORRADO-AGRASAR, A.; LÓPEZ, C.; *et al.* 10 - Use of Amylolytic Enzymes in Brewing. **Beer in Health and Disease Prevention**. p. 113-126, 2009.

GOMAA, A.M. Application of Enzymes in Brewing. **Journal of Nutrition and Food Science Forecast**. v.1, n.1, p.1002, 2018.

GODTFREDSEN, S. E.; OTTESEN, M. Maturation of beer with α -acetolactate decarboxylase. **Carlsberg Research Communications**, v.47, p.93-102, 1982.

HARRISON, M.A.; ALBANESE, J.B. Beer/Brewing, 3a. ed., London: **Academic Press**, 2017.

HORNSEY, I. S. A history of beer and brewing. 1a. ed, Londres: **Royal Society of Chemistry**, 2003.

HORNSEY, I. S. Encyclopedia of Food and Health, 1a. ed, Waltham: **Elsevier**, 2016.

HUI, Y.H. Handbook of food science, technology, and engineering, 1a. ed, Boca Raton: **CRC Press**, 2005.

JOHNSTON, D.B.; MCALOON, A.J. Protease increases fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production. **Bioresource Technology**. v. 154, p. 18-25, 2014.

KIRIN. **Kirin Beer University Report Global Beer Production by country in 2017**. 2018. Disponível em: <https://www.kirinholdings.co.jp>. Acesso em: 21 out. 2020.

LALLEMAND. **Abv glucanase premier**. Lallemand Brewing 2021. Disponível em: <https://www.lallemandbrewing.com/en/united-states/product-details/abv-glucanase-premier-gpr511/>. Acesso em: 28 abr. 2021.

LALLEMAND. **Abv alpha acetolactate decarboxylase**. Lallemand Brewing 2021. Disponível em: <https://www.lallemandbrewing.com/en/united-states/product-details/abv-alpha-acetolactate-decarboxylase/>. Acesso em: 22 abr. 2021.

LEI, H.Z.; ZHAO, H.; ZHAO, M. Proteases supplementation to high gravity worts enhances fermentation performance of brewer's yeast. **Biochemical Engineering Journal**. v.77, p. 1-6, 2013.

MATHIAS, T.R.S.; LOPES, M.C.R.D.; OLIVEIRA, C.A.; *et al.* Influence of mashing profile curve and addition of proteases on the composition of the wort and beer. **MOJ Food Processing & Technology**. v.5, n.2, p. 282-286, 2017.

MEGAZYME. **Megazyme's complete toolkit for the study of mixed linkage (1,3:1,4)- β -glucan and the enzymes that act on it**. B-Glucan Portal 2021. Disponível em: <https://www.megazyme.com/focus-areas/beta-glucan-portal>. Acesso em: 18 abr. 2021.

MURPHY & SON. **Technical information sheet: alpha acetolactate decarboxylase**. Murphy & Son, 2015. Disponível em: <https://www.murphyandson.co.uk/w-p-content/uploads/2018/09/A-LDC-R-ev-5.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2021.

MORADO, R. Larousse da Cerveja, 1a. ed, São Paulo: **Alaúde Editorial**, 2017.
NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 7ª ed. Porto Alegre: **Artmed**. 2019.

NETO, C. *et al.* Conceitos Químicos Envolvidos na Produção da Cerveja: Uma Revisão. **Revista Virtual de Química**, v.12, n.1, p. 120-147, fev. 2020.

OLSEN, H.S. **Enzymes in brewing. Biokemisk Forening**. 2008.

OLIVEIRA, D.W.F.; MAASS, D.; RAMÍREZ, I.G.; *et al.* Estudo da capacidade de produção de enzimas amilase, protease e lipase por uma linhagem de *B. subtilis* isolada de solo de manglezal. Em: **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química**; Campinas: Galoá; 2016. Disponível em: <https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/papers/estudo-da-capacidade-de-producao-de-enzimas-amilase--protease-e-lipase-por-uma-linhagem-de-b--subtilis-isolada-de-solo-d>. Acesso em: 15 dez 2020.

PALMER, J. How To Brew: Everything You Need to Know to Brew Great Beer Every Time. 4a. ed, Boulder: **Brewers Publications**, 2017.

PIDDOCKE, M.P.; FAZIO, A.; VONGSANGNAK, W.; *et al.* Revealing the beneficial effect of protease supplementation to high gravity beer fermentations using "-omics" techniques. **Microb Cell Fact**. v.10, n.27, 2011.

SAMMARTINO, M. Enzymes in brewing. **Master Brewers Association of the Americas**. v.52, n.3, p. 156-164, 2015.

SINDHU, R.; SHIBURAJ, S.; SABU, A; *et al.* Innovative Food Processing Technologies. **A Comprehensive Review**. p.191-215, 2021.

WHITEHURST, E.J.; OORT E.V. Enzymes in food technology. 2ª ed. Hawthorne: **Wiley-Blackwell**. 2009: 384.

SARKER, P.K.; TALUKDAR, S.A.; DEB, P.; *et al.* Optimization and partial characterization of culture conditions for the production of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* P003. **Springerplus**. v.2, 2013.

SOARES, M.V.L. **Aplicação da alfa-acetolactato descarboxilase (ALDC) isolada de *Bacillus subtilis* ICA 56 para o desenvolvimento de processos industriais em cervejas**. Tese. (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

VIADER, P.R; YDE, M.S.H.; HARTVIG, J.W.; *et al.* Optimization of Beer Brewing by Monitoring α -Amylase and β -Amylase Activities during Mashing. **Beverages**. v.7, n.1, p.13, 2021.

WONG, D.W. Food enzymes: Structure and mechanism. 1^a ed. New York: **Springer US**. 1995; 390.