



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MARCIA VALERIA LACERDA SOARES

**APLICAÇÃO DA ALFA-ACETOLACTATO DESCARBOXILASE (ALDC) ISOLADA
DE Bacillus subtilis ICA 56 PARA O DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
INDUSTRIAIS EM CERVEJAS**

FORTALEZA
2019

MARCIA VALERIA LACERDA SOARES

APLICAÇÃO DA ALFA-ACETOLACTATO DESCARBOXILASE (ALDC) ISOLADA DE
Bacillus subtilis ICA 56 PARA O DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS INDUSTRIAIS
EM CERVEJAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos

Orientadora: Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Departamento de Engenharia Química-UFC)

Co-orientador: Dr. Benevides Costa Pessela João (Departamento de Producción y Caracterización de Nuevos Alimentos - Universidad Autónoma de Madrid)

FORTALEZA

2019

MARCIA VALERIA LACERDA SOARES

APLICAÇÃO DA ALFA-ACETOLACTATO DESCARBOXILASE (ALDC) ISOLADA DE
BACILLUS SUBTILIS ICA 56 PARA O DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
INDUSTRIAIS EM CERVEJAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos

Aprovada em: 27/03/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Cavalcante (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Denise Cavalcante Hissa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Ana Paula Dionísio
Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dr. Diego Romão Gondim
Universidade Estadual Vale do Acaraú

À Deus,
aos meus pais Jorge e Emidia,
às minhas irmãs, aos meus amigos
e a todos aqueles que colaboraram na
execução desse trabalho,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus em primeiro lugar pela força e determinação para chegar até o fim, por ter me dado oportunidade de trabalhar com pesquisadores maravilhosos e me rodear de pessoas boas.

Aos meus pais Emidia Lacerda Neta e Antonio Jorge Araújo Soares pelo apoio de sempre, por me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos e por não medirem esforços na minha educação e me apoiarem nas minhas decisões.

Às minhas irmãs Camila Lacerda e Mariana Lacerda pelo carinho, amizade, e por estarem sempre ao meu lados em todos os momentos.

À minha orientadora Luciana Rocha Barros Gonçalves por tornar o Doutorado mais prazeroso com sua gentileza, paciência, educação, calma e incentivo. Por todos os momentos em que ela sempre tinha algo a ensinar e uma palavra amiga a fornecer.

Ao meu co-orientador Benevides Costa Pessela Joao pelos ensinamentos, pelo acolhimento em Madrid, por me receber quase que diariamente em sua sala para tirar dúvidas e saber do andamento da pesquisa. Enfim, por todo apoio que me foi dado no período do doutorado sandúiche na Espanha.

À professora Maria Valderéz Ponte Rocha por gentilmente aceitar fazer parte da banca e enriquecer a tese com seus conhecimentos, por toda dedicação que ela coloca em tudo que faz, por tirar as dúvidas e mostrar pros alunos sua determinação.

À professora Denise Cavalcante Hissa por toda ajuda prestada cada vez que fui em seu laboratório, por me ensinar e tirar minhas dúvidas sempre que precisei, pelas sugestões que possibilitaram a melhoria desta tese.

À professora Ana Paula Dionísio pelas considerações na banca e enriquecimento do trabalho, por tudo que ela me ensinou durante meu estágio na EMBRAPA na minha graduação, pela paciência e vontade que ela tem de ensinar as pessoas a sua volta.

Ao professor Diego Romão Gondim por aceitar participar da banca e compartilhar seus conhecimentos e pelas modificações para melhoria do trabalho.

À professora Vânia Maria Maciel Melo por me receber de maneira ímpar em seu laboratório todas as vezes que precisei, por todas as conversas enriquecedoras que ela sempre tinha uma ideia quando as coisas não saíam como esperado e também por aceitar participar da banca e contribuir ainda mais com a melhoria do trabalho.

Aos pesquisadores Edy Sousa de Brito, Guilherme Julião Zocolo e Tigressa Helena Rodrigues da Embrapa por toda ajuda e por tudo que eles me ensinaram.

À todo o grupo de pesquisa GPBio, em especial a Bruna Pinheiro, Renata Kelly, Kimberle Paiva e Nathália Rios por todos os momentos de descontração, pela ajuda sempre quando precisei.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia Química e a todos os professores pelos ensinamentos, críticas construtivas e por buscarem conseguir sempre o melhor de cada aluno.

Aos colegas de doutorado, especialmente Caroline Gondim, Bruno Sousa, Paula Luciana e Marcelo Lima por toda ajuda nos momentos difíceis, pela união e compartilhamento de conhecimentos.

À todos os amigos que fiz no período do doutorado sanduíche Paz Garcia, Daniela Remonato, Glória Fernandez e Paolla Pagan por todos os momentos incríveis que me proporcionaram e por tornarem mais fácil os momentos difíceis que passei, meu muito obrigada!

Ao Welson Lopes por me incentivar e acreditar que na minha capacidade, pela paciência e compreensão.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível o cumprimento de mais essa etapa.

À Funcap e CNPq, pelo apoio financeiro.

À CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche.

RESUMO

Durante o processo de produção da cerveja alguns compostos são formados na fermentação primária e interferem na qualidade do produto final, sendo denominados *off flavors*. Um dos *off flavors* de fermentação da cerveja é o diacetil, que fornece um sabor amanteigado indesejável, e desta forma necessita ser eliminado do processo fermentativo. A enzima alfa acetolactato descarboxilase (ALDC) evita a formação de diacetil na cerveja fazendo a conversão direta do acetotactato em acetoína. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a redução de diacetil com utilização da enzima ALDC, proveniente de *Bacillus subtilis* ICA 56, no processo de produção de cerveja e testar diferentes suportes para imobilização da ALDC. Para isso, essa pesquisa foi dividida em duas etapas. A primeira se destinou produzir a enzima em sua forma livre e aplicá-la diretamente na cerveja, para avaliar a sua capacidade em reduzir o tempo de maturação. Para isso, foram produzidos 10 L de cerveja e a enzima foi inserida na etapa da fermentação; depois iniciou-se a maturação, e a cada dia, uma alíquota de 8 mL era retirada (durante 8 dias) e em seguida adicionava-se NaCl para análise das amostras utilizando-se cromatografia gasosa com detector de massa (CG-MS) empregando a técnica micro extração em fase sólida (SPME). O segundo passo foi imobilizar e avaliar os parâmetros de estabilidade frente ao pH e à temperatura da ALDC, na forma livre ou imobilizada em dietilaminoetil agarose (DEAE) ou monoaminoetil-N-etil agarose (MANAE) ou MANAE-glutaraldeído. Avaliou-se, também, a estabilidade destes biocatalisadores após recobrimento com trealose e com glutaraldeído. Com os resultados obtidos, pode-se perceber que, na presença da enzima ALDC livre, o diacetil foi eliminado no sexto dia de maturação, enquanto que na cerveja sem adição de enzima, ele ainda estava presente no oitavo dia de maturação. A enzima ALDC foi efetiva na redução do composto diacetil reduzindo o tempo de maturação da cerveja produzida. Com relação imobilização e estabilidade, as melhores atividades foram obtidas quando ALDC foi imobilizada em DEAE, recoberta com trealose e em MANAE-glutaraldeído, também após o recobrimento com trealose obtendo atividades de 1,46 e 1,62 U/g de suporte, respectivamente. O pH e temperatura que permitiram a maior atividade e estabilidade foram de 6.0 e 45 °C, respectivamente, enquanto a enzima foi rapidamente inativada em pH 9 e 10. A enzima imobilizada no suporte MANAE-glutaraldeído apresentou maiores valores de atividade e foi mais estável.

Palavras-Chaves: “off flavor”. Maturação. Cerveja. Imobilização.

ABSTRACT

During the brewing process, some compounds are formed in the primary fermentation and may interfere in the quality of the final product; these compounds are named *off flavors*. Diacetyl is one undesirable *off flavor* in beer. For diacetyl removal, alpha acetolactate decarboxylase (ALDC) can be used because it prevents the formation of diacetyl in beer by converting acetolactate directly into acetoin. In this context, the objective of this work was to evaluate the reduction of diacetyl in the brewing process using ALDC produced by *Bacillus subtilis* ICA 56. Therefore, this research was divided in two stages. The first was intended to apply the produced free enzyme, evaluating its ability to reduce maturation time in beer. For this, 10 L of beer were produced and the enzyme was inserted in the fermentation stage; maturation was then started, and each day, an 8 mL aliquot was taken (for 8 days) and then NaCl was added for analysis of the samples using mass detector gas chromatography (GC-MS) employing the micro extraction phase solid technique (SPME). The second step was to immobilize and evaluate the pH and temperature stability parameters of ALDC, using diethylaminoethyl agarose (DEAE), monoaminoethyl N-ethyl agarose (MANAE) or MANAE-glutaraldehyde as supports. The stability of these biocatalysts after trehalose and glutaraldehyde coating was also evaluated. From the obtained results it is possible to see that maturation time was shortened by the enzyme, in the presence of free ALDC, diacetyl was eliminated on the sixth day of maturation, while in beer without enzyme addition, it was still present on the eighth day of maturation. Regarding immobilization and stability, the best activities were obtained when ALDC was immobilized in DEAE, covered with trehalose and MANAE-glutaraldehyde, also after treatment with trehalose, reaching activities of 1.46 U/g and 1.62 U/g support, respectively. The pH and temperature that allowed the highest activity and stability were 6.0 and 45 °C, respectively, while the enzyme was rapidly inactivated at pH 9 and 10. MANAE-glutaraldehyde support offered the best activity values and was the most stable.

Palavras-Chaves: “off flavor”. Maturation. Beer. Immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Malte de cevada.....	23
Figura 2.	Lúpulo.....	24
Figura 3.	Fluxograma de processo genérico da produção de cerveja.....	26
Figura 4.	Brassagem.....	27
Figura 5.	Fórmula estrutural do diacetil.....	31
Figura 6.	Estrutura cristalina da acetolacato descarboxilase da subespécie spizizenii de <i>Bacillus subtilis</i>	32
Figura 7.	Ilustração esquemática da atuação da enzima α -acetolactato descarboxilase (ALDC).....	33
Figura 8.	Classificação dos métodos de imobilização.....	34
Figura 9.	Atividade enzimática de ALDC proveniente de <i>Bacillus subtilis</i> ICA 56 com o tempo a três valores de kLa diferentes a 37° C e 150 rpm: (■) kLa = 119.85 h ⁻¹ (volume de meio 50 mL), (●) kLa = 67.40 h ⁻¹ (volume de meio 100 mL), e (▲) kLa = 48.08 h ⁻¹ (volume de meio 150 mL).....	48
Figura 10.	Influência da idade do inóculo na produção da ALDC por <i>Bacillus subtilis</i> ICA 56 a 37° C e 150 rpm durante 6 h e durante 24 horas de incubação.....	49
Figura 11.	SDS-PAGE da enzima α -acetolactatod escarboxilase: 1-marcadore de baixo peso molecular (GE Healthcare LifeSciences); 2-peso molecular da enzima ALDC.....	50
Figura 12.	Amsotras da cerveja produzida com enzima ALDC produzida por <i>B. subtilis</i> ICA 56 (A) e sem enzima (B) após 8 dias de maturação (20 °C) para injeção em CG-MS.....	51
Figura 13.	Cromatograma do íon extraído (EIC) do composto diacetil (m/z =86) proveniente da cerveja comercial.....	51
Figura 14.	Cromatograma do íon extraído (EIC) da solução padrão de 10 g.L ⁻¹ de diacetil usada para gerar a matriz de calibração e EIC das amostras de cerveja produzida, ambos identificados nas colunas HP5-MS e na DB-Wax. DC – diacetil; SP – solução padrão.....	56
Figura 15.	Software Beer Smith no desenvolvimento da receita da cerveja Kölsch com os ajustes para equipamento utilizado de 10 L.....	58
Figura 16.	Logomarca e rótulo desenvolvidos durante a produção da tese.....	59

Figura 17.	Concentração de diacetil nas amostras de cerveja com a enzima e sem a enzima ALDC durante 8 dias de fermentação a 20 °C.....	60
Figura 18.	Efeito do pH na atividade da ALDC. O efeito do pH foi determinado usando acetato de sódio (pH 5), fosfato de sódio (pH 6), bicarbonato de sódio (pH 9 e10) a 25 °C para (A) enzima imobilizada em DEAE, e recoberta com trealose e glutaraldeído e comparada a enzima livre, (B) enzima imobilizada em MANAE e recoberta com trealose e glutaraldeído e comparada a enzima livre (C) enzima imobilizada em MANAE-GLUTARALDEÍDO e recoberta com trealose e glutaraldeído e comparada a enzima livre. DEAE, MAN e MAN-GLUT foram recobertos com trealose (20%), que foi nomeado DEAE+trea, MAN+trea and MAN-GLUT+trea, respectivamente. Glutaraldeído (5%) foi outro agente crosslinking usado na pós-imobilização em DEAE, MAN e MAN-GLUT, nomeados de DEAE+glut, MAN+glut e MAN-GLUT+glut....	66
Figura 19.	Atividade relativa com o efeito da temperatura para (A) enzima imobilizada em DEAE, e recoberta com trealose e glutaraldeído e comparada a enzima livre, (B) enzima imobilizada em MANAE, e recoberta com trealose e glutaraldeído e comparada a enzima livre, (C) enzima imobilizada em MANAE-GLUTARALDEÍDO e recoberta com trealose e glutaraldeído e comparada a enzima livre.....	68
Figura 20.	Estabilidade da ALDC de <i>Bacillus subtilis</i> ICA 56 com a temperatura a 45 °C em termos de atividade relativa (%) para (A) enzima imobilizada em DEAE, e recoberta com trealose e glutaraldeído e comparada a enzima livre, (B) enzima imobilizada em MANAE, e recoberta com trealose e glutaraldeído e comparada a enzima livre, (C) enzima imobilizada em MANAE-GLUTARALDEÍDO e recoberta com trealose e glutaraldeído e comparada a enzima livre.....	71
Figura 21.	Estabilidade da enzima ALDC na temperatura de 50 °C em termos de atividade relativa (%) para (A) enzima imobilizada em MANAE-GLUTARALDEÍDO, e recoberta com trealose glutaraldeído e comparada a enzima livre.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Índices de retenção encontrados na literatura para a coluna HP5-MS ou DB-Wax dos compostos presentes na cerveja com e sem enzima ALDC.	40
Tabela 2.	Matérias primas utilizadas na fabricação da cerveja artesanal do tipo Kölsch. ...	42
Tabela 3.	Índices de retenção encontrados na literatura para a coluna DB-Wax dos compostos presentes na cerveja com e sem enzima ALDC.	44
Tabela 4.	Dados para montar a curva analítica final após o tratamento de valores extremos	52
Tabela 5.	Resultados dos testes de auto correlação.	53
Tabela 6.	Resultados da Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade.....	53
Tabela 7.	Compostos identificados na cerveja nas colunas HP5-MS e DB-Wax: tempo de retenção, índice de retenção e área (%).	55
Tabela 8.	Resultados obtidos na análise de variação de cor das cervejas produzidas com adição e sem adição da enzima ALDC.	57
Tabela 9.	Concentração de diacetil na cerveja nos dias 5, 6, 7 e 8 de maturação com e sem a utilização da enzima ALDC.	60
Tabela 10.	Perfil total dos compostos presentes em ambas cervejas produzidas com e sem a utilização da ALDC, com base no tempo de retenção, índice de retenção (IR) e área em porcentagem.	62
Tabela 11.	Parâmetros de imobilização de derivados de ALDC: atividade oferecida, rendimento de imobilização (RI), Atividade teórica ($A_{teórica}$), Atividade do derivado (A_{td}).	63
Tabela 12.	Atividade enzimática nos derivados após a modificação pós-imobilização com trealose e glutaraldeído.	64
Tabela 13.	Percentual de atividade mantida em 24h na influência do pH na estabilidade para enzima livre e enzima imobilizada nos suportes DEAE, MANAE e MANAE-GLUT antes e após o recobrimento em diferentes condições de pH (5, 6, 9, 10).	67
Tabela 14.	Parâmetros do modelo de Sadana e Henrey (1987) (k e c) e resultados do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) utilizado para ajuste aos dados de inativação térmica a 45 ou 50 °C e pH 7.0 dos derivados das imobilizações em DEAE, MANAE e MANAE-GLUTARALDEÍDO, e ativação com trealose e com glutaraldeído.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDC – alfa acetolactato descarboxilase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATGE – ágar, triptona, glicose e extrato de levedura

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa

DO – Densidade Ótica

EIC – Cromatograma do íon extraído

EM – Espectrometria de massa

GRAS – geralmente reconhecido como seguro

HS – Headspace

NIST – National Institute of Standards and Technology

SPME – Microextração em fase sólida

TIC – Cromatograma do íon total

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1	Histórico da cerveja.....	21
3.2	Classificação das cervejas.....	21
3.3	Ingredientes.....	22
3.3.1	<i>Água.....</i>	<i>22</i>
3.3.2	<i>Malte.....</i>	<i>23</i>
3.3.3	<i>Lúpulo.....</i>	<i>24</i>
3.3.4	<i>Levedura.....</i>	<i>25</i>
3.4	Produção de cerveja.....	25
3.4.1	<i>Moagem.....</i>	<i>26</i>
3.4.2	<i>Brassagem.....</i>	<i>27</i>
3.4.3	<i>Filtração e clarificação.....</i>	<i>28</i>
3.4.4	<i>Fervura.....</i>	<i>28</i>
3.4.5	<i>Fermentação.....</i>	<i>28</i>
3.4.6	<i>Maturação.....</i>	<i>29</i>
3.4.7	<i>Envase.....</i>	<i>29</i>
3.5	Off flavors.....	29
3.5.1	<i>Diacetil.....</i>	<i>30</i>
3.6	Método para identificar e quantificar o diacetil.....	31
3.7	Enzima α-acetolactato descarboxilase (ALDC).....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Produção da enzima.....	35
4.2	Efeito do volume na produção da ALDC por <i>B. subtilis</i> ICA 56 em frascos agitados.....	36
4.3	Extração da enzima α-acetolactato descarboxilase do meio de cultura.....	36
4.4	Determinação da atividade enzimática da ALDC.....	37

4.5	SDS-PAGE da enzima solúvel.....	37
4.6	Contagem de células viáveis em placa.....	38
4.7	Determinação e quantificação do diacetil.....	38
4.7.1	<i>Padrões, reagentes e amostra de cerveja.....</i>	38
4.7.2	<i>Preparação da curva de calibração.....</i>	38
4.7.3	<i>Avaliação da adequação da curva analítica ao modelo linear.....</i>	39
4.7.4	<i>Análise CG-MS.....</i>	39
4.8	Produção da enzima alfa acetolactato descarboxilase (ALDC) em biorreator.....	41
4.8.1	<i>Obtenção do extrato enzimático.....</i>	41
4.9	Formulação e desenvolvimento do rótulo.....	41
4.10	Produção da cerveja.....	42
4.11	Análises na cerveja.....	42
4.12	Determinação instrumental da cor.....	44
4.13	Imobilização da enzima ALDC.....	45
4.13.1	<i>Preparo e modificação dos suportes usados na imobilização da enzima.....</i>	45
4.13.2	<i>Imobilização ALDC nos suportes.....</i>	45
4.14	Determinação do pH e temperatura ótimos da enzima ALDC.....	46
4.15	Medida de estabilidade com pH e temperatura da enzima ALDC.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	Resultados preliminares.....	46
5.1.1	<i>Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}).....</i>	47
5.1.2	<i>Efeito da idade do inóculo na produção da ALDC.....</i>	48
5.2	Resultados obtidos.....	49
5.2.1	<i>Caracterização enzimática.....</i>	49
5.2.2	<i>Determinação do diacetil.....</i>	50
5.2.3	<i>Determinação dos parâmetros nas cervejas com e sem enzima ALDC.....</i>	57
5.2.4	<i>Elaboração do rótulo e logomarca para cerveja produzida.....</i>	58
5.2.5	<i>Perfil das cervejas com e sem enzima ALDC com relação a quantidade de diacetil presente.....</i>	59
5.2.6	<i>Imobilização da ALDC nos diferentes suportes.....</i>	63
5.2.7	<i>Efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada.....</i>	64
5.2.8	<i>Efeito do pH na estabilidade da enzima ALDC livre e imobilizada.....</i>	66
5.2.9	<i>Efeito da temperatura na enzima livre e imobilizada.....</i>	67
5.2.10	<i>Estabilidade com a temperatura.....</i>	69

6	CONCLUSÃO.....	74
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida consumida e apreciada em todo o mundo. Existem diferentes estilos de cerveja e durante a produção desta, deseja-se obter um produto com a melhor qualidade, sem defeitos e “*off flavors*”.

O setor cervejeiro está em constante evolução e vem contribuindo de maneira positiva para o desenvolvimento econômico do Brasil. Em 2018, o Brasil foi o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, superado apenas pela China e pelos Estados Unidos (GOVERNO DO BRASIL, 2019). A tendência atual do consumo de cerveja está em constante ascensão uma vez que os consumidores estão buscando adquirir produtos de qualidade, apreciando os diferentes estilos existentes e até mesmo estudando as peculiaridades de cada um desses estilos. Por isso, as micro cervejarias vem ganhando bastante competitividade em relação às grandes empresas cervejeiras (BERKHOUT *et al.*, 2013).

Tem-se difundido a exploração de novas tecnologias de produção desta bebida devido a alteração do padrão de consumo de cerveja, levando à criação de diversos estilos, bem como variações dentro dos mesmos. A inovação na indústria cervejeira pode ir desde a introdução de novas combinações de maltes, lúpulos e outros aromáticos, ou até utilização de leveduras que não são comumente usadas no processo fermentativo, pois a levedura contribui de forma direta para o desenvolvimento sensorial da cerveja (MICHEL *et al.* 2016; BASSO *et al.*, 2016). Isso se dá pela vontade de criação de novos aromas e sabores ou até mesmo para aprimorar os já existentes.

O processo de fabricação da cerveja possui poucas etapas, contudo cada uma tem sua complexidade. A primeira delas é a moagem do malte seguida da adição à água quente. Segundo Narziß e Beck (2009), a adição do malte moído irá formar uma solução em que ocorrem processos mecânicos e bioquímicos para ao fim do processo gerar maior qualidade e rendimento (NARZIß e BECK, 2009). Quando a conversão do amido termina faz-se uma filtração e em seguida dá-se início à fervura (VENTURINI FILHO, 2010). Após a fervura, faz-se o resfriamento para que a levedura seja adicionada. Com a adição da levedura, segue-se com as etapas de fermentação e maturação (PALMER, 2006) que são etapas importantes para a qualidade do produto final, e necessitam ser devidamente controladas. O passo mais importante na produção da cerveja é a fermentação, e durante este processo diferentes compostos são formados, sendo os majoritários etanol e dióxido de carbono, porém são produzidos também elementos-chave pela levedura, como álcoois superiores, ésteres e dicetonas vicinais (VDKs) (HANNEMANN, 2002; VANDERHAEGEN, 2006; DONG 2013). Os compostos aromáticos e voláteis são diferentes no malte e lúpulo e muitos deles podem gerar sabores indesejáveis

quando ultrapassam certos limites. Durante a maturação, que é a etapa posterior a fermentação, alguns compostos voláteis ficam em menores concentrações. Todavia, álcoois superiores e ésteres permanecem alterando o sabor do produto final, sendo necessário manter as concentrações dos compostos voláteis dentro de limites estabelecidos para que não seja agregado ao produto final sabores salgados, amargos, ácidos ou doces (KOBAYASHI *et al.*, 2008). O diacetil, que é produzido em maiores quantidades na fermentação primária, e dos compostos responsáveis por promover uma alteração sensorial desagradável na cerveja, deixando-a com aroma e sabor remetente à manteiga rançosa. Sendo assim, ele é um parâmetro de qualidade importante e, por isso, deve-se fazer o acompanhamento de sua concentração durante a etapa de fermentação. Seu controle na indústria cervejeira necessita ser realizado, devendo estar em concentração inferior a 0,15 ppm (WENBO *et al.*, 2017). Além do diacetil, outros *off flavors* podem aparecer na cerveja, como, por exemplo, o acetaldeído, cítrico, adstringente; porém estes compostos só estarão presentes se houver alguma falha ou contaminação durante o processo de produção, diferente do diacetil que está sempre presente, uma vez que é produzido pela levedura.

Os microrganismos responsáveis pelo processo fermentativo, leveduras do gênero *Saccharomyces*, produzem o α -acetolactato, de forma extracelular, como metabólito indispensável para o crescimento celular. Este composto pode sofrer oxidação, por meio de um processo lento, não enzimático, porém que depende da temperatura, o qual irá causar uma descarboxilação, resultando no composto diacetil que será removido posteriormente no processo de fermentação por conversão redutora para acetoína e 2,3 butanediol (KABAKTSCHIEVA *et al.*, 1994). Sua formação é desvantajosa porque, mesmo após a ação de redutases na etapa de maturação da bebida, se o diacetil permanecer em concentrações superiores a 0,15 mg/ litro de bebida, o seu sabor será perceptível (LANDAUD *et al.*, 1998). Por isso, faz-se necessário buscar alternativas de reduzir ou eliminar este *off flavor*.

O controle da concentração de diacetil na cerveja pode ser alcançado através de estratégias de prevenção da formação do precursor α -acetolactato, aumentando-se a taxa de descarboxilação química do mesmo (CARVALHO *et al.*, 2006), ou com pequena elevação da temperatura, ou ainda utilizando-se a enzima alfa acetolactato descarboxilase (ALDC). A ALDC converte alfa acetolactato em acetoína, sem produzir o diacetil, fazendo com que a etapa de maturação seja menos demorada (HANNEMAN, 2002). Esta enzima é essencial para acelerar o processo de maturação removendo ou reduzindo os níveis de diacetil pois, uma vez que é produzida a acetoína, esta não atribui nenhum *flavor* ao produto final e a produção da cerveja pode ser finalizada com o envase.

Diversos métodos vêm sendo avaliados para que a quantidade de diacetil formada durante a fermentação seja reduzida ou até mesmo acelerar a reabsorção deste composto no processo. A utilização da ALDC é uma das mais promissora, uma vez que ela age convertendo α -acetolactato diretamente em acetoína, sem produzir diacetil (GODTFREDSSEN e OTTESEN, 1982, AKASAKA, *et al.*, 2013, CHOI *et al.*, 2015). Isso tornará o estágio de maturação da cerveja mais rápido, podendo assim acelerar os demais processos e aumentar a produção da bebida.

Para detecção e quantificação do diacetil, pode-se usar a cromatografia gasosa/espectrometria de massa pois esta consegue medir a concentração de compostos voláteis em cerveja (RODRIGUES, *et al.*, 2011). A injeção direta não é adequada para análise quantitativa de bebidas como a cerveja, por conter também compostos não voláteis (SNOW e SLACK, 2002). Na maioria dos estudos publicados, faz-se a derivatização da amostra (CARRILO *et al.*, 2011; SAISON *et al.*, 2008; SAISON *et al.*, 2009) mas neste trabalho não foi feita nenhuma modificação da mesma. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) tem sido usada para identificar componentes de aroma e flavor em diversos tipos de alimentos, incluindo a cerveja. A técnica de micro extração em fase sólida (SPME) é uma das técnicas mais comuns para cerveja por ser uma técnica de fácil automatização, não utiliza solventes e de fácil utilização, em que se utiliza uma fibra que absorve analitos na amostra, tornando maior a sensibilidade para a medição de compostos voláteis (RODRIGUES, 2011). Esta técnica é interessante para análise de diacetil por apresentar alto nível de sensibilidade de quantificação para este.

Como o *Bacillus sp.* é relatado na literatura como micro-organismo produtor da ALDC, iniciou-se no Grupo de Pesquisas em Processos Biotecnológicos (GPBio) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, em parceria com o Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), um estudo visando identificar cepas produtoras. Com este objetivo, Lemos (2015) estudou cepas de *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. velenzensis* para a produção da enzima e selecionou uma que apresentou maiores valores de atividade. Neste trabalho, pode-se dar continuidade aos estudos com a cepa escolhida (*Bacillus subtilis* ICA 56.) produzindo a ALDC e posteriormente aplicando-a na cerveja.

A aplicação industrial da ALDC de *Bacillus subtilis* se tornou acessível em 1991, com o nome comercial Maturex L, sendo usada por muitas cervejarias para acelerar a maturação da cerveja (HANNEMAN, 2002). Como a aplicação da enzima é na indústria de alimentos, faz-

se necessário utilizar um microrganismo seguro, ou seja, não patogênico (HANNEMAN, 2002). O *Bacillus subtilis* é um microrganismo GRAS (geralmente reconhecido como seguro) (WESTERS, WESTERS e QUAX, 2004).

Uma alternativa que torna atrativo o uso de enzimas como biocatalisadores industriais é a sua utilização na forma imobilizada pois isso pode melhorar as propriedades enzimáticas (GUZIK, *et al.*, 2014) para poder reutilizar e, assim, desenvolver sistemas para reduzir o tempo do processo, bem como reutilizar a enzima. Existem várias estratégias de imobilização, sendo as mais comuns a adsorção (física ou iônica) e a ligação covalente. A adsorção iônica é um dos protocolos mais utilizados devido à sua simplicidade de reversibilidade (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). Quando a estratégia de imobilização é cuidadosamente pensada, pode-se observar um aumento na estabilidade, atividade e seletividade das enzimas, bem como uma maior resistência aos inibidores (GUZIK, *et al.*, 2014, BARBOSA, *et al.*, 2015, ZAAK, *et al.*, 2018).

Neste contexto, este trabalho surge da necessidade de reduzir o tempo do processo de fabricação da cerveja e, para isso, propõe-se o uso da ALDC. Por ser uma enzima de alto custo, é de suma importância realizar estudos a fim de determinar formas de obtenção desta enzima, ou seja, produzi-la no Brasil, tornando-a mais acessível para a indústria cervejeira. Para isso, avaliou-se a produção da enzima ALDC utilizando o *Bacillus subtilis* ICA 56, verificando quais parâmetros fermentativos fornecem melhor atividade enzimática para utilização da enzima no processo de produção da cerveja. A seguir, definiu-se um método cromatográfico (HS-SPME-GC-MS) para quantificar diacetil em uma cerveja de formulação caseira, testando as colunas HP5-MS e DB-Wax, que possuem polaridade diferentes. E, por fim, testou-se a imobilização e estabilização da enzima produzida em diferentes suportes. Cinco diferentes suportes foram utilizados sendo eles: carboximetilcelulose (CM), sulfopropil (SP), dietilaminoetil agarose (DEAE), obtidos comercialmente, e monoaminoetil-N-etil (MANAE) e MANAE-GLUTARALDEÍDO (MAN-GLUT) produzidos no laboratório, sendo que o suporte MANAE-GLUT é o suporte MANAE ativado com glutaraldeído. CM e SP são suportes carregados negativamente, enquanto que os suportes MANAE e DEAE são suportes carregados positivamente. O uso de suportes iônicos tem como principais vantagens a possibilidade de reutilização, facilidade de imobilização e simples utilização (PESSOLA, *et al.*, 2003). Neste estudo, foram utilizadas estratégias para redução de diacetil avaliando as características da enzima, bem como determinar suporte para imobilização enzimática. Este é um dos pioneiros trabalhos que tem como principal propósito a imobilização da enzima ALDC em suporte MANAE-GLUTARALDEÍDO.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar as condições para a produção de um biocatalisador, ALDC de *Bacillus subtilis* ICA 56, e sua aplicação na redução do diacetil durante o processo de produção de uma cerveja artesanal.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir a enzima ALDC de *Bacillus subtilis* ICA 56 por cultivo submerso;
- Recuperar a enzima ALDC para utilização posterior;
- Identificar e quantificar o composto diacetil na cerveja artesanal produzida através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas usando a técnica de microextração em fase sólida;
- Utilizar a enzima livre diretamente na cerveja e avaliar a quantidade de diacetil presente durante a etapa de maturação;
- Imobilizar a enzima em diferentes suportes e avaliar a estabilidade em pH e temperatura nas enzimas livre e imobilizada;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico de cerveja

A cerveja é uma bebida alcóolica fermentada a partir de cereais, principalmente a cevada, água, lúpulo e levedura. Também pode conter outros carboidratos como milho, arroz e trigo (SIQUEIRA, *et al.*, 2008). Hoje, é considerada grande parte das bebidas elaboradas com cereais nos últimos 8000 anos.

Desde pelo menos 4000 a.C., era conhecida pelos sumérios, egípcios e mesopotâmios. Nesta mesma época, os babilônios já produziam diversos tipos de cerveja de cevada, trigo e mel. Aproximadamente entre os anos de 1792 e 1750 a.C., foi criado o Código de Hamurabi, sendo este a mais antiga lei que regulamenta a comercialização, fabricação e consumo da cerveja, relacionando direitos e deveres dos clientes das tabernas. Esta lei inclusive condenava a morte aqueles que não respeitavam os critérios de produção de cerveja indicados (HISTÓRIA DA CERVEJA, 2018).

A cerveja era fabricada em mosteiros e utilizava-se ervas para aromatizá-la, dentre elas, o lúpulo utilizado até hoje e introduzido no processo de fabricação da cerveja para atribuir amargor e para preservar a cerveja (HISTÓRIA DA CERVEJA, 2018).

O processo de produção de cerveja não era controlado de maneira eficiente, fazendo com que a cerveja não tivesse a mesma qualidade. Com isso, só foi possível aperfeiçoar a qualidade do produto a partir das descobertas dos microrganismos e da pasteurização pelo cientista Louis Pasteur (BRIGGS, *et al.*, 2004). Devido ao avanço das tecnologias de controle e produção de cerveja, foram surgindo micro cervejarias.

3.2 Classificação das cervejas

A cerveja pode ser classificada quanto ao tipo de fermentação ou quanto aos principais guias de estilo. Sua classificação quanto a fermentação é: Ale, Lager e Lambic. As cervejas Ale são cervejas de alta fermentação, isso significa que elas fermentam em temperaturas mais altas, entre 18 e 25 °C. Já as Lagers são cervejas que fermentam em temperaturas entre 8 e 12 °C, possuem menor atividade metabólica. Por fim, as lambics são cervejas de fermentação espontânea realizada por microrganismos presentes no ar, incluindo leveduras e bactérias; seu processo de fabricação costuma demorar entre 1 e 4 anos (BREJAS, 2019).

Na classificação das cervejas quanto ao guia de estilos, sendo os dois principais Beer Judge Certification Program (BJCP) e Brewers Association, as cervejas foram categorizadas principalmente de acordo com sua aparência, aroma, sabor, considerando também regionalidades e características históricas de fabricação (JACKSON, 2010). Neste tipo de classificação a cerveja além de possuir determinadas características específicas de cada estilo, ainda tem especificações de álcool, acetaldeído, diacetil, dentre outros, que dependendo do estilo produzido, podem estar presentes em baixos níveis ou que não podem estar de forma alguma no produto.

3.3 Ingredientes

3.3.1 Água

A água é o componente mais abundante na cerveja, pode constituir de 85 a 90%, sendo a porcentagem restante composta por o lúpulo, malte e levedura, podendo também adicionar adjuntos. A água que pode ser utilizada para a produção de cerveja é a água potável mas geralmente é necessário fazer alguns ajustes, como adição de sais, por exemplo. Também pode ser utilizada a água de torneira, porém a maioria delas é tratada com cloro, e necessita-se realizar um tratamento para deixá-lo em concentração ideal, uma vez que este composto pode gerar defeito na cerveja, o clorofenol, sendo necessária sua remoção através de fervura ou uso de filtro de carvão ativado. Sendo assim, a qualidade da água é de fundamental importância principalmente nas características de aroma, cor, sabor, espuma e corpo da cerveja (PALMER, 2006).

A água influencia na conversão do amido em mosto e, por essa razão, fornece um sabor único na cerveja (PALMER, 2006). Além disso, a presença de sais dissolvidos possui influência diretamente em processos enzimáticos e químicos da fermentação, interferindo na qualidade do produto final (VENTURINI FILHO, 2010).

Os requisitos básicos para uma água adequada na produção da cerveja são: utilizar água potável, possuir alcalinidade máxima de 50 ppm e, pH na faixa de 4 a 9, e conter em torno de 50 ppm de cálcio (VENTURINI, 2013).

3.3.2 Malte

O malte é a principal fonte de amido presente na cerveja, irá fornecer os açúcares para que a levedura faça a conversão em etanol e CO₂. O amido é um composto de fundamental importância que está na fração glicídica do malte, ele é hidrolisado por enzimas para a produção de açúcares responsáveis por características como viscosidade, densidade e teor alcoólico da cerveja (GALVÃO, 1997).

Qualquer grão de cereais pode ser transformado em malte através da maltagem, alguns exemplos de grãos que podem ser usados são: cevada, milho, trigo, centeio, arroz e aveia (MARTINS e RODRIGUEZ, 2015). Dentre todos esses grãos, o malte de cevada, mostrado na Figura 1, destaca-se por possuir casca dura, baixo teor de proteína, alto teor de amido e ser a fonte mais comum de açúcares fermentáveis em cerveja. A casca dura protege externamente o grão, estando no interior deste, o amido que irá fornecer mais açúcares para ser convertido em álcool (OLIVER, 2012).

Segundo Aquarone *et al.* (2001), o malte de cevada tem como função principal fornecer açúcar para a fermentação da cerveja. Apesar disso, Priest *et al.* (2006), defendem que pode ser interessante o uso de outros cereais maltados como, por exemplo, o trigo, especialmente para produzir cervejas especiais, como a Weiss alemã produzida com trigo maltado. Assim sendo, a escolha do cereal fica a critério do cervejeiro, que pode utilizar apenas um ou uma mistura de diferentes tipos de cereais.

Figura 1. Malte de cevada



Fonte: Autor, 2019.

3.3.3 Lúpulo

Os lúpulos cervejeiros são flores em forma de cone da videira *Humulus lupulus*, é de difícil cultivo e responsável pelo amargor da bebida mas inicialmente era utilizada para auxiliar a conservação durante o transporte principalmente. O lúpulo possui resinas compostas por alfa e beta ácidos. Fornecem amargor, óleos essenciais, sabor e aroma. São formados por muitos componentes sendo os principais os hidrocarbonetos da família dos terpenos, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos e álcoois (AQUARONE *et al.*, 2001).

O lúpulo (Figura 2) é a parte condimentada e amarga que contribui para atributos secundários da cerveja, pois os lúpulos são uma forma de prover estabilidade bacteriológica, auxiliar na coagulação dentro da panela e contribuir para um colarinho estável. Antes da ampla aceitação dos lúpulos, várias outras ervas amargas eram usadas para equilibrar o dulçor do malte. No século VIII, utilizava-se uma mistura de ervas basicamente composta de absinto, alecrim e gengibre. Porém, seu fornecimento era um monopólio lucrativo, por isso o lúpulo surgiu como concorrente (MORADO, 2017).

A quantidade de álcool na cerveja não aumenta com a adição do lúpulo. Ele irá fornecer equilíbrio para o dulçor do malte e fornecer refrescância à bebida, de modo que ele é marcante em muitos estilos de cerveja, sendo análogo a um tempero. O lúpulo pode conferir mais amargor ou aroma dependendo do tipo usado ou em qual etapa da produção o mesmo é adicionado. Se adicionado nos estágios iniciais da fervura, ele contribuirá em maior parte com o amargor. Já quando acrescentado nos últimos instantes do processo, contribui principalmente no aroma da bebida (PALMER, 2006).

Também possui uma função de conservação, que é dada à lupulina, parte em que se encontram os ingredientes essenciais, presente apenas na flor feminina (OLIVEIRA, 2011). Esta ação antisséptica é devido a presença de ácido isoalfa em sua composição, que são bacteriostáticos (AQUARONE *et al.*, 2001).

Figura 2. Lúpulo



Fonte: Autor, 2019.

3.3.4 Levedura

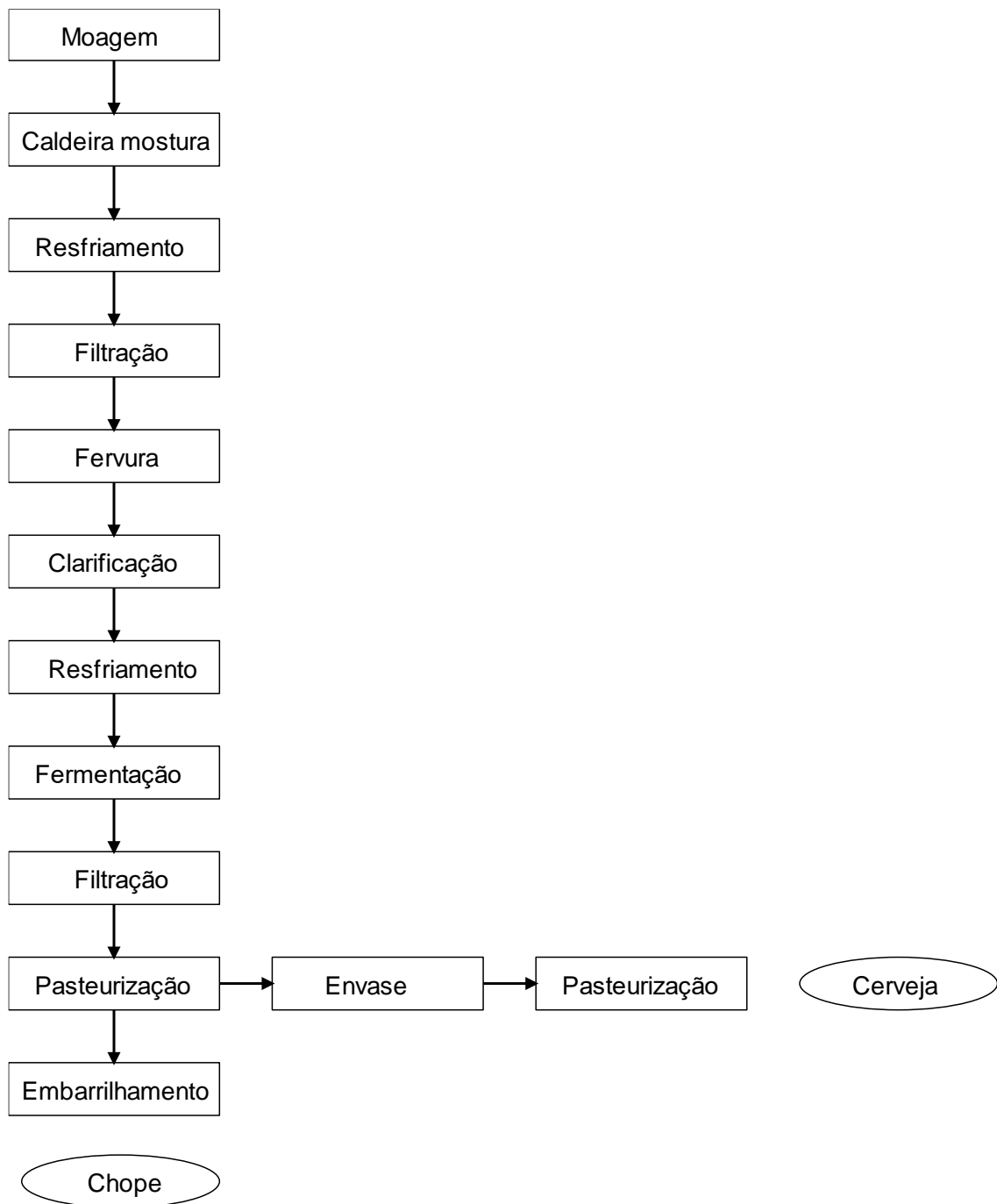
A levedura é um organismo unicelular, pertencente ao reino Fungi, que pode ser encontrada no ar, no solo, na pele. Existem várias espécies de levedura mas apenas duas são as principais usadas na produção de cerveja: *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*.

A principal função da levedura é converter os açúcares (glicose e maltose) em CO₂ e álcool, porém outros componentes podem ser gerados em menores quantidades, como, por exemplo, álcoois superiores, cetonas, ésteres, fenóis e ácidos graxos. As notas frutadas são provenientes dos ésteres, os fenóis remetem às especiarias e o aroma e amanteigado é função da presença de diacetil (PALMER, 2006; SALIMBENI *et al.*, 2016). A variedade de compostos irá alterar para as diferentes estirpes de levedura de cerveja, assim, as cervejarias guardam suas cepas para garantir a qualidade e tornando-se mais competitiva. (BOULTON, 2013).

3.4 Produção de cerveja

A Figura 3 ilustra um fluxograma das principais etapas do processo de produção da cerveja, com suas respectivas entradas (malte), saídas (produtos gerados) e adição de matéria-prima ao longo do processo (Levedura e lúpulo).

Figura 3. Fluxograma de processo genérico da produção de cerveja



Fonte: Adaptada de CETESB, 2005.

3.4.1 Moagem

Nesta etapa inicial o grão será moído para extração dos açúcares. Moer o grão objetiva tornar acessível a parte interior do grão a fim de permitir ação enzimática na etapa posterior. Uma moagem correta permite que o amido contido no interior do endosperma seja

liberado para que as enzimas consigam quebrar em açúcares menores este amido (BOULTON, 2013). A moagem considerada ideal é aquela que quebra o grão de maneira que sua casca fique preservada ao máximo para que não seja transformado tudo em pó e assim causar entupimentos e deixar o processo mais difícil. Porém os grãos não devem ficar inteiros porque isto diminuirá o rendimento do processo, uma vez que os açúcares não ficarão disponíveis (PALMER, 2006).

3.4.2 Brassagem

A brasagem ou mosturação (Figura 4) é a etapa em que o malte moído será colocado em água previamente aquecida à temperatura especificada para o tipo de cerveja que está sendo preparado. É nesta etapa que as enzimas alfa e beta amilase irão converter o amido em açúcares fermentáveis e não fermentáveis.

A quantidade de água, grãos, calor e tempo de processo são dependentes do tipo de cerveja. De maneira geral, a temperatura da água é elevada a um determinado valor para ativação de enzimas específicas e fica durante um determinado período junto com o malte em um recipiente.

Neste processo é necessário fazer um controle de temperatura rigoroso pois entre 60 e 65 °C atuam as beta amilases, que são enzimas que agem quebrando o amido pela ponta, originando assim duas moléculas de glicose; enquanto que as alfa amilases atuam na temperatura de 72-75 °C quebrando o açúcar em qualquer ponto (menos na ligação central), originando carboidratos mais complexos (maiores) e mais simples (menores). Já as enzimas limite dextranases cortam no ponto central onde as outras duas não conseguem. Para que a alfa e a beta amilase trabalhem em conjunto a temperatura tem que estar em 68 °C.

Figura 4. Brassagem



Fonte: Autor, 2019.

3.4.3 Filtração e clarificação

Quando o amido for todo convertido em açúcar, deve-se seguir com a filtração; ao mesmo tempo que o mosto está sendo filtrado, automaticamente está sendo clarificado também. Nesta etapa, pode-se usar diferentes tipos de filtro, sendo o bazooka que é um filtro que fica acoplado no recipiente de brassagem e com a ajuda das cascas dos grãos o mosto vai sendo filtrado e clarificado. Posteriormente, a lavagem das cascas é realizada utilizando-se água aquecida nas próprias peneiras de coleta ou em filtros prensas (RUSSEL e STEWART, 1995; MARTINS, 1991).

3.4.4 Fervura

A fervura é o passo seguinte; nesta etapa, adicionam-se os lúpulos de aroma e de amargor. A fervura tem vários objetivos, dentre eles: inativação de enzimas, pasteurização do mosto, coagulação proteica, extração de compostos de amargor e aromáticos do lúpulo, evaporação de água excedente e de componentes aromáticos indesejáveis no produto final (TSCHOPE, 2001; VENTURINI, 2013). A fervura dura em média de 60-75 min, variando de acordo com a receita. Com o término da fervura, é feito o resfriamento do mosto para fazer a inoculação da levedura.

3.4.5 Fermentação

Nesta etapa, há um controle da temperatura para que a levedura trabalhe na sua condição ideal. Estas leveduras irão metabolizar os açúcares, como por exemplo, glicose, maltose e maltotriose, além de aminoácidos e peptídeos e transformar em etanol e gás carbônico. Em menor quantidade a levedura produz outros metabólitos. De acordo com Bamforth (2009), não são todas as substâncias presentes no mosto que são consumidas pelas leveduras, assim as que ficaram após a fermentação também serão responsáveis pelos sabores presentes no produto final. No final da fermentação obtém-se álcool, álcoois superiores, diacetil, ésteres, compostos de enxofre e ácido carboxílico (BAMFORTH, 2009). Segundo Palmer (2006), quando a fermentação está chegando ao final, a maioria dos açúcares do mosto produziu álcool, então, devido à falta de açúcar, a levedura começa a processar lentamente diferentes compostos produzidos durante a fase primária, como por exemplo, o diacetil, que é uma substância indesejável e altera as propriedades organolépticas da cerveja.

3.4.6 Maturação

A maturação consiste no armazenamento em temperaturas mais baixas após fermentação, que objetiva promover a estabilidade coloidal, sedimentação de fermento residual e outros componentes para se conseguir uma cerveja mais limpa, arredondamento do paladar e aroma, clarificação da cerveja, amadurecimento e eliminação de substâncias sulfonadas que são arrastadas pelo gás carbônico (PRIEST; STEWART,2006, ALVISI, 2011,). É a etapa em que se depositam as substâncias formadoras de turvação, como células de leveduras, subprodutos de decomposição de taninos, proteínas, etc. Na maturação é onde a cerveja estará praticamente concluída, tendo seu aroma e sabor definidos. A maturação tradicionalmente, envolve a segunda fermentação do extrato fermentável restante a uma taxa reduzida controlada por baixas temperaturas e uma baixa contagem de levedura na cerveja verde. Durante a fermentação secundária, a levedura remanescente se torna ressuspensa utilizando os carboidratos fermentáveis na cerveja (GOLDAMMER, 1999).

3.4.7 Envase

Antes do envase, o produto obtido é filtrado, podendo ou não ser pasteurizado. Algumas cervejarias optam por não filtrar e manter as leveduras no envase. Geralmente, isso ocorre em cervejarias pequenas que realizam o processo de re-fermentação na garrafa, adicionando açúcar, geralmente sacarose, diretamente na garrafa. O objetivo deste processo é fazer a carbonatação da cerveja, através da produção de gás carbônico pela levedura, aumentando um pouco do teor alcoólico e enriquecendo o perfil sensorial da cerveja. Nas grandes cervejarias, esta carbonatação é feita injetando-se gás carbônico na cerveja logo após a filtração (MORADO, 2009).

3.5 Off flavors

Flavor é denominado a sensação fisiológica de interação entre paladar e olfato. Os *off flavors* são falhas na cerveja como aroma, gosto ou sabor que não fazem parte do perfil sensorial da cerveja.

Na maioria dos casos, o *off flavor* indica alguma falha no processo, seja ela de contaminação, tempo de fermentação ou algum descuido durante a produção. Entretanto, a

presença deste, não causa nenhum mal, o problema está na experiência sensorial que pode ser bastante desagradável quando presente na cerveja.

Existem muitos *off flavors*, e é importante saber que o estilo de cerveja fará diferença na aceitação da mesma, uma vez que um determinado *flavor* pode ser aceito em baixa concentração para um determinado estilo, enquanto que para outros estilos, o mesmo composto não poderá estar presente, mesmo em baixa concentração (VENTURINI FILHO, 2000).

Os *off flavors* mais comuns e conhecidos são: metálico, papelão, acetaldeído, diacetil, clorofenol, dimetil sulfeto (DMS), sabão, cítrico, éster, adstringente, caprílico. Mas existem dezenas de *off flavors* catalogados (KAMIMURA e KANEDA, 1992).

Para controlar esses interferentes na cerveja deve-se ter cuidado com o uso de matéria-prima que deve ser de boa qualidade, armazenada adequadamente, dentro do prazo de validade; os processos da cerveja durante a moagem, fervura e fermentação; todo o material utilizado na produção deve ser higienizado e sanitizado, principalmente após a fervura; outro controle que deve ser feito também é no envase e armazenagem da cerveja (KAMIMURA e KANEDA, 1992).

3.5.1 Diacetil

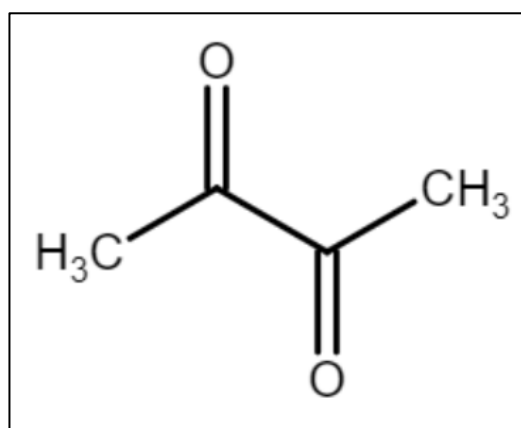
O diacetil, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 5, é uma dicetona vicinal de fundamental importância na cerveja que acarreta uma característica organoléptica indesejável a vários estilos de cerveja, o sabor amanteigado (KABAKTSCHIEVA, 1994) quando está acima de 0,15 ppm (DULIEU, *et al.*, 2000), por isso ele é um dos principais controles realizados pelas indústrias cervejeiras.

O diacetil é formado pela descarboxilação oxidativa (um processo lento e não enzimático) da α -acetolactase secretada pela levedura durante a síntese de valina e leucina e é removido mais tarde no processo de fermentação por conversão redutora para acetoina e para 2,3 butanodiol (Kabaktschieva *et al.*, 1994). Os precursores deste composto são formados durante o metabolismo da levedura, porém ao final da fermentação a levedura pode converter ele no composto 2,3-butanediol que não possui sabor. Entretanto, na presença de quantidades elevadas de diacetil, devido à produção do mesmo por bactérias contaminantes como *Lactobacillus sp* e *Pediococcus sp*, a levedura não consegue metabolizar todo o produto e este permanecerá no meio, afetando a qualidade do produto final, promovendo *off flavor* que remete à manteiga rançosa (Jay, 2000).

Na fermentação são formadas dicetonas vicinais (diacetil) através do metabolismo da levedura. O controle rigoroso do diacetil é feito durante a produção, enquanto não atinge o

nível aceitável, o processo de produção da cerveja fica estagnado. A concentração de diacetil pode ser controlada através de estratégias que previnam a formação do precursor α -acetolactato, ou através do aumento da taxa de descarboxilação química do mesmo (CARVALHO *et al.*, 2006). Para que o diacetil esteja em níveis aceitáveis, deve-se tomar cuidado na sanitização correta para que bactérias contaminantes não estejam presente e favoreçam a formação deste compostos e também pode-se utilizar a ALDC para acelerar o tempo de maturação da cerveja.

Figura 5. Fórmula estrutural do diacetil



Fonte: Autor, 2019.

3.6. Método para identificar e quantificar o diacetil

A concentração de diacetil na cerveja mesmo quando está em pequenas concentrações pode afetar as características sensoriais do produto, gerando *off flavor* (MOREIRA *et al.*, 2013).

Uma técnica que vem sendo empregada para identificar e quantificar componentes como aroma/*flavor* em diversos produtos alimentícios, incluindo a cerveja, é a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (RODRIGUES *et al.*, 2011). Por ser um procedimento simples e preservar as características naturais da amostra, um método amplamente utilizado é a microextração em fase sólida (SPME– Solid Phase Microextraction).

A técnica SPME consiste em extrair e pré-concentrar o composto em uma única etapa. Introduzida por Arthur e Pawliszyn (1990), a microextração em fase sólida, reduz o tempo total de análise por amostra, tem menor tratamento / manipulação da amostra, elimina o uso de solventes orgânicos, tem perda reduzida de analito, é simples, pode-se reutilizar a fibra (PAWLISZYN, 1999).

O método para a identificação e quantificação de diacetil pode ser desenvolvido ou adaptado de algum método já validado previamente. Neste trabalho adaptou-se uma metodologia já validada e, de posse dos resultados, foi feita uma adequação da curva analítica ao modelo linear a fim de tornar os resultados laboratoriais mais precisos e exatos.

3.7. Enzima α – ACETOLACTATO DESCARBOXILASE (ALDC)

A alfa acetolactato descarboxilase (ALDC, EC.4.1.1.5), apresentada na Figura 6, é reportada na literatura como uma enzima capaz de transformar acetolactato em acetoína, por meio de uma redução oxidativa sem produzir o diacetil (LOKEN e STORMER, 1970; SUIHKO *et al.*, 1990), e por isso, sua utilização na maturação da cerveja é indicado, uma vez que ALDC promoverá benefício econômico reduzindo tempo de produção da cerveja (ZHANG *et al.*, 2015).

Figura 6. Estrutura cristalina da acetaractato descarboxilase da subespécie spizizenii de *Bacillus subtilis*.



Fonte: Eom, J, *et al*, 2019.

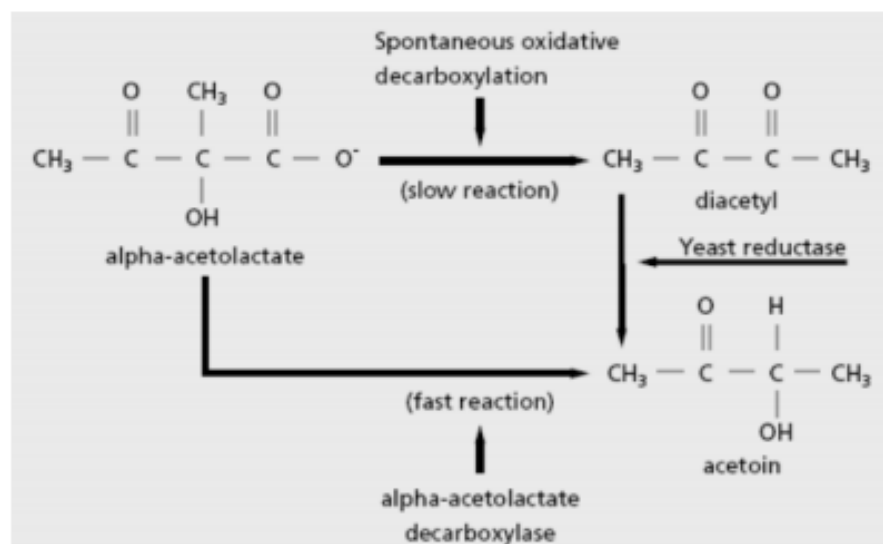
A ALDC comercial já foi aplicada em outros estudos, conforme patente publicada por Nguyen *et al.* (2012), bem como usada nas indústrias, geralmente em sua forma livre, e 1 kg desta enzima custa em torno de 760,00. Entretanto, no Brasil há carência de sua produção, sendo na maioria das vezes importada e, por esta razão, produzi-la evitaria problemas de disponibilidade ou perda de qualidade durante o transporte, por exemplo.

Esta enzima pode ser produzida por diversos microrganismos (GOUPIL-FEULLERAT *et al.*, 1997) e possui diferentes pesos moleculares em cada um deles: *Lactobacillus casei* com 27,5 kDa (RASMUSSEN *et al.*, 1985), *Brevibacillus brevis* com 35 kDa (SVENDSEN, *et al.*, 1989) e *Bacillus subtilis* com 28,9 kDa (JI *et al.*, 2018), porém para aplicação industrial, o *Bacillus subtilis* é mais adequado devido esta espécie do gênero se tratar de um GRAS (geralmente reconhecido como seguro) (WESTERS *et al.*, 2004). Além disso, espécies deste gênero possuem boas propriedades de fermentação, na maioria das vezes não possuem subprodutos tóxicos (EARL *et al.*, 2010) e já vem sendo estudada pelo grupo de pesquisa GPBio, no trabalho de Lemos (2015). Por isso, neste trabalho utilizou-se o microrganismo *Bacillus subtilis* para produzir a enzima ALDC.

Dependendo do microrganismo utilizado as características de pH e temperatura ótimas, bem como de estabilidade com pH e temperatura podem ser diferentes, Guo *et al.* (2014), estudando ALDC proveniente de *Lactococcus lactis* encontraram valores ótimos de pH e temperatura de 6.5 e 40 °C, respectivamente; já Rasmussen *et al.* (1985), ao estudar ALDC produzida de *Lactobacillus casei* encontraram pH e temperatura ótimos de 5.0 e 37 °C.

A Figura 7 mostra como o uso da ALDC possibilita encurtar a fermentação primária da cerveja (KELIN, 2010) e até diminuir o tempo de maturação em relação aos níveis de diacetil (HANNEMAN, 2002). Como é uma enzima que não altera o sabor do produto final, não é necessário retirá-la ao fim do processo.

Figura 7. Ilustração esquemática de atuação da enzima α -acetolactato descarboxilase (ALDC).



Fonte: MARADYN, 2012.

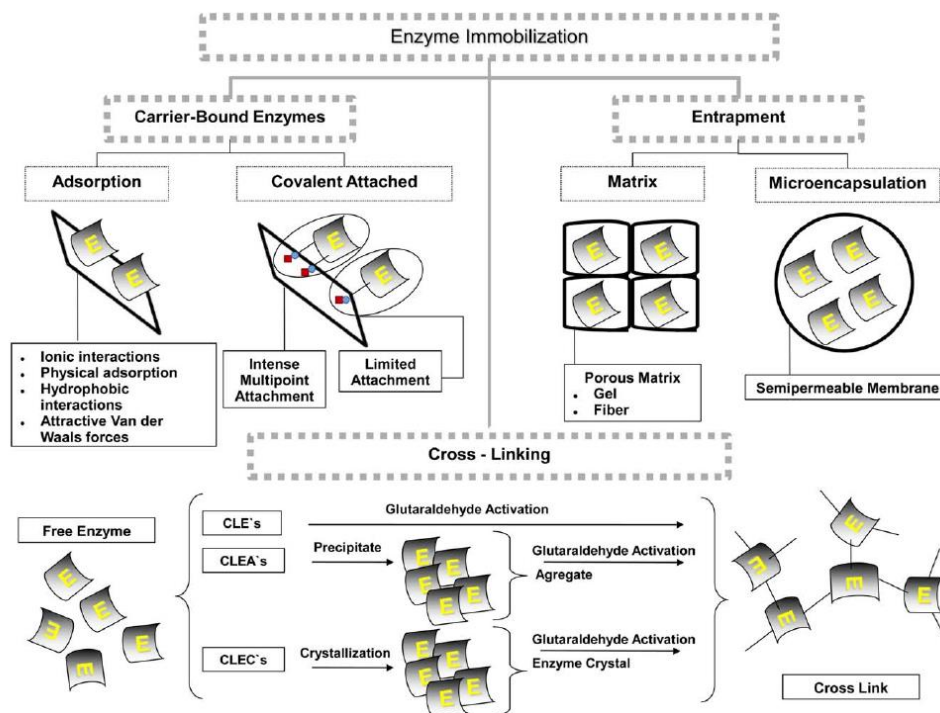
Além de ser usada na forma livre, a enzima ALDC pode ser usada em sua forma imobilizada. O interesse na utilização da enzima em sua forma imobilizada é que a imobilização

permite a fácil recuperação dessas biomoléculas depois do ciclo reacional para seu reuso posterior (RODRIGUES *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2015).

As principais vantagens associadas a esta técnica são a estabilização e reuso das enzimas imobilizadas e a possibilidade da invenção de reatores específicos para a aplicação da enzima (leito fluidizado ou empacotado tanques agitados com e sem alimentação contínua, entre outros). As desvantagens da imobilização são a mudança conformacional da estrutura enzimática (pode ser que ocorra modificação na obtenção do produto final ou a perda da atividade catalítica), há um aumento dos custos em relação a enzima livre, e geralmente há perda de atividade durante o processo de imobilização (MATEO *et al.*, 2007).

Existe uma variedade de métodos de imobilização, conforme apresentado na Figura 8, que podem ser utilizados para preparar o biocatalisador. A escolha da técnica é feita dependendo das características bioquímicas da proteína, características físicas e químicas do suporte e da aplicação desse biocatalisador, assim como também do reator a que será utilizado (BRÍGIDA, 2010). As técnicas mais comumente utilizadas são a adsorção física, e ligação covalente (SILVA *et al.*, 2012) uni e multipontual (MEILGAARD, 1975). No caso da indústria de alimentos, o suporte interessante a ser usado é a agarose, porque além de ser de fácil manipulação, ativação e degradação, é atóxica, não interfere no sabor do produto e tem grande área superficial.

Figura 8. Classificação dos métodos de imobilização.



Fonte: BEZERRA, *et al.*, 2015.

A adsorção física é a mais simples e de baixo custo, e ocorre com a ligação da enzima ao suporte por interações iônicas fracas. Estas ligações podem ser desfeitas até mesmo com pequenas mudanças de pH e temperatura (BRÍGIDA, 2010).

A imobilização por ligação covalente proporciona estabilidade da ligação enzima-suporte fazendo assim com que não ocorra desprendimento da enzima para o meio reacional. Para gerar ainda mais estabilidade da enzima, ligações covalentes multipontuais podem ser formadas e suportes com grupos epóxi, grupos amino ativados com glutaraldeído são alguns exemplos de materiais que podem ser aplicados nesse tipo de imobilização (BEZERRA *et al.*, 2015; CORÍCI *et al.*, 2011).

Geralmente esta técnica é utilizada para diversas aplicações industriais, sendo necessário realizar a escolha do suporte na qual a biomolécula será fixada (SANTOS *et al.*, 2015; MATEO, GRAZ e FERN, 2007).

A escolha do suporte para imobilização enzimática é de fundamental importância, já que contribui para o bom desempenho da enzima imobilizada, podendo torná-la estável ou comprometer o desempenho global do sistema (MENDES, 2011). Neste trabalho, utilizou-se a técnica de troca iônica sendo o suporte escolhido a agarose, que foi utilizada anteriormente em pesquisas do grupo GPBio (Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos) por Lemos (2015) em que obteve bons resultados de imobilização da enzima ALDC também proveniente de *Bacillus subtilis*. A agarose é um suporte que tem características de não influenciar no sabor do produto, não é tóxico, é de fácil degradação e manipulação, fácil ativação por ela ter vários grupos hidroxilas, grande área superficial e é mecanicamente resistente (KELIN, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção da enzima

A linhagem de *Bacillus subtilis* ICA56 foi isolada por Lima (2013) e cedida gentilmente pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTEC) da Universidade Federal do Ceará. A sequência genética 16S rRNA da ICA56 pode ser acessada no GenBank (KM235112). A cepa foi mantida em meio ATGE (15,0 g.L⁻¹ agar, 5,0 g.L⁻¹ triptona, 5,0 g.L⁻¹ glicose, 2,5 g.L⁻¹ extrato de levedura).

O meio fermentativo usado para produção da enzima foi o proposto por OLSEN (1986) que possui em sua composição: Fosfato monossódico (1 g.L⁻¹); Fosfato de potássio dibásico (1 g.L⁻¹); Sulfato de amônio (2,5 g.L⁻¹); Cloreto de sódio (0,25 g.L⁻¹); Sulfato de magnésio (0,20 g.L⁻¹); Cloreto férrico (0,04 g.L⁻¹); Sulfato de manganês (0,0025 g.L⁻¹); Glicose

(10 g.L⁻¹); Extrato de levedura (3 g.L⁻¹). O meio de cultura foi esterilizado a 110 °C por 10 min em frascos Erlenmeyer de 250 mL.

A cepa de *Bacillus subtilis* ICA 56 foi repicada em meio contendo ágar, triptona, glicose e extrato de levedura (ATGE) e incubada a 37 °C por 24 h. Depois disso, três colônias foram transferidas para o frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 15 mL do meio fermentativo, no qual as culturas permanecerem sob agitação contínua de 150 rpm a 37 °C por 6 h.

A produção da enzima ALDC foi conduzida em Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio fermentativo. Uma alíquota de 15 mL (10% v/v) do inóculo foi transferida para o Erlenmeyer e os experimentos foram realizados a 37 °C, 150 rpm por 24 horas.

4.2 Efeito do volume do meio na produção da ALDC por *B. subtilis* ICA 56 em frascos agitados

Os volumes do meio líquido testados foram de 50, 100 e 150 mL para avaliar as diferentes quantidades de meio em frascos Erlenmeyer de mesmo tamanho (250 mL). Na literatura, são descritas algumas equações empíricas por diferentes autores para tentar explicar o processo de transporte de oxigênio. Para isso, modelos empíricos são utilizados objetivando a correlação com o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) e as variáveis de processo. Neste trabalho foi calculado o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) para avaliar a influência do oxigênio de acordo com Equação (1) (SELETZKY, *et al.*, 2007), por ser um sistema semelhante ao que foi utilizado nesta tese, ou seja, utilização de Erlenmeyer, agitação na faixa de 50-500 rpm e volume do frasco entre 50 e 1000 mL.

$$k_{La} = 6 \cdot 67 \times 10^{-6} n^{1.16} V_F^{-83} d_0^{0.38} d^{1.92} \quad (1)$$

Nesta equação, k_{La} é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h⁻¹), n é a velocidade de agitação (min⁻¹); V_F é o volume do meio líquido dos frascos (mL); d_0 é o diâmetro da agitação (cm); d é o diâmetro máximo do frasco de agitação (cm).

4.3 Extração da enzima α -acetolactato descarboxilase

A α -acetolactato descarboxilase é uma enzima intracelular e deve ser liberada para o meio. Assim, aproximadamente 20 mL da amostra foram coletados e centrifugados a 10000 g por 20 min a 4 °C. Os sedimentos celulares obtidos a partir da centrifugação foram lavados com 20 mL de tampão 2- (N-morfolino) etanossulfico (MES) e deixados em banho de gelo para serem submetidos a ultrassom de ponteira para o rompimento das células. O tempo total

utilizado foi de 10 minutos sendo 10 segundos sonicando e 20 segundos em repouso, e a amplitude usada foi de 40 Hz. Depois de romper as células, centrifugou-se novamente a 18.000 g por 20 min a 4 °C. Os extratos foram armazenados em geladeira (18 °C) até serem utilizados.

4.4 Determinação da atividade enzimática da ALDC

A atividade enzimática da ALDC foi determinada por método colorimétrico, seguindo a metodologia de Stormer (1975), em que o produto acetoína reage com uma solução de naftol e creatina.

Foi desenvolvida uma curva de calibração, em que soluções de acetoína comercial foram preparadas em diferentes concentrações, obtendo-se a curva padrão em que resulta-se no valor de acetoína produzida em μmol s. Depois de o valor de acetoína produzida foi possível calcular o valor de atividade enzimática em U/mL, em que uma unidade representa a formação de um μmol de acetoína por minuto a pH 6.0 e 30 °C.

Para calcular a atividade enzimática é necessário produzir uma solução substrato, sempre preparada no momento que for ser utilizada, contendo 300 μL de NaOH 1M com 300 μL de água mili-Q, ajusta-se o pH a 6.0 e por fim, completa-se com tampão MES 50mM a pH 6.0; tem-se a solução substrato finalizada, e então a atividade enzimática pode ser calculada tomando-se 200 μL da solução substrato e 200 μL da solução enzimática (enzima + tampão MES 50 mM, pH 6.0), sendo esta mistura incubada a 30 °C por 20 minutos, depois desta reação enzimática, faz-se a reação colorimétrica, que também deve ser preparada imediatamente antes do uso, que consiste na junção da solução de enzima + solução substrato com 100 mL de NaOH 1M, 0,01g de creatina e 0,1g de α -naftol; esta reação é feita por 40 minutos e logo após este tempo é realizada a leitura em espectro a 522 nm.

4.5 SDS-PAGE da enzima solúvel

A eletroforese SDS-page foi realizada em gel de poliacrilamida a 12% em uma unidade de eletroforese (Mini-PROTEAN 3 cell, EUA), de acordo com Laemmli (1970) em que 10 μL da amostra foram misturadas com 100 μL de tampão de ruptura e então foi realizada a desnaturação das proteínas a 100 °C durante 10 minutos, depois 10 μL das amostras foram pipetadas nos poços do gel e o tampão de corrida foi adicionado. A corrida das amostras foi realizada a 200 Volts no intervalo de 1 hora. As bandas de proteína foram detectadas pelo comassie coloidal, usando marcadores de baixo peso molecular (GE Healthcare LifeSciences) como padrão.

4.6 Contagem de células viáveis em placa

Para contagem, foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície (*spread plate*), em que diluições seriadas são preparadas (10^{-1} a 10^{-4}) em triplicata, e faz-se a inoculação de 0,1 mL de cada diluição na superfície de placas Petri previamente preparadas com ATGE (ágar, triptona, glicose e extrato de levedura), em seguida espalha-se o inóculo pela superfície, com auxílio da alça de Drikalski, fazendo o espalhamento até que o líquido seja completamente absorvido. Feito isso, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas e depois foi feita a contagem.

4.7 Determinação e quantificação do diacetil

4.7.1 Padrões, reagentes e amostra de cerveja

Os padrões diacetil e do 3-octanol, usado como padrão interno, foram obtidos de Sigma-Aldrich. Todos os padrões possuíam grau de pureza maior que 97% adequado para análise em CG-MS. Metanol grau HPLC foi obtido de Tedia (97%).

A cerveja produzida apresentou como componentes: água (20 L), malte Pilsner (2,10 kg), malte carared (0,10 kg), aveia em flocos (0,25 kg), lúpulo collumbus (7 g) e levedura US-05 (8 g), para obtenção final de 10 litros de cerveja. O malte foi adicionado à água na temperatura de 62 °C, após a sacarificação o mosto foi filtrado e seguiu-se para a fervura de 1 hora, etapa onde foi adicionado o lúpulo, após o resfriamento do mosto, inoculou-se a levedura.

A cerveja foi fermentada e maturada em fermentador artesanal, mantido em shaker na temperatura de 18 °C; as amostras foram retiradas diariamente durante 8 dias de maturação. O preparo da amostra foi 8 mL de cerveja em vial de 20 mL, adicionando-se 3 g de cloreto de sódio (NaCl) e solução 100 ppb de 3-octanol (Padrão Interno).

4.7.2 Preparação da curva de calibração

A curva padrão foi elaborada utilizando os padrões diacetil e 3-octanol. As amostras de diacetil para a curva padrão e de 3-octanol (PI) foram preparadas em água mili-Q. Uma solução mãe com o padrão de diacetil foi preparada em metanol e a partir dessa solução foram feitas diluições seriadas para obtenção dos pontos e posterior elaboração da curva. As concentrações testadas foram de 1, 25, 50, 100, 125 e 150 ppb preparados em água mili-Q. Foi utilizado o 3-octanol como padrão interno (PI) na concentração de 100 ppb. Este padrão foi adicionado porque era um composto que não tinha na cerveja e seu objetivo é facilitar a quantificação do composto de interesse para eliminar efeito-matriz. A curva padrão foi feita em triplicata e as amostras de cerveja em quintuplicata.

4.7.3 Avaliação da adequação da curva analítica ao modelo linear

Utilizou-se uma planilha eletrônica desenvolvida por Bazílio *et al.* (2012), na qual foram obtidos e avaliados os dados para a curva analítica experimental, sendo utilizados os valores adquiridos na triplicata de elaboração da curva.

4.7.4 Análises CG-MS

Os compostos voláteis foram analisados em Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (CG-MS). Os voláteis foram extraídos pelo método de micro extração em fase sólida (SPME). A fibra utilizada para adsorção de voláteis foi a DVB/carboxen/PDMS (Supelco) de 2 cm. As condições para as amostras em Head-space SMPE seguiram a metodologia de Moreira *et al.* (2013) com adaptações: utilizou-se 8 mL de amostra e 3 g de NaCl que foram adicionados em vial de vidro de 20 mL. A amostra foi agitada a 500 rpm por 5 min a 45 °C, e a fibra foi então exposta para o head-space por 30 min. A dessorção dos voláteis aconteceu no cromatógrafo gasoso no modo splitless, na temperatura de 250 °C durante 180 segundos. Em seguida a fibra foi condicionada a 260 °C/10 min antes da próxima amostragem.

As análises do CG-MS ocorreram no cromatógrafo gasoso acoplado a detector de massa/ Agilent Technologies (modelo 7890B do CG e 5977A do EM). O gás hélio foi utilizado (mL/min). A separação dos compostos foi feita em coluna DB-Wax e HP5-MS (30m x 0.25 mm; DF = 0.25 um). A temperatura do forno foi programada para manter-se a 40 °C por 8 min seguido de aquecimento a 4.0 °C/min até 210 °C permanecendo por 10 min ao término da corrida. A faixa de massa usada foi de 50-150 m/z. A identificação dos compostos foi feita comparando os tempos de retenção e os dados de MS obtidos numa base de dados online NIST (National Institute of Standards and Technology). A determinação quantitativa foi feita baseada nas áreas relativas, e 3-octanol foi o padrão interno.

Os cromatogramas foram inicialmente obtidos no modo TIC (cromatograma de íons totais) a fim de obter os tempos de retenção (t_{RS}) do composto alvo. Depois de confirmar o tempo de retenção, as análises foram realizadas de acordo com a característica majoritária do íon diacetil m/z 86 ($t_R = 4,5$ min) e o íon m/z 59 para o PI ($t_R = 22,2$ min). O espectrômetro de massa foi operado no modo impacto elétron (EI) 70 ev.

A Tabela 1 indica as referências utilizadas para as comparações dos índices de retenção dos compostos encontrados na cerveja, utilizando o NIST, e referenciando sempre com autores que utilizaram a mesma coluna HP5-MS ou DB-Wax.

Tabela 1. Índices de retenção encontrados na literatura para a coluna HP5-MS ou DB-Wax dos compostos presentes na cerveja com e sem enzima ALDC.

Compostos	Coluna HP5-MS		Coluna DB-Wax	
	Índice de retenção (IR)	Referência	Índice de retenção (IR)	Referência
Etanol	448	<u>Kotowska, Zalikowski, et al., 2012</u>	941	<u>Gurbuz O., Rouseff J.M., et al., 2006</u>
Isobutanol	-	-	1107	<u>Escudero e Etiévant, 1999</u>
Diacetil	596	<u>Bonaiti, Irlinger, et al., 2005</u>	645	<u>Souza, Maria, 2006</u>
Acetato de isoamila	876	<u>Pino, Mesa, et al., 2005</u>	1121	<u>Botelho, Caldeira, et al., 2007</u>
Álcool isoamílico	734	<u>Pino, Mesa, et al., 2005</u>	1217	<u>Botelho, Caldeira, et al., 2007</u>
Caproato de etila	996	<u>Pino, Mesa, et al., 2005</u>	1227	<u>Osorio, Alarcon et al., 2006</u>
Metil caprilato	-	-	1378	<u>Varming, Petersen, et al., 2004</u>
3-Octanol	995	<u>Vagionas, Ngassapa, et al., 2007</u>	1396	<u>Cho, Namgung, et al., 2008</u>
Butanoato de hexila	-	-	1410	<u>Fröhlich, Duque, et al., 1989</u>
Caprilato de etila	1196	<u>Pino, Mesa, et al., 2005</u>	1436	<u>Gurbuz O., Rouseff J.M., et al., 2006</u>
Nonanoato de etila	1294	<u>Pino, Mesa, et al., 2005</u>	1535	<u>Zhao, Xu, et al., 2009</u>
Hexanoato de etila	1645.6	<u>Andriamaharavo, 2014</u>	-	-
Linalol	1101	<u>Flamini, Bader, et al., 2004</u>	1547	<u>Cho, Namgung, et al., 2008</u>
1-Octanol	-	-	1558	<u>Fernandez-Segovia, Esriche, et al., 2006</u>
Caprato de metila	-	-	1586	<u>Xu, Fan, et al., 2007</u>
Caprato de etila	-	-	1635	<u>Selli, Canbas, et al., 2006</u>
Ácido octanóico	1450.4	<u>Andriamaharavo, 2014</u>	1657	<u>Zhao, Xu, et al., 2009</u>
Metil 4-decenoato (trans)	-	-	1680	<u>Zhao, Xu, et al., 2009</u>
Octanoato de etila	1854.4	<u>Andriamaharavo, 2014</u>	-	-
Dodecanoato de etila	1597	<u>Pino, Mesa, et al., 2005</u>	1835	<u>Frohlich e Schreier, 1990</u>
Geraniol	-	-	1830	<u>Varming, Andersen, et al., 2006</u>
Álcool fenetílico	1114	<u>Asuming, Beauchamp, et al., 2005</u>	1901	<u>Rezende e Fraga, 2003</u>
4-vinil guaiacol	-	-	2181	<u>Varming, Petersen, et al., 2004</u>
Ácido decanóico	-	-	2275	<u>Ott, Fay, et al., 1997</u>

Fonte: Autor, 2019.

4.8 Produção da enzima alfa acetolactato descarboxilase (ALDC) em biorreator

A enzima ALDC foi produzida a partir do *Bacillus subtilis* ICA 56, repicou-se o microrganismo em meio ATGE e incubou-se a 37 °C por 24 horas. Depois disso, três colônias foram transferidas para o frasco de Erlenmeyer de 500 mL contendo o meio fermentativo. Após 6 horas de crescimento a 37 °C e 150 rpm, inoculou-se em biorreator (Tecnal TEC-BIO-1,5) de 5 L, sendo de 1 L o volume de meio no fermentador e a proporção entre inóculo e meio de cultivo de 10%, nas mesmas condições por 24 horas.

4.8.1 Obtenção do extrato enzimático

Depois da obtenção da enzima, conforme descrito no item 4.3, o sobrenadante passou por um processo de semi-purificação para que a enzima pudesse ser utilizada na cerveja. Para tanto, fez-se uma precipitação com sulfato de amônia na fração 60-90% de sal. Esta faixa de precipitação foi escolhida após alguns experimentos para determinar em qual faixa a enzima iria precipitar. Em seguida a enzima foi filtrada em filtro concentrador de proteínas Amicon® Ultra-15 com membrana de 30 kDa.

4.9 Formulação e desenvolvimento do rótulo da cerveja artesanal

A necessidade de ter um produto que possa transmitir experiências, conhecimento e emoções, exige a idealização de uma logomarca e um rótulo capaz de definir a identidade da cerveja artesanal, já que os consumidores deste produto buscam qualidade e diferenciação dos demais já existentes, por isso desenvolveu-se a receita e um rótulo diferenciado para a cerveja.

No caso deste trabalho, a cerveja escolhida foi a Kölsch porque é uma cerveja de perfil limpo, clara, sem aromas fortes ou marcantes, e a formulação foi desenvolvida com ajuda do Software Beer Smith, que informa os indicadores da produção e as características finais da receita. O nome escolhido foi Kôxe, em referência ao estilo testado Kölsch que é um nome alemão de difícil pronúncia, buscou-se então um nome mais fácil de ler e que fosse relacionado com a região Nordeste do Brasil, onde a cerveja foi desenvolvida.

Na Tabela 2 são listados os ingredientes na fabricação da cerveja e proporções utilizadas.

Tabela 2. Matérias primas utilizadas na fabricação da cerveja artesanal do tipo Kölsch.

Ingrediente	Quantidade
Água	20 L
Malte Pilsner	2,10 kg
Malte Caramel	0,10 kg
Aveia em flocos	0,25 kg
Lúpulo Collumbus	7 g

Fonte: Autor, 2019.

4.10 Produção da cerveja

A formulação seguiu as instruções do software BeerSmith. Na etapa de brassagem 20 L de água foram aquecidos até a temperatura de 40 °C, posteriormente foi adicionado o malte moído, que ficou a esta temperatura por 20 min. O mosto então foi aquecido até 62 °C onde ficou por 30 min e em seguida 75 °C por 5 min. Em seguida, o mosto foi separado do bagaço de malte utilizando filtração convencional sob pressão atmosférica, sendo o próprio bagaço de malte (torta) o elemento filtrante e um filtro “bazooca” colocado no recipiente de mostura.

Após a filtração do mosto primário, lavou-se o bagaço com 5 litros de água a 78 °C. Então ferveu-se por 60 minutos, sendo o lúpulo adicionado no 1º mosto. Ao término da fervura, foi feito um redemoinho (“whirlpool”), esperou-se 10min e foi iniciada a etapa de resfriamento do mosto em chiller de imersão até (25 °C), para inoculação, utilizou-se 5,75 g de levedura liofilizada, FERMENTIS US-05 (alta fermentação). A fermentação foi conduzida no Laboratório de Sistemas Enzimáticos da UFC, durante 16 dias, e as amostras foram retiradas diariamente. A enzima foi adicionada logo no início da fermentação primária e a concentração utilizada foi a mesma testada por Choi *et al.* (2015) que foi de 0.04 U/mL de ALDC. A fermentação primária ocorreu em 20 °C durante 8 dias. Após a primeira fermentação, retirou-se o mosto fermentado do fermentador e a cerveja foi colocada em outro balde fermentador e foi maturada a 16 °C por mais 8 dias.

4.11 Análises na cerveja

Os compostos voláteis presentes na cerveja desenvolvida foram analisados em Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (CG-MS). Os voláteis foram extraídos pelo método de microextração em fase sólida (SPME). A fibra utilizada para adsorção de voláteis foi a DVB/carboxen/PDMS (Supelco) de 2 cm. As condições para as amostras em Head-space

SMPE foram 8 mL de amostra e 3 g de NaCl. A amostra foi agitada a 500 rpm por 5 min a 45 °C, e a fibra foi então exposta para o head-space por 30 min. A dessorção dos voláteis aconteceu no cromatógrafo gasoso no modo splitless, na temperatura de 250 °C durante 180 segundos. Em seguida a fibra foi condicionada a 260 °C/10 min antes da próxima amostragem.

O gás hélio foi utilizado (mL/min) nas análises de CG-MS. A separação dos compostos foi feita em coluna DB-Wax (30m x 0,25 mm; DF = 0,25 µm). A temperatura do forno foi programada para manter-se a 40 °C por 8 min seguido de aquecimento a 4,0 °C/min até 210 °C permanecendo por 10 min ao término da corrida. A faixa de massa usada foi de 50-150 m/z.

A identificação dos compostos foi feita comparando os tempos de retenção e os dados de MS obtidos numa base de dados online NIST (National Institute of Standards and technology) comparando-se o valor do índice de retenção na coluna DB-Wax de cada composto com os valores relatados na literatura, mostrados na Tabela 14. A determinação quantitativa foi feita baseada nas áreas relativas, e 3-octanol foi o padrão interno.

Os cromatogramas foram inicialmente obtidos no modo TIC (cromatograma de íons totais) a fim de obter os tempos de retenção (t_{R} s) do composto diacetil. Depois de confirmar o tempo de retenção, as análises foram realizadas de acordo com a característica majoritária do íon diacetil m/z 86 (t_{R} = 4,5 min) e o íon m/z 59 para o PI (t_{R} = 22,2 min). O espectrômetro de massa foi operado no modo impacto elétron (EI) 70 ev.

A Tabela 3 indica as referências utilizadas para as comparações dos índices de retenção dos compostos encontrados na cerveja, utilizando o NIST, e referenciando sempre com autores que utilizaram a coluna DB-Wax.

Tabela 3. Índices de retenção encontrados na literatura para a coluna DB-Wax dos compostos presentes na cerveja com e sem enzima ALDC.

Compostos	Cerveja com e sem enzima	
	Índice de retenção (IR)	Referência
Etanol	941	<u>Gurbuz O., Rouseff J.M., et al., 2006</u>
Isobutanol	1107	Escudero e Etiévant, 1999
Álcool isopentil	1121	<u>Botelho, Caldeira, et al., 2007</u>
Isopentanol	1217	<u>Botelho, Caldeira, et al., 2007</u>
Etil octanoato	1436	<u>Gurbuz O., Rouseff J.M., et al., 2006</u>
Etil nanoato	1533	<u>Fan and Qian, 2006, 2</u>
Linalol	1547	<u>Cho, Namgung, et al., 2008</u>
Etil éster	1635	<u>Selli, Canbas, et al., 2006</u>
Ácido octanóico	1657	<u>Zhao, Xu, et al., 2009</u>
Etil éster	1680	<u>Zhao, Xu, et al., 2009</u>
Ácido acético	1791	<u>Osorio, Alarcon, et al., 2006</u>
Etil dodecanoato	1849	Frohlich e Schreier, 1990
Geraniol	1830	<u>Varming, Andersen, et al., 2006</u>
Etil hexanoato	1227	<u>Osório, Alarcon et al., 2006</u>
Diacetil	645	De souza, Maria ,2006
3-octanol	1396	<u>Cho, Namgung, et al., 2008</u>

4.12 Determinação instrumental de cor

Foi realizada a determinada instrumental de cor para ter um parâmetro com relação à similaridade entra as amostras da cerveja com e sem a enzima. Os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* foram obtidos através de um colorímetro CR 400 da marca KONICA MINOLTA, operando no sistema CIELAB, em que L^* corresponde a luminosidade e a^* e b^* são as coordenadas de cromaticidade (+a = vermelho; -a = verde; +b = amarelo; -b = azul). As análises foram realizadas em duplicata. A variação da coloração (ΔE) foi calculada pela Equação 2 (MACDOUGALL, 2002).

$$\Delta E^* = [\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}]^{1/2} \quad (\text{EQ 2})$$

As diferenças de cor são definidas através da comparação da amostra com o padrão. Assim, as diferenças absolutas nas coordenadas de cor entre a amostra e o padrão são indicadas,

e são conhecidas como Deltas (Δ). Os Deltas para L^* (ΔL), a^* (Δa) e b^* (Δb) podem ter valores negativos (-) ou positivos (+). Porém, a variação da coloração, Delta E (ΔE), é sempre positiva.

4.13 Imobilização da enzima ALDC

Para a imobilização, ofereceu-se uma carga em U/g de suporte e calculou-se alguns parâmetros: atividade inicial, atividade remanescente, rendimento de imobilização, atividade teórica e atividade do derivado. O rendimento de imobilização (RI) foi calculado pela diferença entre atividade inicial e atividade remanescente, dividido pela atividade inicial e depois multiplicou-se por 100. A atividade teórica foi calculada multiplicando-se o rendimento pela carga oferecida (SILVA, *et al.*, 2012).

4.13.1 Preparo e modificação dos suportes usado na imobilização da enzima

O Carboximetil Sepharose Fast Flow (CM), Sulfopropil (SP) e DEAE agarose foram obtidos comercialmente da GE Healthcare Bio-Sciences. Os suportes foram lavados abundantemente com água destilada e depois foram secados por filtração a vácuo.

O suporte Monoaminoetil-N-etil-agarose (MANAE-agarose) foi preparado de acordo com a metodologia de Fernandez-Lafuente *et al.* (1998). Pesou-se o glioxil agarose 6 BCL (1 g) e adicionou-se 10 mL de etilenodiamina, agitou-se durante 2 h. Em seguida, foi filtrado e reduzido com 10 mg/mL de boridreto de sódio sob agitação durante 2 h. Após esse tempo, foi filtrado e lavado com tampão acetato de sódio 0.1 M a pH 4.0 e depois lavado com tampão borato de sódio 0.1 M a pH 10.0. Por fim, lavou-se com água destilada.

Obteve-se o suporte MANAE-glutaraldeído através da ativação dos grupamentos amino do MANAE seguindo a metodologia de Fernández-Lafuente *et al.* (1993). Para cada 20 g de MANAE utilizado, foram adicionados 22,4 mL de tampão fosfato 0.2 M, pH 7.0 e 33.6 mL de glutaraldeído. Agitou-se durante 12-14 horas e depois lavou-se com água destilada.

4.13.2 Imobilização da ALDC nos suportes

Para a imobilização, utilizaram-se 6 g de cada um dos seguintes suportes: CM, DEAE, SP, MANAE e MAN-GLUT, os quais foram suspensos em 60 mL de solução enzimática (extrato obtido da fermentação + tampão MES 50 mM), pH 7.0. A concentração inicial de enzima foi de 1,68 U/mL, o pH e a temperatura de imobilização foram de 7.0 e 25 °C, respectivamente. A mistura foi mantida sob agitação durante 1 hora na mesma temperatura.

A atividade enzimática e a quantidade de proteína foram determinadas. A quantificação da proteína foi feita pela metodologia de Bradford (1976) em espectrofotômetro a 595 nm.

Para outra estratégia de imobilização, a enzima imobilizada foi incubada seguindo a metodologia de Fernández-Lafuente *et al.* (1995) e Guisà *et al.* (1997) com trealose (20% v/v) ou glutaraldeído (5% v/v) a 25 °C por 1 h, sob leve agitação. A suspensão foi então filtrada e lavada com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7.0 para remover o excesso do agente de reticulação.

4.14 Determinação do pH e temperatura ótimos da enzima ALDC

O efeito do pH na atividade enzimática foi avaliado a 25 °C. Para isso, uma amostra de enzima solúvel ou imobilizada foi incubada em tampão 50 mM: acetato pH 5, tampão MES pH 6 e tampão bicarbonato de sódio pH 9 e 10. Para investigar o efeito da temperatura, as reações foram realizadas em tampão MES 50 mM (pH 7.0) a 16, 20, 30, 37, 40 e 45 °C, sendo o tempo de contato de 20 min.

4.15 Medida de estabilidade com pH e temperatura da enzima ALDC

A enzima ALDC livre e imobilizada foram incubadas em tampão MES 50 mM (pH 7.0) a 45 °C e 50 °C. As amostras foram retiradas após 1, 2, 3 e 4 horas de incubação e medidas quanto a sua atividade residual, produção de acetoína, como no tópico 4.4. A atividade inicial foi considerada 100%. A desativação e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foram calculadas para cada derivado de acordo com o modelo de Sadana e Henley (1987), utilizando o programa Origin versão 8.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados preliminares

Com o objetivo de encontrar as melhores condições de produção da enzima ALDC de *Bacillus subtilis*, e maiores valores de atividade enzimática, foram realizados alguns experimentos de coeficiente de transferência de oxigênio e efeito da idade do pré-inóculo e inóculo.

5.1.1. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La})

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) foi calculado e as condições de aeração diminuíram a relação do volume do meio (V_m) com o volume dos frascos

($V_f = 150$ mL) de 0.6 para 0.2. Portanto, os valores de k_{LA} aumentaram com a diminuição de V_m .

A Figura 9 apresenta a atividade do *B. subtilis* em três valores diferentes de k_{LA} . Em 6 h, todos os valores estavam próximos, mas entre 20-24 h (tempo final de fermentação), a maior atividade ficou em torno de 0,27 U/mL no processo com k_{LA} de 48.08 h^{-1} .

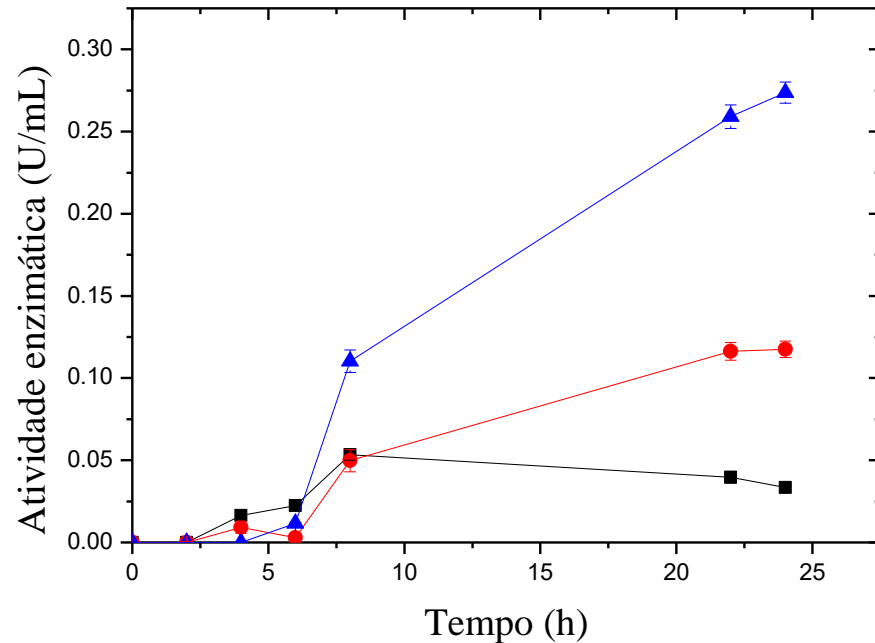
Observou-se que para a produção desta enzima, quanto menos oxigênio fornecido, maior a atividade, e quando se aumentou o oxigênio a atividade foi bem menor no fim da fermentação, ou seja, quanto mais meio fermentativo presente nos Erlenmeyers, para os volumes avaliados de 50, 100 e 150 mL, maior é atividade da enzima. Isso pode ser devido à velocidade de transferência de oxigênio para o meio de cultura: tendo área superficial maior, é também maior a transferência, e quanto menor o volume de meio no Erlenmeyer menor o consumo de oxigênio pela cultura.

Assim, Erlenmeyers com volume de meio maior são menos aerados do que os de mesmo tamanho, nas mesmas condições de temperatura e agitação, mas com menor volume de meio. Então, pode-se afirmar que existe uma relação inversa entre a produção da enzima de *Bacillus subtilis* ICA 56 utilizado nesta pesquisa, e a disponibilidade de oxigênio.

Vale ressaltar que isso não indica que o oxigênio é prejudicial ao crescimento do microrganismo (STANIER *et al.*, 1987), pois para a produção de diferentes produtos podem exigir diferentes condições de trabalho.

Figura 9. Atividade enzimática de ALDC proveniente de *Bacillus subtilis* ICA 56 com o tempo a três valores k_{La} diferentes a 37 °C e 150 rpm: (■) $k_{La} = 119.85 h^{-1}$ (volume de meio de 50

mL), (●) $kLa = 67.40 \text{ h}^{-1}$ (volume de meio de 100 mL) e (▲) $kLa = 48.08 \text{ h}^{-1}$ (volume de meio de 150 mL).



Fonte: Autor, 2019.

5.1.2 Efeito da idade do inóculo na produção da ALDC

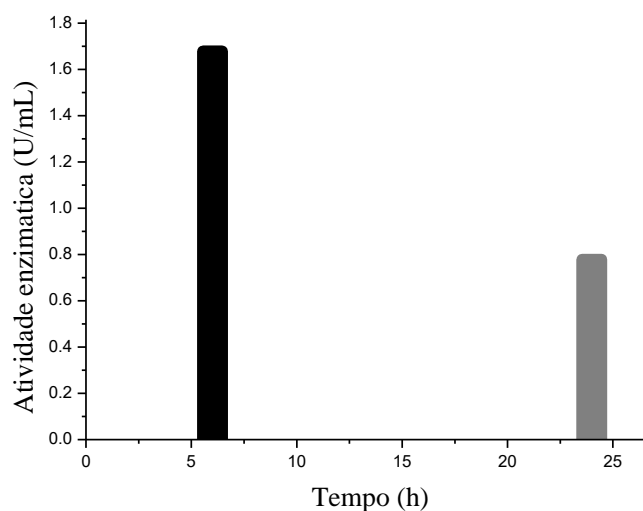
O efeito da idade do inóculo na produção de ALDC foi investigado e os resultados estão mostrados na Figura 10. Os melhores resultados de atividade enzimática (1,68 U/mL) foram obtidos em 6 horas de crescimento do microrganismo, enquanto que em 24 horas, a atividade observada apresentou valor de 0,78 U/mL. Resultados similares foram obtidos por Carvalho *et al.* (2007) estudando *Bacillus sp.* durante 4-12 horas, os autores observaram que a enzima mostrava melhores resultados, e que após 12 horas de crescimento do inóculo, havia redução de atividade.

O crescimento dos cultivos foi monitorado e medido a densidade ótica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro. Posteriormente foi feita a contagem de células viáveis em placa, pela técnica spread plate, nos tempos de 6 e 24 horas.

A densidade ótica em 6 horas teve valor de aproximadamente 0,6 e a contagem de células foi de $4,5 \times 10^4$ UFC/mL, enquanto que em 24 horas a densidade ótica foi superior a 1 e a contagem de viáveis foi de $1,18 \times 10^4$ UFC/mL. A densidade ótica mede células vivas e mortas e por isso observou-se um valor maior em 24 horas, já para a contagem em placa o valor

foi maior em 6 horas porque esta técnica conta as colônias viáveis, indicando que em 24 horas já tem menos células viáveis que no tempo de 6 horas.

Figura 10. Influência da idade do inóculo na produção da ALDC por *Bacillus subtilis* ICA 56 a 37 °C e 150 rpm durante 6h (■) e durante 24 horas de incubação (■).



Fonte: Autor, 2019.

A partir destes resultados preliminares, escolheu-se produzir a enzima ALDC em com pouca disponibilidade de oxigênio, tempo de pré-inóculo de 6 horas e tempo de fermentação de 24 horas, sendo realizadas as análises em shaker com a temperatura de 37 °C a 150 rpm.

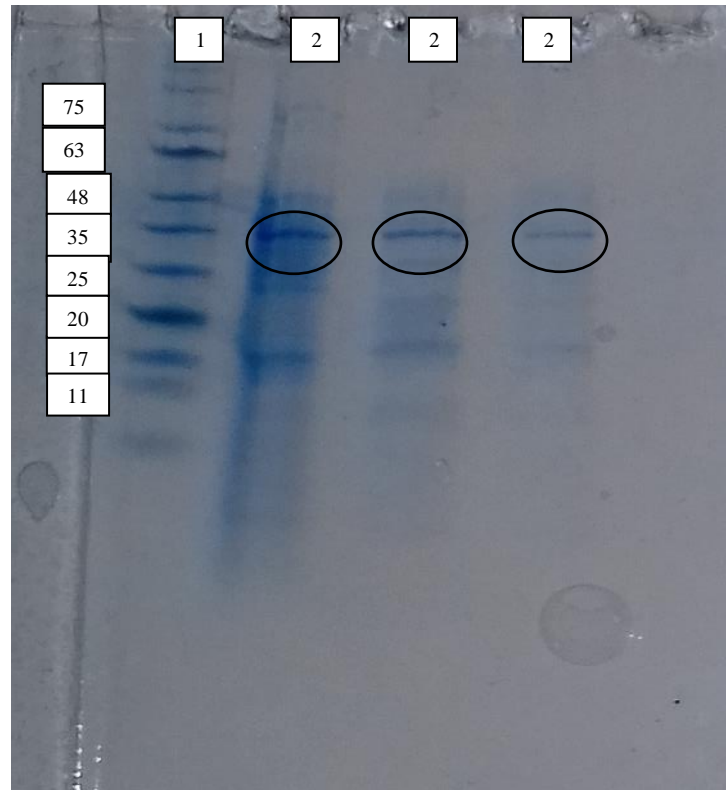
5.2 Caracterização da ALDC e aplicação na produção de cerveja artesanal

5.2.1. Caracterização enzimática

O peso molecular da α -acetolactato descarboxilase (ALDC) foi estimado sob condições desnaturantes usando gel de SDS, utilizando-se um marcador de baixo peso molecular.

De acordo com a Figura 11, o peso molecular da enzima é 43 kDa, o que é similar aos valores encontrados na literatura, por exemplo: o peso molecular ALDC de *Lactobacillus casei* é de 47 kDa (PHALIP *et al.*, 1994), *Brevi bacterimim acetylicum* é 31 kDa (OHSHIRO, *et al.*, 1989), de *Enterobacter aerogenes* é 29 kDa (KIRIN BREWERY, 1985) e de *Lactobacillus casei* é 48 kDa (RAMUSSEN, *et al.*, 1985).

Figura 11. SDS-PAGE da enzima ALDC. 1-marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare LifeSciences); 2- Peso molecular da enzima ALDC.

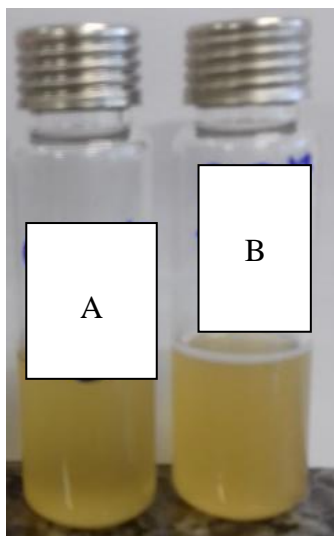


Fonte: Autor, 2019.

5.2.2 Determinação do diacetil

Foi descrito um método para comparação entre as amostras de cerveja com e sem a utilização da enzima ALDC (Figura 12) para avaliar sobre a capacidade da enzima em eliminar o composto diacetil. Para isso, testou-se a curva tanto no solvente como na matriz (cerveja), porém a validação não foi realizada porque desejava-se apenas uma comparação entre a cerveja sem e com utilização da enzima ALDC.

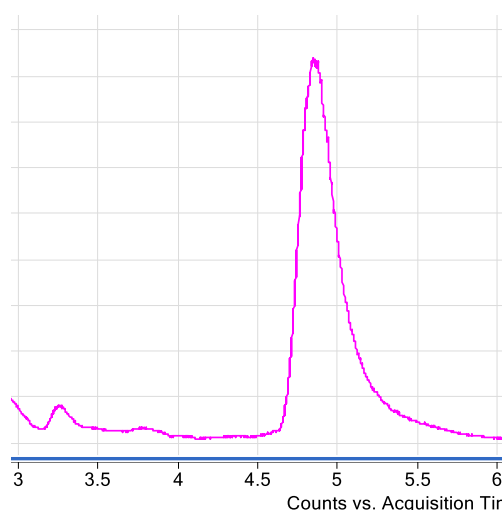
Figura 12. Amostras da cerveja produzida com enzima ALDC produzida por *B. subtilis* ICA 56 (A) e sem enzima (B) após 8 dias de maturação (20 °C) para injeção em CG-MS.



Fonte: Autor, 2019.

Além disso, para fazer a curva na matriz, seria necessário adquirir cervejas comerciais sem diacetil e não seria possível porque o composto está presente em todas as cervejas mesmo em pequena quantidade, como pode ser visto na Figura 13. Assim, escolheu-se uma cerveja comercial de alta qualidade para realização dos testes.

Figura 13. Cromatograma do íon extraído (EIC) do composto diacetil ($m/z = 86$) proveniente da cerveja comercial.



Fonte: Autor, 2019.

Foi utilizada uma planilha eletrônica desenvolvida por Basílio *et al.*(2012) para tornar os dados da curva no solvente mais robustos, e avaliou-se: presença de valores extremos,

teste de normalidade, teste de auto correlação dos resíduos e teste de significância da regressão e desvio de linearidade.

A presença de valores extremos foi calculada sendo excluídos dois pontos da curva analítica, ou seja, 22,2% do total de dados iniciais. Os dados excluídos pertenciam ao quinto e sexto níveis de concentração. A Tabela 4 apresenta a curva final após a avaliação dos valores extremos.

Tabela 4. Dados para montar a curva analítica final após o tratamento de valores extremos.

Nível (K)	I	Concentração (ppb)	Resposta Área
1	01	1	0,0024393
1	02	1	0,002539
1	03	1	0,002499
2	04	25	0,0087553
2	05	25	0,008701
2	06	25	0,0087976
3	07	50	0,0154228
3	08	50	0,015736
3	09	50	0,0152098
4	10	100	0,0282066
4	11	100	0,0288654
4	12	100	0,028987
5	13	125	0,0348499
5	14	125	0,034109*
5	15	125	0,034912
6	16	150	0,0389064*
6	17	150	0,0391064*
6	18	150	0,0377654*

* Estes valores representam os dados excluídos na avaliação da presença de valores extremos.

Fonte: Autor, 2019.

Apesar de estarem presentes na planilha estes dados não são utilizados para as avaliações realizadas. Também avaliou-se a normalidade dos resíduos da regressão da curva analítica e os resultados obtidos foram Req (coeficiente de correlação entre e_i e q_i) sendo de

0,9532 e R_{crit} (R crítico) de 0,9551. O valor de R_{eq} encontrado, maior que o valor crítico R_{crit} ($\alpha=0,05$) sugere que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal.

Em relação a auto correlação dos resíduos, Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para os limites d_L (inferior) e d_U (superior) com um nível de significância de 0,05. O valor calculado para a estatística d do teste é maior que o limite superior, indicando a independência dos resíduos.

Tabela 5. Resultados dos testes de auto correlação.

D	Limites	
	d_L	d_U
1,959	1,046	1,349

d , estatística d ; d_L , limite inferior; d_U , limite superior.

Fonte: Autor, 2019.

O último parâmetro para a curva avaliado foi teste de significância da regressão e desvio da linearidade. Realizou-se o teste utilizando a análise de variância - ANOVA. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos. O valor de p calculado para regressão é inferior a 0,001 indicando que a regressão é significativa. O valor de p calculado para a falta de ajuste, ou desvio de linearidade, é superior a 0,05 indicando que a falta de ajuste não é significativa.

Tabela 6. Resultados da Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	P
Regressão	1	$1,89 \times 10^{-3}$	$1,89 \times 10^{-3}$	$3,23 \times 10^4$	$5,89 \times 10^{-22}$
Resíduos	12	$7,02 \times 10^{-7}$	$5,85 \times 10^{-8}$		
Desvio da Linearidade	4	$1,98 \times 10^{-7}$	$4,94 \times 10^{-8}$	$7,84 \times 10^{-1}$	$5,66 \times 10^{-1}$
Erro puro	8	$5,04 \times 10^{-7}$	$6,30 \times 10^{-8}$		
Total	13	$1,89 \times 10^{-3}$			

GL, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; QM, média dos quadrados; F, estatística da análise de variância; p , significância.

Fonte: Autor, 2019.

A escolha da fibra é de fundamental importância para otimização da extração por SPME para determinar a natureza química dos analitos extraídos (RODRIGUES *et al.*, 2008). No caso da extração de compostos na cerveja, pesquisou-se qual fibra tem alta eficiência de extração dos compostos e por isso, utilizou-se a fibra DVB/CAR/PDMS. Além disso, esta fibra tem uma gama mais ampla para reter compostos voláteis, presentes em alta quantidade na cerveja.

As análises de identificação de voláteis pelo CG-MS foram feitas para avaliar as diferenças entre as duas colunas com base na composição base na matriz para amostra de cerveja tendo como foco o componente alvo diacetil, que só foi possível na coluna BD-Wax utilizando amostra *in natura* sem nenhum pré-tratamento antes da injeção da amostra.

Na Tabela 7 pode-se observar os tempos de retenção e a área de cada composto identificado. Foram usadas duas colunas de diferentes polaridades, sendo a DB-Wax uma coluna de alta polaridade e a HP5-MS uma coluna não polar. Charry-Parra *et al.* (2011) estudaram a otimização dos compostos voláteis em cerveja e também escolheram a fibra DVB/CAR/PDMS. Os autores encontraram 9 compostos, sendo alguns deles, os mesmos encontrados neste estudo, como foi o caso do isobutanol e acetato de isoamila. Os compostos encontrados presentes na cerveja e identificados em ambas colunas foram álcoois e ésteres.

Os álcoois superiores são subprodutos formados a partir do metabolismo da levedura, na fermentação por vias catabólicas e anabólicas, e estão associados à assimilação de nitrogênio e ao consumo ou síntese de aminoácidos. Grande parte destes álcoois foram-se a partir dos aminoácidos L-leucina, L-isoleucina e L-valina (CARVALHO, 2005; REINOLD, 1997). Esses álcoois fornecem aroma alcoólico ou de solvente à cerveja, e o álcool feniletílico, pode fornecer aroma de fragrância à cerveja (CARVALHO, 2005).

Já os ésteres são compostos voláteis formados a partir da junção de um ácido orgânico com um álcool, e eles são os que mais influenciam no aroma da cerveja e formados durante a fermentação. A cerveja é composta em média por 20 a 25 mg L⁻¹ de éster (REINOLD, 1997). Os ésteres etílicos de ácidos graxos e acetatos são tidos como mais importantes em bebidas alcoólicas pelo fato de que estão presentes em altas concentrações, e as suas características de aroma são agradáveis. Os ésteres são encontrados em maior quantidade em cervejas do tipo ale, devido a sua temperatura de fermentação ser um pouco mais elevada. Dessa classe de compostos, os tidos como mais importantes da cerveja são o acetato de isoamila, caproato de etila e acetato 2-feniletila (NÓBREGA, 2003; VARNAN e SUTHERLAND, 1997) que foram encontrados na cerveja produzida neste trabalho.

Nem todos os compostos foram identificados em ambas colunas testadas, sendo dois compostos identificados apenas na coluna HP5-MS. Estes compostos encontrados são relatados na literatura por contribuírem para a qualidade de cervejas, conferindo aroma de maçã ou outros aromas frutados (KOBAYASHI *et al.*, 2008; RAVASIO *et al.*, 2014).

Tabela 7. Compostos identificados na cerveja nas colunas HP5-MS e DB-Wax: tempo de retenção, índice de retenção e área (%).

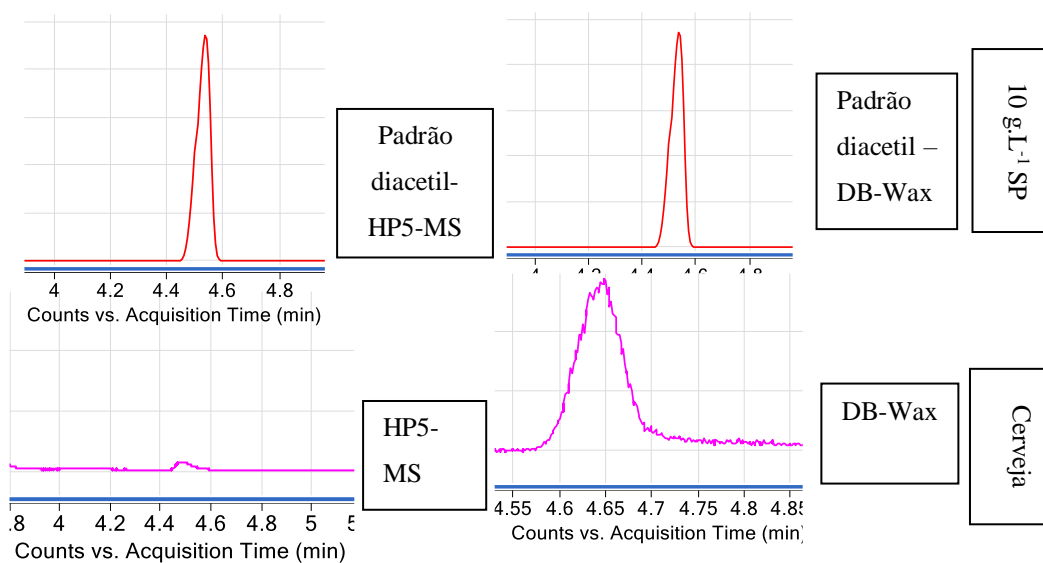
Compostos	Coluna HP5-MS			Coluna DB-Wax		
	Tempo de retenção (min)	Índice de retenção (IR)	Área (%)	Tempo de retenção (min)	Índice de retenção (IR)	Área (%)
Etanol	1,53	448	19,10	4,04	941	11,91
Álcool isoamílico	3,7	736	14,08	15,04	1217	7,55
Diacetil	4,5	596	0,2	4,45	645	0,51
Acetato de isoamila	6,18	876	4,77	10,47	1121	2,91
Caproato de etila	9,57	996	2,75	15,69	1227	2,10
Isobutanol	-	-	-	9,86	1107	0,93
Caprilato de etila	15,43	1196	19	23,59	1436	21,40
Nonanoato de etila	18,10	1294	0,29	26,64	1533	0,26
Linalol	12,54	1101	0,2	27,03	1547	0,91
Metil caprilato	-	-	-	21,69	1378	0,39
Ácido octanóico	21,98	1450	0,19	30,37	1657	0,76
Butanoato de hexil	-	-	-	22,64	1410	0,23
Dodecanoato de etila	25,52	1597	1,77	35,46	1635	6,91
1-octanol	-	-	-	27,38	1558	0,6
Álcool fenil etílico	13,07	1114	1,03	37,08	1901	11,78
3-octanol	14,35	995	0,73	22,10	1396	1,08
Hexanoato de etila	26,91	1645	0,4	-	-	-
Caprato de metila	-	-	-	28,41	1586	0,62
Caprato de etila	-	-	-	29,85	1635	6,91
Octanoato de etila	31,05	1854	0,26	-	-	-
Metil 4-decenoato	-	-	-	31,27	1680	2,93
Geraniol	-	-	-	35,54	1830	0,6
Ácido octanóico	-	-	-	40,79	2050	3,99
4-vinil guaiacol	-	-	-	43,72	2181	0,44
Ácido decanóico	-	-	-	45,82	2275	0,41

Fonte: Autor, 2019.

Ao analisar o perfil de compostos identificados apenas na coluna DB-Wax, observou-se uma gama maior de compostos, inclusive sendo possível identificar outra classe de compostos que estão presentes na cerveja. Porém, alguns que não são possíveis de serem identificados na coluna HP5-MS: os ácidos. A síntese desses ácidos orgânicos está relacionada com a assimilação de compostos nitrogenados pelas leveduras (ARAÚJO, SILVA e MINIM, 2003). Eles contribuem com *flavors* para a cerveja, e reduzem o pH, e conseqüentemente melhoram a estabilidade microbiológica (ARAÚJO, SILVA e MINIM, 2003; CARVALHO, 2005; REINOLD, 1997).

A Figura 14 representa uma parte dos cromatogramas do padrão de diacetil e das amostras de cerveja nas colunas HP-5MS e DB-Wax. Devido à relevante intensidade do sinal do etanol no cromatograma, a identificação do diacetil foi conduzida via modo EIC (cromatograma do íon extraído), fixando a faixa de massas entre 50 – 150 m/z, eliminando a presença do etanol. Ao realizar a identificação do diacetil nas amostras, foi feito o EIC para este composto, fixando o m/z em 86, e constatou-se melhor separação e menor co-eluição com outros componentes na coluna polar (DB-Wax), não tendo um pico bem definido na coluna HP-5MS. Diante dos resultados, optou-se pela escolha da coluna polar com vistas à quantificação do diacetil.

Figura 14. Cromatograma do íon extraído (EIC) da solução padrão de 10 g.L⁻¹ de diacetil usada para gerar a matriz de calibração e EIC das amostras da cerveja produzida, ambos identificados nas colunas HP5-MS e na DB-Wax. DC – diacetil; SP solução padrão.



Fonte: Autor, 2019.

5.2.3 Determinação dos parâmetros nas cervejas com e sem enzima ALDC

Os principais parâmetros da cerveja são a densidade, a cor, o amargor e a quantidade final de álcool e, como mostrado na Figura 15, o software Beer Smith tem uma escala de estimativa de cada um destes parâmetros. Assim, com a adição dos ingredientes da cerveja com suas respectivas quantidades, esta escala vai mostrando uma estimativa do perfil final da cerveja.

A cor é um dos principais parâmetros que influencia na aquisição de um produto e, portanto, realizar análises que mensurem suas possíveis alterações relacionadas a esse quesito se tornam fundamentais. Na Tabela 8 pode ser visualizado os dados referentes à análise de cor da cerveja produzida sem e com a adição da enzima.

Tabela 8. Resultados obtidos na análise de variação de cor das cervejas produzidas com adição e sem adição da enzima ALDC.

	L*	a*	b*
Cerveja sem enzima	78,65 ± 0,12 ^a	-0,52 ± 0,05 ^a	10,46 ± 0,11 ^a
Cerveja com enzima	79,32 ± 0,09 ^a	-0,65 ± 0,16 ^a	10,10 ± 0,18 ^a

Fonte: Autor, 2019.

A luminosidade representa uma coordenada do espaço de cores que pode variar do 0 ao 100, ou seja, do preto ao branco (LAWLESS e HEYMANN, 1999), assim pelos resultados nota-se que a amostra de cerveja sem enzima não apresenta diferença significativa de cor em relação a cerveja com enzima.

Em relação aos parâmetros a* e b*, observa-se que os parâmetros de a* foram negativos (que corresponde a cor verde) e os valores de b* foram positivos (amarelo) em ambas amostras de cerveja com e sem a ALDC.

O ΔE calculado foi de 0,79, este valor representa a diferença total de cor entre as duas cervejas. Esta é uma função de cor calculada através dos valores de L*, a* e b* tendo por base um valor de referência, que neste trabalho, foi a cerveja sem a enzima.

O software (Figura 15) permite escolher o estilo de cerveja a ser criado e o mesmo adequará a escala para o estilo selecionado, variando de acordo com os ingredientes e quantidades. A escala basicamente funciona da seguinte maneira: ao adicionar todos os ingredientes da receita, observa-se a variação da escala de cor, que possui as cores vermelha, amarela e verde, sendo o ideal que cada um dos parâmetros de cor, densidade, amargor e

quantidade de álcool esteja na faixa verde para que se encaixe no estilo e esteja mais próximo da estimativa do produto final.

O programa também permite estimar densidade pré e pós fervura, tendo assim uma base na hora da prática da produção, no programa a densidade pré fervura é de 1037 e para a cerveja produzida foi de 1039, bem próximo ao estimado. A densidade pós fervura foi de 1015 também próximo ao estimado pelo Beer Smith que tinha densidade de 1010. Caso os valores de densidade não estivessem como esperado, seria necessário fazer ajustes de adição de água ou mais tempo de fervura, dependendo do caso.

Figura 15. Software Beer Smith no desenvolvimento da receita da cerveja Kölsch com os ajustes para equipamento utilizado de 10 L.

The screenshot shows the Beer Smith software interface for developing a recipe. The main window is titled 'Kolsch 15.11'. Key fields include:

- Nome: Kolsch 15.11
- Tipo: 100% Grão
- Tempo de Fervura: 60 min
- Data: 10/18/2017
- Cervejeiro: Marcia
- Tamanho do Lote: 12.00
- Volume Estimado Pré-Fervura: 14.37
- Versão: 1.0
- Equipamento: Marcia
- Eficiência Total: 70.00 %
- Eficiência Estimada Mostura: 70.00 %

 A table lists ingredients:

Qtd	Nome	Tipo	#	%/IBU	Inventário	Custo
7.00 g	Columbus (Tomahawk) [12.20 %] - First Wor...	Lúpulo	4	22.3 IBUs	0.00 g	R\$0.25
0.10 kg	Caramel/Crystal Malt - 20L (24.0 EBC)	Grão	3	4.1 %	0.00 kg	R\$0.28
0.25 kg	Oats, Flaked (2.0 EBC)	Grão	2	10.2 %	0.00 kg	R\$0.71
2.10 kg	Soufflet Pilsner (2 Row) Ger (3.5 EBC)	Grão	1	85.7 %	0.00 kg	R\$12.60

 At the bottom, a 'Comparação com Guia de Estilos' section shows a bar chart for 'Kölsch' style with values:

- Densidade Inicial Estimada: 1.044 SG (target 1.044-1.050 SG)
- Amargor (IBUs): 22.3 IBUs (target 20.0-30.0 IBUs)
- Cor: 7.1 EBC (target 6.9-9.8 EBC)
- ABV Estimado: 4.5 % (target 4.40-5.20 %)

Fonte: Autor, 2019.

5.2.4 Elaboração do rótulo e logomarca para a cerveja produzida

Como principal veículo de comunicação entre a cerveja e o consumidor, tem-se a logo e o rótulo, muitas vezes a embalagem é a decisão final de compra do produto. Por isso, desenvolveu-se o rótulo e a logomarca da cerveja (Figura 16).

No rótulo deve conter elementos específicos a fim de atender a legislação, como a descrição da cerveja, quantidade, estimativa de cor (1-40, sendo 1 a mais clara e 40 a cerveja preta), amargor (medido em IBU variando de 1-100, em que 1 é menos amarga e 100 mais

amarga), deve conter a quantidade de álcool, lote, validade e data de fabricação. Elementos opcionais são sugestão de harmonização, temperatura ideal de serviço e tipo de copo.

Figura 16. Logomarca e rótulo desenvolvidos durante a produção da tese.



Fonte: Autor, 2019.

5.2.5 Perfil da cervejas com e sem enzima ALDC com relação a quantidade de diacetil presente

O tempo total de preparação da cerveja sem a utilização da enzima foi de 16 dias, sendo 8 dias de fermentação primária e 8 dias de maturação, e quando a enzima ALCD foi colocada na cerveja, este tempo diminuiu para 14 dias.

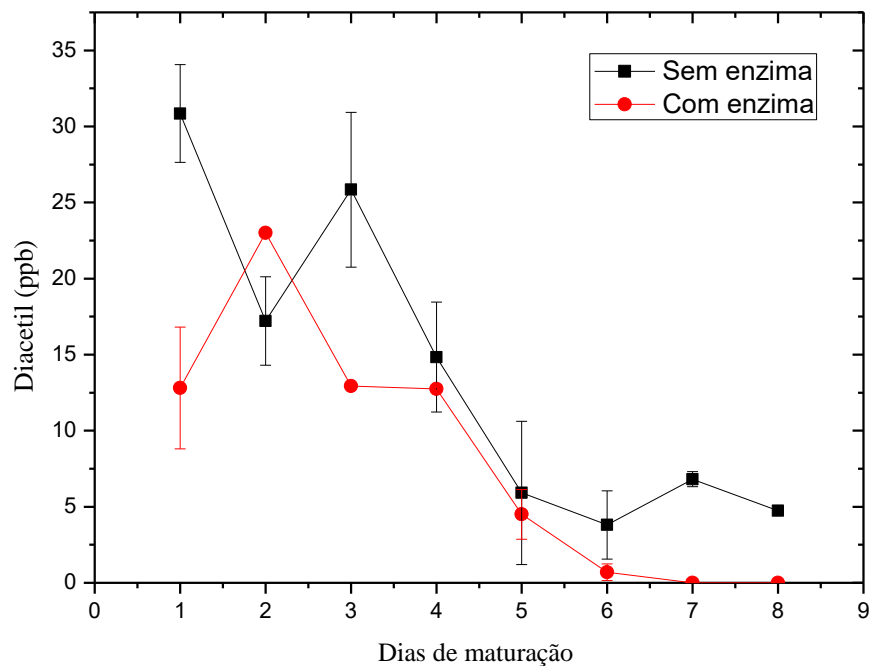
A Figura 17 apresenta o perfil em dias de fermentação da cerveja na presença e na ausência da enzima e a Tabela 9 as diferenças significativas entre as amostras. Nota-se que a enzima foi capaz de reduzir o diacetil até a concentração de 0 ppb em 6 dias, enquanto que a cerveja sem adição de enzima ainda possuía concentração de 5 ppb no 8º dia de maturação. O conteúdo de diacetil é mais baixo no meio contendo a enzima porque ela transforma o acetolacto diretamente em acetoína e não produz diacetil.

Resultados semelhantes foram encontrados por Bonciu e Stoicescu (2007) em que obtiveram ao final da fermentação 27,90 ppb de diacetil sem enzima e 9,10 ppb com a enzima.

Já Choi *et al.* (2015) observaram que a enzima reduziu o diacetil de 5,17 ppm para 1,31 ppm. Houve uma pequena alteração no conteúdo de álcool superiores, em que amostras

contendo a enzima obtiveram concentrações menores que na amostra sem enzima porém, foram pequenas variações corroborando com os resultados de Bonciu e Stoicescu (2007) que investigaram a adição da enzima ALDC em um meio sintético de cerveja e observaram que o aroma não foi alterado significativamente.

Figura 17. Concentração de diacetil nas amostras de cerveja com e sem enzima α -acetolactato descarboxilase durante 8 dias de fermentação a 20 °C.



Fonte: Autor, 2019.

Tabela 9. Concentração de diacetil na cerveja nos dias 5, 6, 7 e 8 de maturação com e sem a utilização da enzima α -acetolactato descarboxilase.

Dias	Sem enzima ALDC (ppb)	Com enzima ALDC (ppb)
5	6,89 ± 1,32 ^a	3,31 ± 1,58 ^a
6	3,83 ± 1,50 ^a	0,5 ± 0,09 ^a
7	5,17 ± 1,27 ^a	0,03 ± 1,50 ^b
8	4,77 ± 0,08 ^a	0,001 ± 0,005 ^b

Fonte: Autor, 2019.

Analisando a varredura completa das amostras descritas na Tabela 10, percebe-se que a maioria dos compostos identificados são ésteres e álcoois, comumente encontrados em cerveja, contribuindo para o devido *flavor* (ETIEVANT, 1991). Os ésteres e álcoois superiores são normalmente os grupos em maior abundância e considerados desejáveis nas bebidas alcoólicas (NÓBREGA, 2003). As concentrações dos compostos devem ser equilibradas, principalmente dos compostos indesejáveis, como é o caso do diacetil (KOBAYASHI *et al.*, 2008; MOURET *et al.*, 2015).

Também foram encontrados ácidos, como o ácido acético e o octanóico; o acético é produzido pelo fermento durante a fermentação, porém quando estão em altos níveis podem ser produzidos na cerveja pela contaminação da bactéria do ácido acético (*Acetobacter* e *Gluconobacter*). O ácido octanóico também é produzido pela levedura durante o condicionamento da cerveja.

A determinação, baseada na área relativa, tendo 3-octanol como padrão interno, mostrou que a quantidade total de voláteis identificados foi maior na cerveja sem a presença da enzima.

Percebeu-se também que a adição da enzima interferiu nos compostos da cerveja, mostrados na Tabela 10, em que 7 compostos que tinham na cerveja inicialmente desapareceram quando enzima foi adicionada, porém, um dos compostos foi o diacetil, que era o composto em estudo e desejava-se reduzir a sua quantidade; outros compostos que desapareceram com adição da enzima foram o 4-vinil guaiacol e o ácido butírico, que são considerados *off flavors* na cerveja.

O 4 vinil guaiacol possui aroma e sabor comumente comparado com o *band-aid*, armário de remédios ou desinfetante (REITENBACH, 2016).

Os clorofenóis são membros particularmente ofensivos desta família e possuem sabores associados a água sanitária. O ácido butírico é um ácido graxo que possui características de mofo, picante, gorduroso e odor rançoso que são descritos como aroma caprílico (CLAPPERTON, 1978).

Tabela 10. Perfil total dos compostos presentes em ambas cervejas produzidas com e sem a utilização da ALDC, com base no tempo de retenção, índice de retenção (IR) e área em porcentagem.

Compostos	Coluna HP5-MS			Coluna DB-Wax		
	Tempo de retenção (min)	Índice de retenção (IR)	Área (%)	Tempo de retenção (min)	Índice de retenção (IR)	Área (%)
Etanol	4.04	941	11.91 ± 1.30	4.09	946	11.43 ± 0.03
Diacetil	4.5	<900	0.5 ± 0.02	-	-	-
Isobutanol	9.86	1107	0.93 ± 0.06	9.83	1107	0.76 ± 0.07
Álcool isopentil	10.47	1121	2.91 ± 0.75	10.44	1121	3.79 ± 0.16
Isopentanol	15.04	1217	7.55 ± 1.10	14.9	1205	6.47 ± 1.4
Etil hexanoato	15.69	1227	2.10 ± 0.30	15.71	1227	5.4 ± 0.9
Metil caprilato	21.69	1378	0.39 ± 0.03	-	-	-
Ácido butírico	22.64	1410	0.23 ± 0.09	-	-	-
Etil octanoato	23.59	1436	21.40 ± 1.54	23.64	1436	10.54 ± 0.18
Etil nonanoato	26.64	1533	0.26 ± 0.07	26.62	1533	1.21 ± 0.6
Linalol	27.03	1547	0.91 ± 0.04	26.99	1547	1.02 ± 0.4
1-octanol	27.38	1558	0.6 ± 0.2	-	-	-
Decacoato de etila	28.41	1586	0.6 ± 0.15	-	-	-
Ácido octanoico	30.37	1657	0.76 ± 0.03	3.31	1657	1.10 ± 0.09
Etil éster	31.27	1680	2.93 ± 0.09	31.29	1680	2.10 ± 0.05
Ácido acético	34.52	1791	5.1 ± 1.43	34.44	1791	1.12 ± 0.4
Etil dodecanoato	35.46	1635	6.91 ± 1.11	35.4	1635	1.65 ± 0.7
Geraniol	35.54	1830	0.6 ± 0.04	35.48	1830	0.48 ± 0.8
β-Hidroxi etil benzeno	37.08	1901	11.78 ± 1.53	37	1901	10.65 ± 0.2
Ácido octanóico	40.79	2050	3.99 ± 0.92	40.72	2050	4.91 ± 0.8
4-vinil guaiacol	43.72	2275	0.41 ± 0.02	-	-	-
Ácido decanóico	45.82	2276	0.06	-	-	-

Fonte: Autor, 2019.

5.2.6 Imobilização da ALDC nos diferentes suportes

Para produzir biocatalisadores ativos e estáveis, a ALDC foi imobilizada em três suportes diferentes, que também foram revestidos com trealose e glutaraldeído. A Tabela 11 mostra os parâmetros de imobilização do ALDC para todas as condições avaliadas. Como resultados gerais, é possível observar que o rendimento da imobilização foi alto (> 90%) para os suportes em que ocorreu a imobilização, e a atividade enzimática manteve-se após a imobilização. Nos suportes carboximetil (CM) e sulfopropil (SP), não houve imobilização.

Tabela 11. Parâmetros de imobilização de derivados de ALDC: atividade oferecida, rendimento de imobilização (RI), Atividade teórica ($At_{teórica}$), Atividade do derivado (At_D).

Biocatalisador	Atividade oferecida (U/g)	RI (%)	$At_{teórica}$ (U/g)	At_D (U/g)
DEAE	14,31±0,9 ^a	95±0,44	13,59 ± 0,32 ^a	0,937 ± 0,09 ^a
MANAE	15,21±0,6 ^{ab}	94±2,66	14,29 ± 0,05 ^b	1,110 ± 0,11 ^b
MAN-GLUT	17,1±0,95 ^b	96±0,66	16,41 ± 0,07 ^c	0,428 ± 0,12 ^c
CM	15,10±0,27 ^{ab}	0	**	**
SP	16,30±0,31 ^{ab}	0	**	**

** Suportes em que não ocorreu imobilização da enzima.

Fonte: Autor, 2019.

Nos suportes aniônicos, DEAE, MANAE e MAN-GLUT, a imobilização ocorreu em 1 hora com aproximadamente 96% de rendimento, enquanto que nos suportes catiônicos (carboximetil e sulfopropil), não foi observada imobilização enzimática. Estes resultados indicam que a enzima tem cargas negativas predominantemente na sua superfície e o PI desta enzima é 4.6 e como o pH de imobilização é 7.0 (acima do PI da enzima) ela ficou carregada negativamente, provavelmente por isso foi possível imobilizar em suportes carregados positivamente.

Após imobilização, foi realizada recobrimento com trealose e glutaraldeído nos suportes em que foi feita a imobilização da enzima (DEAE, MANAE e MAN-GLUT) e os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Atividade enzimática de ALDC nos derivados após a modificação pós-imobilização com trealose e glutaraldeído.

Biocatalisador	At_D (U/g)	Biocatalisador	At_D (U/g)
DEAE + treal	1,459 ± 0,12 ^a	DEAE + glut	1,016 ± 0,10 ^b
MANAE + treal	1,200 ± 0,14 ^{ab}	MANAE + glut	0,118 ± 0,04 ^d
MAN-GLUT + treal	0,540 ± 0,05 ^c	MAN-GLUT + glut	0,395 ± 0,11 ^{cd}

*At_D (Atividade do derivado).

Fonte: Autor, 2019.

O recobrimento com trealose após a imobilização, aumentou os valores de atividade da enzima no derivado provavelmente pelo fato da trealose ser reportada como um agente protetor. Silva (2007) obteve em seus estudos, resultados positivos testando o efeito da adição de trealose sobre a estabilidade térmica da enzima glucoamilase, em que aumentou a atividade residual de 25 para 80% em 50 minutos de estabilidade a 60 °C utilizando a enzima imobilizada em suporte DEAE, e em suporte MANAE onde a atividade residual foi de 90% em 50 minutos a 60 °C com a presença de trealose 20% enquanto que sem a trealose teve apenas 25% de atividade residual nas mesmas condições.

O glutaraldeído não teve efeito ou foi negativo quando usado no tratamento pós-imobilização, nos suportes MANAE e MANAE-glutaraldeído ele diminuiu a atividade catalítica da molécula.

5.2.7 Efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada

O perfil de pH (5 - 10) na atividade catalítica da enzima livre e imobilizada em diferentes suportes foi analisado em temperatura constante de 25 °C.

Os resultados são apresentados na Figura 12 em termos de atividade relativa (%), assumindo que o maior valor de atividade catalítica, entre todos os pH's testados, de cada derivado ou enzima livre é apresentado como 100%. Assim, buscou-se fazer a padronização da quantidade de proteína em 4 mg/g de suporte durante a imobilização.

As Figuras 12 A, B e C mostram a influência do pH a uma temperatura constante de 25 °C para a enzima livre e imobilizada nos suportes DEAE, MANAE e MANAE-GLUTARALDEÍDO, respectivamente.

A enzima livre apresentou maior atividade em pH 6, fato esperado devido a medida de atividade ser realizada neste pH. Lian *et al.*(2014), e Loken e Stormer (1970) encontraram

resultados semelhantes estudando a mesma enzima ALDC, sendo o melhor pH 5 na enzima livre de *Aspergillus oryzae* e *Aerobater aerogenes*, respectivamente. No presente trabalho, a ALDC apresentou baixa atividade no pH 10.0 e o mesmo ocorreu com a imobilização em suporte MANAE revestido com trealose e suporte MANAE-GLUT revestido com trealose e glutaraldeído.

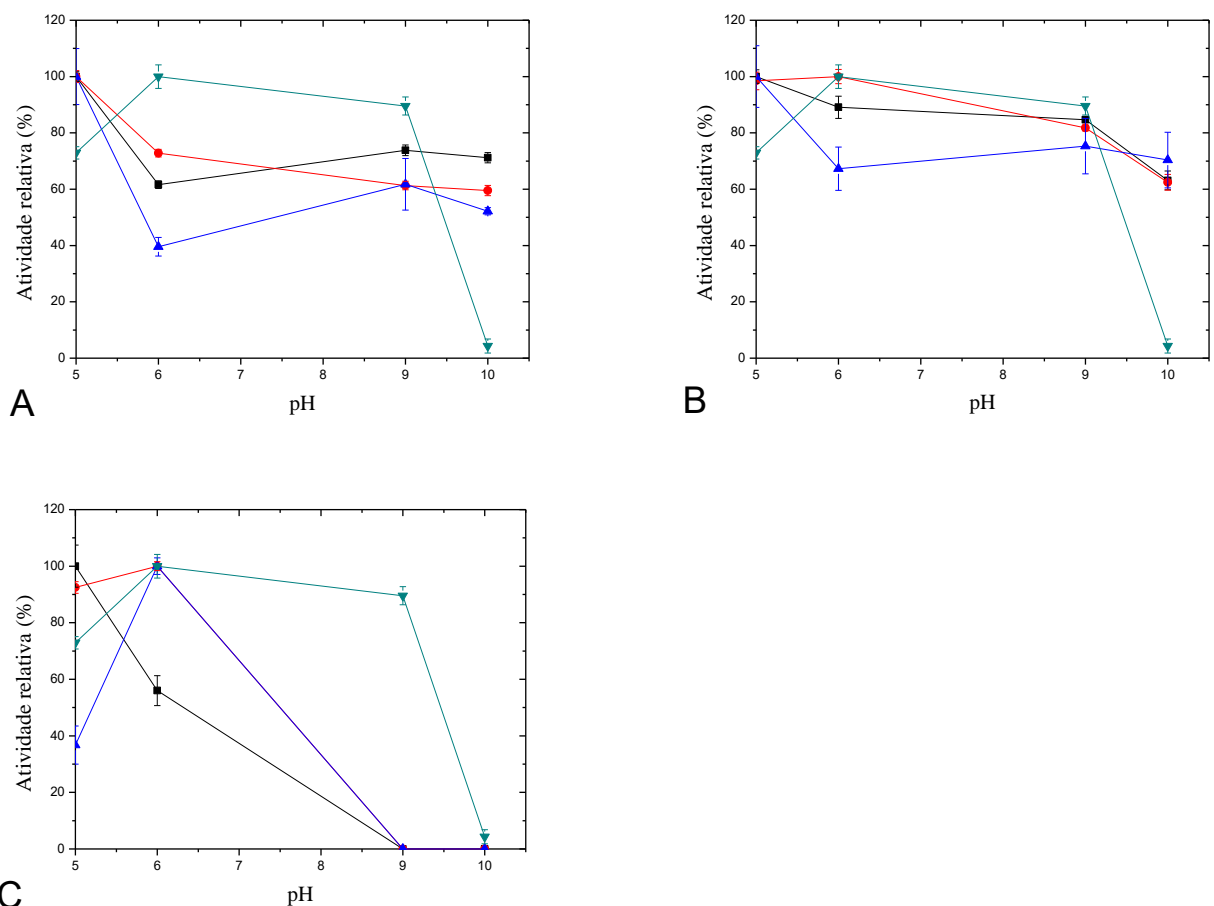
Na enzima imobilizada em suporte DEAE (Figura 18 A), o pH ótimo foi deslocado para 5.0, próximo ao da enzima livre (pH 6.0). Fato similar constatado por Wang *et al.* (2013) ao estudarem o efeito do pH utilizando *Gluconobacter oxydans* DM2003 e Costeli (2005) usando *Bacillus polymyxa* para produção de acetoína.

A intensidade do deslocamento é uma diferença em relação ao perfil de pH da enzima livre, desde que não haja outros efeitos, como consequência da imobilização. Nos suportes catiônicos há deslocamento para esquerda e, no caso de suportes aniônicos para direita (ILLANES, 1983). Neste caso, a enzima imobilizada no suporte de DEAE deslocou o pH para a direita e sendo um suporte aniônico, está de acordo com o que foi citado anteriormente.

Quando a enzima foi imobilizada em MANAE, apresentado na Figura 18 B, a atividade ótima de pH foi de 5,0 e o mesmo ocorreu quando o suporte foi revestido com glutaraldeído, bem como quando a enzima foi imobilizada em MANAE-GLUT (Figura 18 C).

Os resultados da mudança de pH na atividade enzimática, sugerem que a enzima imobilizada em alguns suportes (DEAE, DEAE + trea, MANAE, MANAE + trea e MANAE-glut) pode ser usada em larga faixa de pH.

Figura 18. Efeito do pH na atividade da ALDC. O efeito do pH foi determinado usando acetato de sódio (pH 5), fosfato de sódio (pH 6), bicarbonato de sódio (pH 9 e 10) a 25 °C para (A) ■ enzima imobilizada em DEAE, e ▲ recoberta com trealose e ● glutaraldeído e ▼ comparada a enzima livre, (B) ■ enzima imobilizada em MANAE e ▲ recoberta com trealose e ● glutaraldeído e ▼ comparada a enzima livre (C) ■ enzima imobilizada em MANAE-GLUTARALDEÍDO e ▲ recoberta com trealose e ▼ glutaraldeído e comparada a enzima livre. DEAE, MAN e MAN-GLUT foram recobertos com trealose (20%), que foi nomeado DEAE+trea, MAN+trea and MAN-GLUT+trea, respectivamente. Glutaraldeído (5%) foi outro agente crosslinking usado na pós-imobilização em DEAE, MAN e MAN-GLUT, nomeados de DEAE+glut, MAN+glut e MAN-GLUT+glut.



Fonte: Autor, 2019.

5.2.8 Efeito do pH na estabilidade da enzima ALDC livre e imobilizada

A estabilidade do pH (5 - 10) da atividade catalítica da enzima livre e imobilizada em diferentes suportes foi analisada nos tempos 0, 1 e 24 horas a 25 °C. A Tabela 13 representa diferentes atividades relativas (%), assumindo que o maior valor de atividade catalítica, entre todos os pH's testados, de cada derivado ou enzima livre é apresentado como 100%. Analisando a estabilidade do pH, observa-se na Tabela 13 que a enzima não é estável em pH 9 e 10, porque quando a enzima livre e imobilizada entra em contato em pH 9 e 10, a atividade diminui rapidamente ou mesmo imediatamente inativando a enzima. Os melhores pHs foram 5 e 6. Resultados similares foram observados por O'Sullivan *et al.* (2001) estudando ALDC de *Leconostoc lactis* (pH = 6.0) e *Lactoacillus casei* (pH = 4.5). Este fato foi importante porque o pH 6 é a atividade ótima do pH desta enzima, e o pH 5 é um pH no qual a enzima pode também tem uma boa atividade enzimática.

Tabela 13. Percentual de atividade mantida em 24h na influência do pH na estabilidade para ALDC livre e imobilizada nos suportes DEAE, MANAE e MANAE-GLUT antes e após o recobrimento em diferentes condições de pH (5, 6, 9, 10).

Biocatalisador	Agente de recobrimento	Atividade residual com 24 horas (%)			
		pH 5	pH 6	pH 9	pH 10
Enzima livre	-	92,8±2,22	53,8±1,46	67±1,51	45,9±0,46
DEAE	-	97,2±1,13	100±0,13	34,9±1,11	0
	Trealose	85,5±3,38	72,3±1,48	30,2±0,64	0
	Glutaraldeído	47,9±1,04	54,2±1,71	0	0
MANAE	-	98,4±1,7	79±3,04	9,3±0,46	32,4±1,26
	Trealose	100±0,06	75±1,68	46,1±1,64	67,2±0,86
	Glutaraldeído	100±0,12	87±2,42	17,9±1,62	0
MAN-GLUT	-	24,9±2,13	59±1,84	49±1,11	23,3±1,51
	Trealose	21,7±0,95	23,9±0,48	26±0,95	0
	Glutaraldeído	55±2,44	45±0,66	0	0

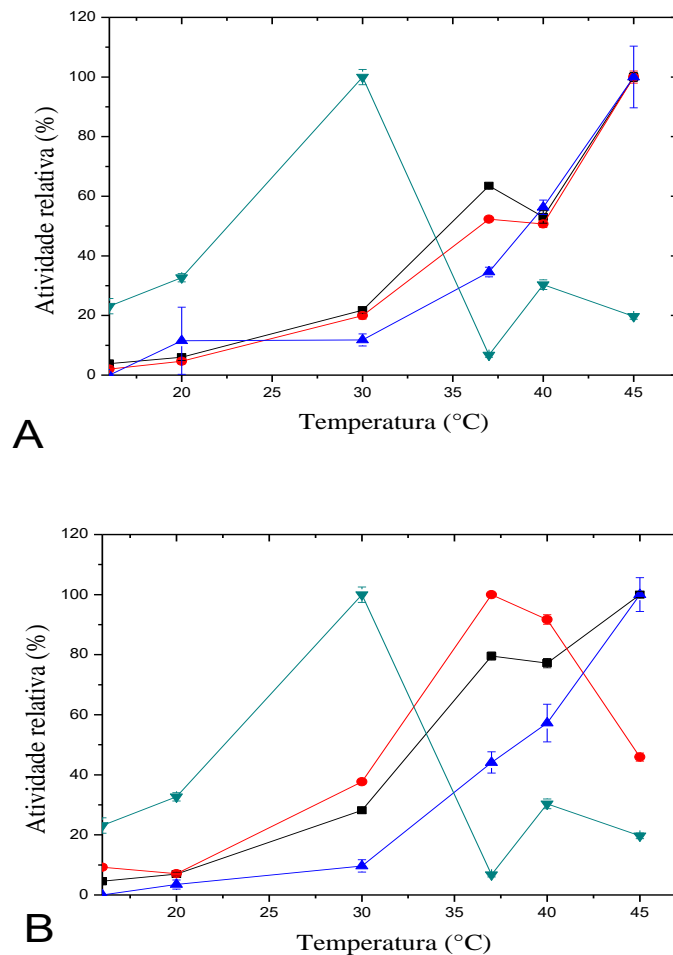
Fonte: Autor, 2019.

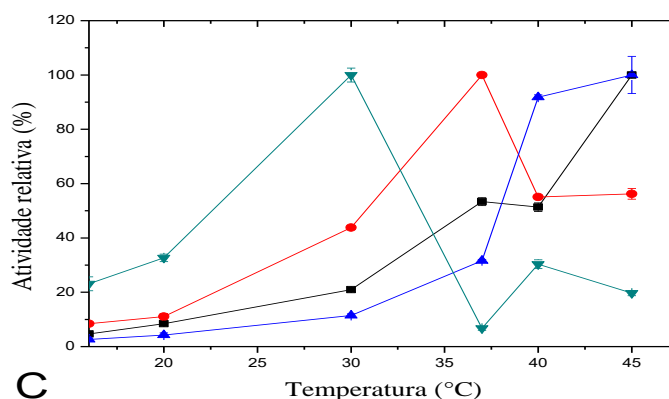
5.2.9 Efeito da temperatura na enzima livre e imobilizada

A Figura 19 representa diferentes derivados em termos de atividade relativa (%), assumindo que o maior valor de atividade catalítica entre todas as temperaturas examinadas, é

apresentado como 100%. A temperatura operacional ótima para a enzima solúvel foi de 30 °C, enquanto que a enzima imobilizada exibiu uma maior atividade em uma faixa de temperatura de 35-45 °C quando comparada com a enzima solúvel. A mudança na temperatura ótima é esperada porque o suporte pode estabilizar a enzima. Os dados mostram, portanto, que a imobilização enzimática torna a enzima mais estável e com isso, pode facilitar o transporte e armazenamento da mesma.

Figura 19. Atividade relativa com o efeito da temperatura para (A) ■ enzima imobilizada em DEAE, e ▲ recoberta com trealose e ● glutaraldeído e ▼ comparada a enzima livre, (B) ■ enzima imobilizada em MANAE e ▲ recoberta com trealose e ● glutaraldeído e ▼ comparada a enzima livre (C) ■ enzima imobilizada em MANAE-GLUTARALDEÍDO e ▲ recoberta com trealose e ● glutaraldeído e ▼ comparada a enzima livre.





Fonte: Autor, 2019.

5.2.10 Estabilidade com a temperatura

A estabilidade com a temperatura foi feita inicialmente a 45 °C durante 0, 1, 2, 3 e 4 h em tampão MES a pH 6.0. Analisou-se a atividade catalítica da enzima livre e imobilizada em diferentes suportes.

A Figura 20 representa diferentes derivados em termos de atividade relativa (%), assumindo que o maior valor de atividade catalítica entre todas as temperaturas examinadas, da enzima livre ou imobilizada é tida como 100%. De acordo com a Figura 20, percebe-se que a enzima livre apresentou baixa estabilidade térmica, perdendo mais de 1 hora a mais de 50% de sua atividade.

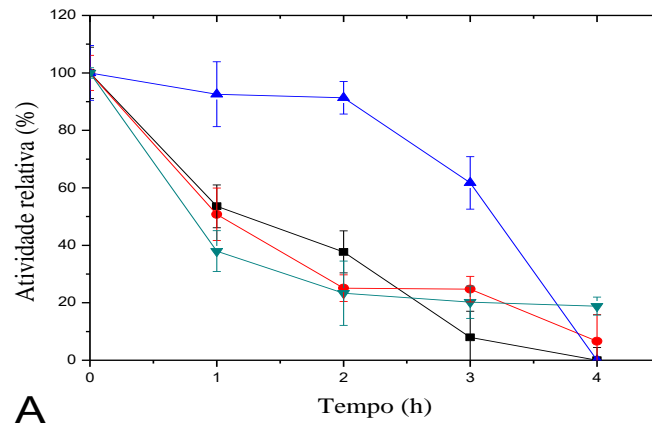
Entre os suportes testados, o MANAE-GLUT apresentou os melhores resultados de estabilidade, provavelmente porque o glutaraldeído é um agente de ativação que reduz sua capacidade de retenção de água. Promove o fenômeno da reticulação, que é a modificação química do suporte (MANAE) para promover maior estabilidade química e suporte físico e seus derivados. A imobilização de enzimas em suportes ativados com glutaraldeído é extremamente rápida devido à alta reatividade (a partir de grupos ativos que são introduzidos por este agente) deste agente ativador, e gera ligações estáveis entre os grupos amina do resíduo amina do suporte éter (SILVA, 2007).

A 45 °C, o derivado sem revestimento apresentou maior estabilidade térmica, enquanto que a 50 °C, o derivado revestido com trealose foi mais estável. O derivado MANAE-GLUT sem revestimento mostrou perfis de retenção de atividade muito diferentes com um aumento de 5 °C na temperatura. Ele manteve mais de 80% de sua atividade inicial em 3 horas a 45 °C, e com o aumento de temperatura a 50 °C, o mesmo derivado manteve menos de 40% de sua atividade inicial no mesmo tempo de 3 horas.

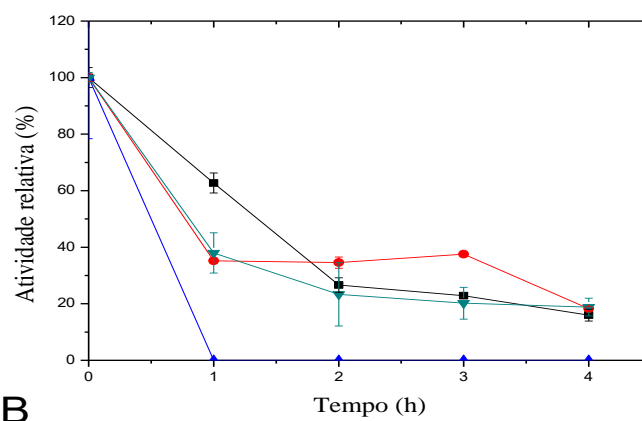
Para o mesmo derivado revestido com glutaraldeído, apresentou perfis bem próximos de retenção de atividade, mantendo cerca de 50% de sua atividade inicial em 2 horas de incubação a 45 °C e 40% de sua atividade inicial até o tempo de incubação a 50 °C.

O derivado recoberto com trealose apresentou perfis de retenção de atividade muito diferentes, com aumento de 45 °C a 50 °C, mostrando um comportamento oposto aos demais derivados, desde um aumento na porcentagem de retenção de atividade com o aumento da temperatura. Enquanto a 45 °C, com 3 horas de incubação, manteve menos de 40% de sua atividade inicial, com aumento da temperatura a 50 °C, e com o mesmo tempo de incubação, manteve aproximadamente 60% da atividade inicial.

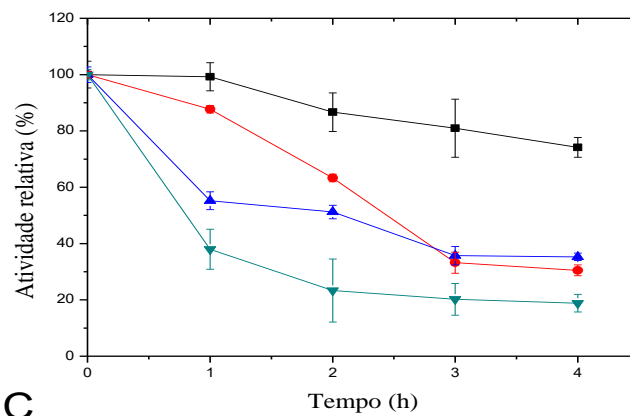
Figura 20. Estabilidade da ALDC de *Bacillus subtilis* ICA 56 com a temperatura a 45 °C em termos de atividade relativa (%) para (A) ■ enzima imobilizada em DEAE, e ▲ recoberta com trealose e ● glutaraldeído e ▼ comparada a enzima livre, (B) ■ enzima imobilizada em MANAE e ▲ recoberta com trealose e ● glutaraldeído e ▼ comparada a enzima livre, (C) ■ para enzima imobilizada em MANAE-GLUTARALDEÍDO e ▲ recoberta com trealose ● e glutaraldeído e ▼ comparada a enzima livre.



A



B



C

Fonte: Autor, 2019.

Os tempos de meia-vida calculados a partir do modelo de inativação térmica ajustado aos dados experimentais para os biocatalisadores preparados são listados na Tabela 14. O modelo de Sadana e Henley ajustou-se bem aos dados experimentais e a maior parte dos valores de R^2 foram superiores a 0,98.

Tabela 14. Parâmetros do modelo de Sadana e Henrey (1987) (k e c) e resultados do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) utilizado para ajuste aos dados de inativação térmica a 45 ou 50 °C e pH 7.0 dos derivados das imobilizações em DEAE, MANAE e MANAE-GLUTARALDEÍDO, e ativação com trealose e com glutaraldeído.

Biocatalisador	Agente de recobrimento	Condições de imobilização Temperatura	Estabilidade térmica		
			K	C	$T_{1/2}(\text{min})$
Enzima livre	-	45 °C	N.A.A	N.A.A	50
DEAE	-	45 °C	0,3998	0,2606	60
	Trealose	45 °C	0,7330	0,0639	60
	Glutaraldeído	45 °C	0,0675	0,1294	180
	-	45 °C	0,6155	0,0663	80
MANAE	Trealose	45 °C	N.A.A	N.A.A	40
	Glutaraldeído	45 °C	N.A.A	N.A.A	-
MAN-GLUT	-	45 °C	1,7945	0,1193	120
	Trealose	45 °C	2,2271	0,2771	150
	Glutaraldeído	50 °C	0,5276	0,0843	90

Fonte: Autor, 2019.

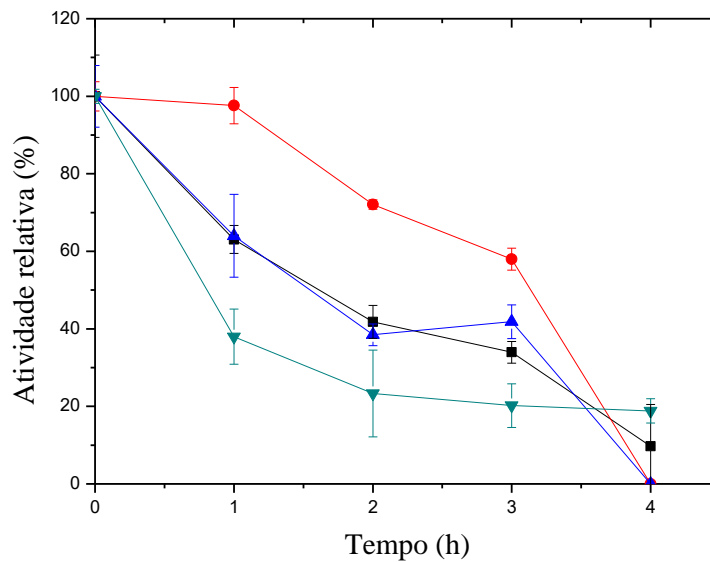
A estabilidade com a temperatura foi medida também a 50 °C por 0, 1, 2, 3 e 4 horas em tampão MES a pH 6.0 apenas para a enzima imobilizada em suporte MANAE-GLUT, porque este suporte manteve mais de 50% de sua atividade a 45 °C.

A Figura 21 mostra que a enzima imobilizada em suporte MANAE-GLUT recoberta com trealose manteve mais de 50% de sua atividade durante 3 horas. Isso ocorreu provavelmente porque a trealose é um dissacarídeo não redutor que é tido como um protetor celular.

A molécula de trealose pode facilmente interagir com proteínas de membrana e fosfolípidios devido à sua estrutura química. Esta característica da trealose é extremamente

importante para ser protetora de stress como o congelamento e a desidratação; ambos fazem parte da remoção de água em sistemas biológicos (SOARES, 2015). A trealose protege quando as células são expostas a vários tipos de estresse, como a exposição ao calor (PARROU *et al.*, 1997). Este açúcar ajuda a proteger proteínas e membranas contra os efeitos nocivos de vários tipos de estresse, inclusive contra a alta pressão hidrostática (FERNANDES *et al.*, 1997).

Figura 21. Estabilidade da enzima ALDC na temperatura a 50 °C em termos de atividade relativa (%) para (A) ■ enzima imobilizada em MANAE-glutaraldeído, e ● recoberta com ▲ trealose e ▼ glutaraldeído e comparada a enzima livre.



Fonte: Autor, 2019.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados pode-se concluir que a aplicação da enzima ALDC produzida nesta pesquisa na fermentação da cerveja mostrou-se promissora por ser uma alternativa ao uso da comercial, diminuindo os dias de produção, uma vez que a enzima foi capaz de diminuir o tempo total de fermentação de 16 para 14 dias, eliminando o composto diacetil que é desagradável e indesejável no produto. Notou-se também que não houve diferença significativa em relação a cor da cerveja nas amostras com e sem a utilização da enzima. Embora o perfil de voláteis tenha sofrido modificação, os compostos eliminados da cerveja com a utilização da enzima são considerados *off flavors* e contribuem negativamente nas características sensoriais da cerveja.

O método de quantificação definido para identificação do diacetil utilizando a fibra DVB/car/PDMS e a coluna DB-WAX foi uma ferramenta importantíssima para a detecção e quantificação de diacetil, que é um composto volátil, e por isso pode-se ter dificuldade de detecção.

O *Bacillus subtilis* ICA 56 é um micro-organismo que pode ser utilizado para a produção da enzima alfa acetolactato descaboxilase e que esta enzima pode ser utilizada em indústria de bebidas, tendo uma boa estabilidade com pH e temperatura, principalmente quando a enzima é imobilizada em suporte MANAE-glutaraldeído. O presente estudo permitiu fornecer uma visão neste tipo de cerveja contudo é interessante dar continuidade na utilização desta enzima em sua forma livre e imobilizada, e testar em outros tipos de cervejas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os processos apresentados nesta tese são estudos iniciais para utilização da enzima produzida pelo *B. subtilis* na cerveja Kolsch. Testou-se a estabilidade da enzima frente ao pH e à temperatura em algumas faixas específicas mas pode-se testar também em temperaturas mais baixas para no caso de se utilizar a enzima em cervejas de baixa fermentação que necessita temperaturas menores, então é necessário saber se neste tipo de cerveja a enzima também teria bons resultados. Além disso também pode-se testar outros tipos de imobilização da enzima bem como fazer mais testes para saber acerca da estabilidade nestes outros suportes.

Outro estudo interessante também é utilização de outras fibras diferentes na identificação e quantificação do diacetil para otimizar o método.

Finalmente, também é de fundamental importância estudar de maneira semelhante ao que foi desenvolvido nesta tese, a cerveja do tipo Lager. É necessário saber isso para ter uma visão mais completa da aplicação desta enzima, o que representa ainda muito esforço e trabalho futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, G.S. **Elaboração de uma cerveja ale utilizando melão de caroá [sicana odorífera (vell.) Naudim] como adjunto do malte**. Dissertação de mestrado. Salvador, 2016.
- AKASAKA, N.; SAKODA, H.; HIDESE, R.; ISHII, Y.; FUJIWARA, S. An efficient method using *Gluconacetobacter europaeus* to reduce an unfavorable flavor compound acetoin, in rice vinegar production. **Appl. Environ. Microbiol.**, 79 (2013), pp. 7334-7342.
- ALVISI, F. **Manual de Treinamento Técnico Cervejeiro**. AmBev, 2011.
- AMORIM, K.P.S. Imobilização e estabilização de alcalase® em imobead 350 e em quitosana ativada por diferentes métodos visando aplicação em reação modelo. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol.4, 2001.
- ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, **Anal. Chem.**, 1990, 62, 2145 – 2148.
- BAMFORTH, C. W. **Beer: a Quality Perspective**. Burlington: Academic Press, 2009.
- BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnol. Adv.**, 33 (2015), pp. 435-456.
- BARBOSA, P. G. A. et al. Statistical Analysis for Quality Adjustment of the Analytical Curve for Determination of Pesticide Multiresidue in Pineapple Samples. **Food Analytical Methods**, 2017.
- BASSO, R.F., ALCARDE, A.R. E PORTUGAL, C.B. 2016. “Could Non-Saccharomyces Yeasts Contribute on Innovative Brewing Fermentations?” **Food Research International** 86. Elsevier Ltd: 112–20. doi:10.1016/j.foodres.2016.06.002.
- BENEVIDES, L.L. Frequência de bactérias produtoras de biossurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais). Fortaleza-CE, 2013.
- BERKHOUT, B., BERTING, L., BLEEKER, Y., DE WIT, W., KRUIS, G., STOKKEL, R. E THEUWS, R. 2013. The Contribution Made by Beer to the European Economy. [on-line]. Acesso em: 02/10/2018. Disponível em: <https://brewersofeurope.org/site/index.php>.
- BEZERRA, C. S.; LEMOS, C. M. G. DE F.; DE SOUSA, M.; GONÇALVES, L. R. B.; Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 132, n. 26, p. 1–15, 2015.
- BONICIU, C.; STOICESCU, A.G. Research concerning the use of encapsulated Maturex for beer fermentation. **Food Technology**, 2007, 82-86.

BOTELHO, G.; CALDEIRA, I.; MENDES-FAIA, A.; CLÍMACO, M.C., Evaluation of two quantitative gas chromatography-olfactometry methods for clonal red wines differentiation, **Flavour Fragr. J.**, 2007, 22, 5, 414-420.

BOULTON, Chris. **Encyclopedia of brewing. Southern Gate: John Wiley & Sons**, 2013.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 1976, 72, 248.

BREJAS. O que é cerveja? 2019. Disponível em: <<https://www.brejas.com.br/cervejas.shtml>>. Acesso em: 20/01/2019.

BRÍGIDA, A. I. S. Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais. 220f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processo Químicos e Bioquímicos), Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

BRIGGS, D.E., BROOKES, P.A., STEVENS, R., BOULTON, C.A. *Brewing science and practice*. Woodhead, London, 863p., 2004.

CARRILLO, G.; BRAVO, A.; ZUFALL, C. Application of factorial designs to study factors involved in the determination of aldehydes present in beer by on-fiber derivatization in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, 59 (2011), pp. 4403-4411.

CARVALHO, D. S. de. Aceleração do processo fermentativo na obtenção de chope tipo Pilsen. 2005. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)-Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CARVALHO, G. B. M.; ROSSI, A. A.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2º parte – A Fermentação. **Revista Analítica**. n.26, p.46-54, 2007.

CARVALHO, W; CANILHA, L; SILVA, SS. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica*, n 23, pp. 60-70, 2006.

CETESB – Companhia de Tecnologia de saneamento ambiental. *Cervejas e refrigerantes*. São Paulo, 2005.

CLAPPERTON, J.F.; BROWN, D. G. W. *Journal of the Institute of Brewing*, n. 84, 90p, 1978.

CORÍCI, L. N.; FRISSEN, A. E.; VAN ZOELLEN, D. J.; EGGEN, I. F.; PETER, F.; DAVIDESCU, C. M.; BOERIU, C. G.; Sol-gel immobilization of Alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 73, n. 1–4, p. 90–97, 2011.

COSTELI, M.C. **Cultivo de *Bacillus polymyxa* para a Produção de Acetoína: Influência do pH e do Tempo de Cultivo do Inóculo**. Florianópolis SC, 2005.

CHOI, E.J.; AHN, H.W.; KIM, W.J.. Effect of alpha-acetolactate decarboxylase on diacetyl content of beer. **Food Sci. Biotechnol.**, 24 (2015), pp. 1373-1380.

DA SILVA, T.M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, 2009.

DE CARVALHO, R.V.; CORRÊA, T.L.; DA SILVA, J.C.M.; VIANA, A.P.; MARTINS, M.L.L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 28(2): 380-386, abr.-jun. 2008.

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; DE MOARES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização In: (Ed.). *Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Inter ciência, 2008. cap. 6, p.123-150

DONG, L.; PIAO, Y.; ZHANG, X.; ZHAO, C.; HOU, Y.; SHI, Y. **Food Res. Int.** 51 (2013) 783–789.

DOS SANTOS, J.C.S; RUEDA, N; SANCHEZ, A.; VILLALONGA, R; GONÇALVES, L.R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **RSC Advances**, v. 5, p. 35801–35810, 2015.

DULIEU, C.; MOLL, M.; BOUDRANT, J.; PONCELET, D. Improved performances and control of beer fermentation using encapsuled alpha acetolactate decarboxylase and modeling. **Biotechnol Prog** 16:958-965, 2000.

EARL, A. M. et al. Ecology and genomics of *B.subtilis*. v. 16, n. 6, p. 1–11, 2010.

EOM, J.; OH, H.B.; YOON, S. I. **Coreano J Microbiol** 55 : 9-16, 2019.

ETIEVANT, X.P. **Volatile compounds in foods and beverages**. Maarse Henk (Ed.) p. 585-611, 1991.

FAN, W.; QIAN, M.C., Identification of aroma compounds in Chinese 'Yanghe Daqu' liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography/olfactometry, **Flavour Fragr. J.**, 2006, 21, 2, 333-342.

FERNANDES, P.M.B., PANEK, A. e KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure on a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deleted in trehalose-6-phosphate synthase gene. **FEMS Microbiol Lett**, v.: 152, p.: 17-21, 1997.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, V.; GUISÁN, J.M. The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into α -keto acids (phenylpyruvic acid.) **Enzyme Microb. Technol.**, 23 (1998), pp. 28-33.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSSEL, C.M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, M.C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISAN, J.M.. Preparation of activated supports containing low

pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme Microb. Technol.**, 15 (1993), oo. 546-550.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, V.; GUISÁN, J.M.. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme Microb. Technol.**, 17 (1995), pp. 517-523.

FROHLICH, O.; SCHREIER, P., Volatile Constituents of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Fruit, **J. Food Sci.**, 1990, 55, 1, 176-180.

FRIEDRICH, R. B., RAVANELLO, A., CICHOTA, L. C., ROLIM, C. M. B., BECK, R. C. R. (2009) *Quimica Nova*, 32: 1052.

GALVÃO, M. P. **A química da cerveja**. Química.1997.

GARCIA- GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. Potential of diferente enzyme immobilizaion strategies to improve performance, **Adv. Synth. Catal.** 35 (2011) 2885-2904.

GODTFREDSSEN, S.E.; OTTESEN, M. Maturation of beer with alpha-acetolactate decarboxylase. **Carlsberg Res. Commun.**, 47 (1982), pp. 93-102.

GOLDAMMER, T. **The brewers' handbook**. Clifton, Va: KVP Publishers, 1999.

GOVERNO DO BRASIL. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/08/brasil-e-o-terceiro-no-ranking-de-producao-mundial-de-cerveja/cerveja.jpg/view>. Acesso em 10/10/18.

GUISÁN, J.M.; PENZOL, G.; ARMISEN, P.; BASTIDA, A.; BLANCO, R.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUNCEDA, E. Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates: reduction of steric problems G. Bickerstaff (Ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells*, **Series Methods Biotechnol**, vol. 1, The Humana Press Inc. (1997), pp. 261-275.

GUISAN, J.M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2 ed. Madri - Espanha, 2006.

GURBUZ O.; ROUSEFF J.M.; ROUSEFF R.L., Comparison of aroma volatiles in commercial Merlot and Cabernet Sauvignon wines using gas chromatography - Olfactometry and gas chromatography - Mass spectrometry, **J. Agric. Food Chem.**, 2006, 54, 11, 3990-3996.

GUO, Y. Pan, D.; Ding, H.; Wu, Z.; Sun, Y.; Zeng, X. Purification and characterization of α -acetolactate decarboxylase (ALDC) from newly isolated *Lactococcus lactis* DX. **J Sci Food Agric**. 2015 Jun;95(8):1655-61. doi: 10.1002/jsfa.6868. Epub 2014 Sep 2.

GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; WOJCIESZYNSKA, D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties- application to oxidoreductases. **Molecules**, 19 (2014), pp. 8995-9018.

HANNEMANN, W. (2002) Reducing beer maturation time and retaining quality, **Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.**, 39(3), 149-155.

HARRISON, G.A.F.; BYRNE, W.J.; COLLINS, E.. The determination of diacetyl and 2,3-pentanedione in beer head space by gas chromatography **J. Inst. Brew.**, 71 (1965), pp. 336-341.

HISTÓRIA DA CERVEJA. Disponível em: <https://www.fiftiesbeer.com.br/historia-da-cerveja>. Acesso em 10/10/2018.

ICH. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, v. 1, n. June, p. 18, 2014.

ILLANES, A. Inmovilización de glucoamilasa. *Alimentos* 8 (3) 22-27. Espanha, 1983.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de analíticos. Revisão 04, 2011.

JACKSON, E.; LOPÉZ-GALLEGO, F.; GUISAN, J.M.; BETANCOR, L. **Enhanced stability of l-lactate dehydrogenase through immobilization engineering**. *Process Biochemistry*, v: **51**,p.1248-1255. Espanha, 2016.

JACKSON, M. Cerveja. Traduzido por Marina Slade Oliveira. 2ª edição- Rio de Janeiro: Jorge Zahar Ed., 2010.

JAY J.M. *Modern Food Microbiology*. 6. ed. Aspen Publishers, 2000. JESPERSEN L.; JAKOBSEN M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal of Food Microbiology**. v. 3, p. 139-155, 1996.

G. KABAKTSCHEVA, T. GINOVA-STOJANOVA AND T. DIMITROVA. The use of an enzyme solution with alpha-acetolactate decarboxylase activity, *Brew Bever Ind Int*, 2, 22- 24, 1994.

KAMIMURA, M.; KANEDA, H. **Off-flavors in foods and beverages**. Amsterdam: Elsevier Science, 1992. p. 53-59.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes — learning from past successes and failures. *Trends in Biotechnology*, v. 11, n. 11, p. 471-478, 1993.

KELIN, M. P. Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

KIRIN BREWERY Co ltd. DNA strand coding for alpha acetolactate decarboxylase and yeast transformed with DNA strand, 1985.

KOBAYASHI, M., SHIMIZU, H., SHIOYA, S. Beer Volatiles Compounds and their application to low-malt beer fermentation. **J. of Bioscience and Bioengineering.**, 2008, 106, 4, 317-323.

KUDDUS, M. Introduction to Food Enzymes. In: KUDDUS, M. (Ed.). . Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects. 1a ed. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 1–18.

LAEMMLI, U.K. (1970) *Nature* (London) 227, 680-685.

LANDAUD, S.; LIEBEN, P.; PICQUE, D. Quantitative analysis of diacetyl, pentanedione and their precursors during beer fermentation by an accurate GC/MS method *J. Inst. Brew.*, 104 (1998), pp. 93-99.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food**. Maryland: Aspen Publishers, 1999.

LEMOS, C.M.G. Produção e imobilização da enzima α – acetolactato descarboxilase em agarose utilizando diferentes protocolos de ativação. Dissertação do curso de Pós Graduação em Engenharia Química, UFC, 2015.

LIAN, J.; CHAO, R.; ZHAO, H. Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2*R*,3*R*)-butanediol. *Metabolic Engineering*. V 23, May 2014, Pages 92-99.

LIMA, L.B. Frequência de bactérias produtoras de biossurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará. Dissertação de mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

LOKEN, J.P.; STORMER, F.C. Acetolactate decarboxylase from *Aerobacter aerogenes*. **Purif Prop Eur J Biochem** 14:133–137, 1970.

LOPES, D.; STROBL, H.; KOLODZIEJCZYK, P., 14-Methylpentadecano-15-lactone (Muscolide): a new macrocyclic lactone from the oil of *Angelica archangelica* L., **Chemistry and Biodiversity**, 2004, 1, 12, 1880-1887.

MACDOUGALL, D. B. Colour in food: improving quality. Cambridge: WoodheadPublished, 2002. 388 p.

MARADYN, D. J. Enzymes use in Beverage Production. Novozymes North America Appstate. Disponível em: Acessos em 20/04/2019. Nova Iorque: 2012.

MARLOW, V.; REA, D.; NAJMUNDIN, S.; WILLS, M.; FULOP, V. Structure and mechanism of acetolactate decarboxylase. *Chem. Biol.* 2013, 2339-2344.

MARTINS, A.F. S. (2016) Implementação e validação de métodos analíticos. Tese de Doutorado em Química, Universidade de Coimbra, p.7-20.

MARTINS, S.M. **Como Fabricar Cerveja**. São Paulo: Ícone Editora, 2aed., 77p., 1991.

MARTINS, V.M.R. RODRIGUEZ, M.A.. Produção e tecnologia de cereais: processo de maltagem da cevada. In: RODRIGUEZ, M. A. et al. Jornada de lúpulos e Cervejas: novas oportunidades de negócio. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança. Dez. 2015. Cap.4,p.

37-51.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MATEO, C.; GRAZ, V.; FERN, R. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization – stabilization. 7th International Conference on Protein Stabilization 2007, p. 1593–1601. Exter, Reino Unido, 2007

MEILGAARD, M.C. Flavour chemistry of beer: part 2: Flavour and threshold of 239 aroma volatiles. *MBAA Techn Quart* 1975; 12: 51-68.

MENDES, A.; CASTRO, H. de; RODRIGUES, D. de S.; ADRIANO, W.; TARDIOLI, P.; MAMMARELLA, E.; GIORDANO, R. de C.; GIORDANO, R. de L. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, Springer, v.38, n.8, pp.1055–1066, 2011.

MICHEL, M., KOPECKÁ, J., MEIER-DÖRNBERG, T., ZARNKOW, M. JACOB, F. E HUTZLER, M. 2016. “Screening for New Brewing Yeasts in the Non-Saccharomyces Sector with *Torulaspora Delbrueckii* as Model.” *Yeast* 33 (4): 129–44. doi:10.1002/yea.3146.

MORADO, R. Larousse da Cerveja: a história e as curiosidades de uma das bebidas mais populares do mundo. 2017.

MOREIRA, N.; MEIRELES, S.; BRANDÃO, T.; PINHO, P.G. Optimization of the HS-SPME-GC-IT/MS method using a central composite design for volatile compounds determination. *Talanta* 117 (2013) 523-531.

MOTWANI, M.; SETH, R.; DAGINAWALA, H.F.; KHANNA, P. Microbial production of 2,3-butanediol from water hyacinth. V. 44,(1993), P. 187-195

MOURET, J. R. Cadiere, A.; Aguera, E.; Rollero, S.; Ortiz-Julien, A.; Sablayrolles, J. M.; Dequin, S. Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 32, n. 1, p. 257-269, 2015.

NARZIß, L.; BACK, W. Die Bierbrauerei: Band2: Die Technologie der Würzebereitung. Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2009. Cap. 2, p. 185-187, Cap.3, p. 233-234, Cap.4, p. 397-398.

NGUYEN, MINH-TAM; EDENS, LUPPO; ROON, VAN, JEROEN LOUIS. **Improved brewing process**. EP 2 402 425 A1. Depósito: 22 jun. 2007. Concessão: 04 jan. 2012.

NÓBREGA, I. C. D. C. Análise dos Compostos Voláteis da Aguardente de Cana por Concentração Dinâmica do "Headspace" e Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 23, n. 2, p. 210-216, 2003.

O'SULLIVAN, S.M.; CONDON, S.; COGAN, T.M.; SHEEHAN, D. Purification and characterisation of acetolactate decarboxylase from *Leuconostoc lactis* NCW1. *FEMS Microbiol Lett* 194:245–249, 2001.

OHSHIRO, T.; AISAKA, K.; UWAJIMA, T. Purification and characterization of α -acetolactate decarboxylase from *Brevibacterium acetylicum*. *Agric. Biol. Chem.*, 53 (7), 1913~1918, 1989.

OLIVER, G. **A mesa do mestre cervejeiro**. São Paulo: Senac, 2012. V. 1 27p.

OLIVEIRA, N. A. M. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação de cerveja**. Minas Gerais, Programa de pós-graduação, UFMG, 2011. 44 p.

OLSEN, F. L.; AUNSTRUP, K. F. Alpha acetolactate decarboxylase enzyme and preparation thereof. Dinamarca, 1986.

PARROU, J.L., TESTE, M.A. e FRANÇOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*, v.: 143, p.: 1891-1900, 1997.

PALMER, J. J. **How to brew: everything you need to know to brew beer right the first time**. Brewers Publications, 2006.

PAWLISZYN, J. "Applications of Solid Phase Microextraction", RSC, Letchworth, 1999.

PHALIP, V.; MONNET, C.; SCHMITT, P.; RENAULT, P.; GODON, J.J.; DIVIES, C. Purification and Properties of the Alpha-Acetolactate Decarboxylase from *Lactococcus-Lactis Subsp Lactis* Ncd0-2118. *FEBS Lett* 351:95–99, 1994.

PEJIN, J.D.; GRUJIĆ, O.S.; MARJANOVIĆ, N.J.; VUJIĆ, D.N.; KOCIĆ-TANACKOV, S.D. Application of GC/MS method using SPE columns for quantitative determination of diacetyl and 2,3-pentanedione during beer fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 64 (2006), pp. 52-60.

PESSELA, B. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FUENTE, M.; VIÁN, A.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; GUISÁN, J. M. Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 369–374, 2003.

PRIEST, Fergus G.; STEWART, Graham G. *Handbook of Brewing*. 2. ed. Boca Raton: Crc Press, 2006.

RASMUSSEN, A.M.; GIBSON, R.M.; GODTRFEDSEN, S.E.; OTTESEN, M. Purification of α -acetolactate decarboxylase from *lactobacillus casei* DMS 2547. *Carlsberg Res. Commun.* Vol. 50, p. 73-82, 1985.

RAVASIO, D. et al. An indirect assay for volatile compound production in yeast strains. *Scientific reports*, v. 4, p. 3707, 2014.

REINOLD, M. R. **Manual Prático de Cervejaria**. 1.ed. São Paulo: Aden Editora, 1997. 213p.

REITENBACH, A. DESENVOLVIMENTO DE NARIZ ELETRÔNICO PARA DETECÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NA CERVEJA. Tese de doutorado (Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2016.

REZENDE, C.M.; FRAGA, S.R.G., Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.), **J. Braz. Chem. Soc.**, 2003, 14, 3, 425-428.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P.; *Quim. Nova* 2008, 31, 164.

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 51, n. 3-4, p. 100-109, 2008.

RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. S.; CARVALHO, B.; BRANDÃO, T.; GIL, A. M.; FERREIRA, A. C. Evaluation of beer deterioration by gas chromatography-massspectrometry/multivariate analysis: A rapid tool for assessing beer composition. **J. Chromatogr. A**, 1212 (2011), pp. 990-996.

RUSSEL, I.; STEWART, G.G. *Brewing*. In: REHM, H.J.; REED, G. ed. *Biotechnology*. New York: VCH, v.9, cap.11, 1995.

SADANA, A; HENLEY, J.P. Analysis of enzyme deactivations by a series-type mechanism: influence of modification on the activity and stability of enzymes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 501 (1987) 73-79.

SAISON, D.; DE SCHUTTER, D.P.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F.R. Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1190 (2008), pp. 342-349.

SAISON, D.; DE SCHUTTER, D.P.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F.R. Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009), pp. 5061-5068.

SALIMBENI, J. F.; MENEGUETTI, M. P. D. R. R. D.; ROLIM, T. F. *Caracterização da água e sua influência sensorial para a produção de cerveja artesanal*. Campinas, 2016.

SANTOS, J. C. S. DOS; RUEDA, N.; BARBOSA, O.; FERNÁNDEZ-SANCHÉZ, J. F.; MEDINA-CASTILLO, A. L.; RAMÓN-MÁRQUEZ, T.; ARIAS-MARTOS, M. C.; MILLÁN-LINARES, M. C.; PEDROCHE, J.; YUST, M. DEL M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. *RSC Advances*, v. 5, p. 20639-20649, 2015.

SELETZKY, J.M.; NOAK, U.; FRICKE, J.; WELK, E.; EBERHARD, W.; KNOCKE, C. and BÜCHS, J. (2007). Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. **Biotechnol Bioeng** 98, 800-811.

SHARMA, P.; NORONHA, S. Comparative Assessment of Factors Involved in Acetoin Synthesis by *Bacillus subtilis* 168. **ISRN Microbiology** (2014).

SILVA, J.A. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada para síntese de ésteres de Vitamina A**, 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16–24, 2012.

SIQUEIRA, P.H.; BOLINI, H.M.A.; MACEDO, G.A. Beer production and its effects on the presence of polyphenols. **Alim.Nutr.**, v.19,n.4,p.491-498, out./dez.2008.

SNOW, N.H.; SLACK, G.C. Head space analysis in modern gas chromatography. **Trends Annual Chem**, 2002; 21: 608-17.

SOARES, F.L.P. **Influência da pressão hidrostática em *Saccharomyces cerevisiae*: correlação com estresses químicos e físicos**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.

SOUZA, M.D.J.C.A. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências de Tecnologia Nuclear) – Centro de Tecnologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2006.

STANIER R. Y., INGRAHAM, J. L., WHEELIS, M. L., PAINTER, P. R. **General Microbiology** 5th ed. London: MacMillan Press Ltd., 1987.

Starch Conversion. Disponível em: <http://braukaiser.com/wiki/index.php/Starch_Conversion>. Acesso em: 23/12/2018.

SUIHKO, M.L.; BLOMQVIST, K.; PENTTILA, M.; GISLER, R.; KNOWLES, J. Recombinant brewer's yeast strains suitable for accelerated brewing. **J Biotechnol** 14:285–300, 1990.

STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. **General microbiology**. London: MacMillan, 1987.

STORMER, F.C. 2,3-Butanediol biosynthetic system in *Aerobacter aerogenes*. **Methods in Enzymology**. Volume 41, 1975, P. 518-533.

SVENDESEN, I.B.; JENSEN, B.R. OTTESEN, M. Complete amino acid frequency of α -acetolactate decarboxylase from *Bacillus brevis*. **Carlsberg Res. Commun**, 1989, 54:157. <https://doi.org/10.1007/BF02907185>.

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

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G.; **Food chem.** 95 (2006) 357–381.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Bebidas alcohólicas: I. Cerveza. In: Bebidas: Tecnología, Química y Microbiología. Zaragoza: Acribia, S.A., 1997. 487p.

VENTURINI FILHO, W. G. Bebidas Alcohólicas: ciência e tecnologia. São Paulo: Blucher, 2010. V. 1 461 p.

VENTURINI, W.G. CERADA, M.P. Cerveja. In: AQUARONE, E. et al. Biotecnologia Industrial: Biotecnologia em alimentos. São Paulo: Blucher, 2013. Cap. 4, p.91-143.

WANG, X.; ZHANG, M.L.V. L.; LI, K.;GAO, C.; MA, C.; XU, P. Efficient bioconversion of 2,3-butanediol into acetoin using *Gluconobacter oxydans*. Biotechnol Biofuels. 2013; 6: 155.

WENBO,H.; FANGLING, J.; JINGYUN, W.; YUEPENG, W.; YUE, Z.; YONGMING, B. Metabolic Engineering of *Bacillus* sp. for diacetyl production. **Process Biochemistry**, 58 (2017), p.69-77.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, v. 1694, n. 1–3, p. 299– 310, 11 nov. 2004.

WONG, C.-H. and WHITESIDES, G. M. (1994). Enzymes in synthetic organic chemistry. In: Tetrahedron Organic Chemistry Series (Baldwin, J. E., Williams, R. M., Bäckvall, J.-E., eds.). Pergamon, Amsterdam, The Netherlands, 12, pp. 41–130.

ZAAK, H.; SASSI, M.; LAFUENTE, R.F. A new hetero functional amino-vinyl sulfone support to immobilize enzymes: Application to the stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, 64 (2018),p.200-205.

ZHAO, Y.; XU, Y.; LI, J.; FAN, W.; JIANG, W. Profile of volatile compounds in 11 brandies by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, **J. Food. Sci.**, 2009, 74, 2, c90-c99.

ZANG, X.; RAO, Z.; Li, J.; ZHOU, J.; YANG, T.; XU, M.; BAO, T.; ZHAO, X. Improving the acidic stability of *Staphylococcus aureus* α -acetolactate decarboxylase in *Bacillus subtilis* by changing basic residues to acidic residues. Volume 47, p. 707–717, 2015.