



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**Influência da alta pressão hidrostática na sacarificação do mosto
cervejeiro**

LÍGIA MARCONDES RODRIGUES DOS SANTOS

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

INFLUÊNCIA DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA
SACARIFICAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO

LÍGIA MARCONDES RODRIGUES DOS SANTOS

Sob a Orientação do DSc

Amauri Rosenthal

Coorientação da DSc

Elisa Helena da Rocha Ferreira

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ

Novembro de 2016

663.42
S237i
T

Santos, Lígia Marcondes Rodrigues dos, 1983-
Influência da alta pressão hidrostática
na sacarificação do mosto cervejeiro / Lígia
Marcondes Rodrigues dos Santos. - 2016.
56 f.: il.

Orientador: Amauri Rosenthal.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, 2016.

Bibliografia: f. 50-56.

1. Cerveja - Teses. 2. Alta pressão
(Tecnologia) - Teses. 3. Amido - Teses. 4.
Tecnologia de alimentos - Teses. I.
Rosenthal, Amauri, 1960- II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

LÍGIA MARCONDES RODRIGUES DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28 / 11 / 2016 .

Dr. Amauri Rosenthal – Embrapa/Agroindústria de Alimentos
Orientador

Dr^a. Luciana Cardoso Nogueira – IFRJ

Dr. Carlos Wanderlei Piler de Carvalho - Embrapa/Agroindústria de Alimentos

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Fabiano que foi meu maior incentivador para começar e terminar esta jornada. Você foi um grande companheiro, orientador, motorista para a Rural/Embrapa e foi fundamental para eu chegasse até o dia de hoje. Obrigada, meu amor!

Ao meu filho Daniel que durante o período de mestrado foi concebido, nasceu e é um lindo menino muito carinhoso e sapeca. Você mudou tudo na minha vida e para muito melhor.

À minha família que está longe fisicamente, mas sempre perto das maneiras possíveis e que é minha fonte de inspiração. Em especial minha mãe, que sabe como ninguém como me incentivar ou confortar nas horas certas.

Aos meus orientadores Amauri e Elisa, pela confiança e liberdade que me deram durante todo o processo. Obrigada por acreditarem em mim e me darem o suporte para que eu chegasse até aqui.

Aos meus chefes no CTS Alimentos e Bebidas Antonio Tavares e André Dias que me liberaram para fazer o mestrado e me deram suporte, permitindo que eu me ausentasse para me dedicar a mais este projeto de crescimento profissional.

Aos colegas de SENAI e alunos que me acompanham todos os dias e com quem estou sempre aprendendo um pouco mais sobre esta bebida tão fascinante a qual dedico toda minha carreira como profissional: a cerveja. Em especial os meus amigos, José, Henrique, João e Miguel.

Ao amigo Fernando que conheci na Rural e que se revelou um amigo para toda a vida. Obrigada por toda ajuda! E não foi pouca!

Aos amigos Luana e José que são amigos que o SENAI me deu e que me ajudaram e incentivaram muito em todo o processo.

Aqueles que me ajudaram na parte prática do experimento: Thayrine, William, Manuela, e minha grande amiga Paola.

Ao professor Carlos Piler por toda ajuda nas análises de microscopia e contribuições para este trabalho.

À professora Luciana Nogueira pelas valiosas contribuições ao trabalho.

À minha turma de mestrado por toda a diversão nas aulas e fora delas que tornou tudo mais leve.

RESUMO

DOS SANTOS, Lígia Marcondes Rodrigues. **Influência da alta pressão hidrostática na sacarificação do mosto cervejeiro**. 2016. 56p Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2016.

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo, e o Brasil é o terceiro maior produtor. No processo de produção convencional, a mostura é a etapa que objetiva prioritariamente, promover gelatinização e hidrólise enzimática do amido pelas enzimas endógenas α e β amilases. A alta pressão hidrostática (APH) é capaz de promover a gelatinização de amido e ativação de enzimas e, desta maneira, a mostura demonstra ser uma etapa da fabricação de cerveja capaz de utilizar APH, no entanto há poucos estudos na literatura sobre esta aplicação. A adequação dessa tecnologia poderá propiciar esta etapa do processo sem necessidade de calor e com tempo reduzido, o que reverterá em aumento de produtividade e capacidade da indústria cervejeira. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do processo da APH sobre a hidrólise do amido para formação de açúcares durante a mostura. Para isso, mostos (solução contendo água e malte – 4:1) foram tratados por alta pressão hidrostática (APH) a 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos e, como controle do experimento, a mesma solução foi tratada termicamente (TT: 1ª fase: 52°C / 20 min; 2ª fase: 72 °C / 25 min; 3ª fase: 78 °C / 5 min) . Posteriormente, procedeu-se análise do perfil de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o teor de sólidos solúveis por densitometria e análise microscópica da gelatinização do amido. Como resultado, observou-se através da microscopia que houve diminuição na concentração de amido (indicativo de hidrólise) e um progressivo inchamento (indicativo de gelatinização) dos grânulos com o aumento da pressão, principalmente a 500 MPa. O resultado do teste iodo (que avalia presença de amido) corroborou com o resultado da microscopia, indicando a diminuição na concentração de amido a 500 MPa. O perfil de açúcar revelou cinco sacarídeos principais: sacarose, frutose, glicose, maltose e maltotriose. As concentrações de maltose, maltotriose e frutose dos mostos pressurizados foram similares às observadas no mosto TT quando nos níveis mais intensos (500 MPa / 5, 10 e 15 min). Frutose e glicose exibiram aumento de concentração na maioria dos tratamentos avaliados. O teor de sacarose e de sólidos solúveis foram inferiores ao observado no mosto TT em todos os mostos tratados por APH. Entre os níveis de APH avaliados, observou-se tendência de aumento da concentração de sólidos solúveis, maltose, maltotriose e glicose com o aumento da intensidade de APH. De maneira geral, o efeito da pressão alterou o teor de todos os açúcares, exceto sacarose. Já o tempo exerceu discreto efeito na concentração dos açúcares quando pressurizados em alguns níveis de pressão. O modelo matemático que melhor se ajustou aos dados experimentais dos teores de maltose, maltotriose e sólidos solúveis foi o de quarto grau, que exibiu forte influência do fator pressão sem dependência do fator tempo, corroborando com as outras análises deste estudo. Adicionalmente, análises de componentes principais exibiu explicação (CP1 + CP2) a 92 % de variância com formação de três clusters principais: mosto TT, mostos 500 MPa / 10 ou 15 min e demais mostos tratados por APH. Os resultados demonstraram que a APH foi capaz de promover as alterações desejáveis no processo de mostura no que se refere aos efeitos de gelatinização e hidrólise com formação dos açúcares de interesse, principalmente nos níveis mais intensos (500 MPa) de pressão. Esse resultado sugere que a produção de mosto por APH é viável tecnicamente, podendo vir a proporcionar ganho expressivo de produtividade, uma vez que a APH demanda menos tempo (5 min contra 80 min do tratamento térmico) e há redução do consumo de energia.

Palavras chave: cerveja, amido, tratamento por alta pressão

ABSTRACT

DOS SANTOS, Lígia Marcondes Rodrigues. **The influence of high hydrostatic pressure in wort saccharification.** 2016. 56p Dissertation (Master in Food Science and Technology, Food Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2016.

Beer is the most consumed beverage in the world and Brazil is the third biggest producer just behind USA and China. It is an alcoholic beverage made from malted cereals, water, hops and yeast. To produce beer, water and malt are mixed and heated, what it is called the mashing step which aims to promote gelatinization and the starch hydrolyzation by the enzymes of the malt: α and β amylases. Since by using high hydrostatic pressure (HHP) it is possible to realize both processes (gelatinization and hydrolysis), mashing can use this technology without the need of heating and to raise productivity of the brewhouse. The aim of this study was to evaluate the use of HHP on starch hydrolysis and the sugar profile formed. For this, worts (water and malt solution – ratio 4:1) were treated with HHP in 300, 400 or 500 MPa for 5, 10 and 15 minutes, and as control sample, the same solution was treated with heat (1st step: 52°C / 20 min; 2nd step: 72 °C / 25 min; 3rd step: 78 °C / 5 min). After, it was made the sugar profile by high performance liquid chromatography (HPLC), soluble solids content by density and microscopic analysis of gelatinized starch. As results, it was possible to verify a decrease on starch concentration (indication of hydrolysis) and a progressive swelling (indication of gelatinization) of the granules, especially at 500 MPa. The iodine test, which assesses starch presence, showed the same results of microscopy analysis and, on both qualitative assessments, the pressure level was of great influence and only on the iodine test, time seems to have had any influence since it was observed a decrease on starch content as time increased at 500 MPa. The sugar profile revealed five main sugars in all worts: glucose, sucrose, fructose, maltose and maltotriose. The maltose, maltotriose and fructose's contents of the pressurized worts were similar to the heat treatment (500 MPa / 5 – 15 min). Fructose and glucose exhibited an increase in most of the pressurizations. Sucrose and soluble solids contents of the pressurized samples were lower than the heated one. Among the pressure levels studied, there was a trend of increase on soluble solids, maltose, maltotriose and glucose's content as the pressure was raised and generally, pressure influenced all sugar's contents, except from sucrose. Time had a small effect on sugar's content in some pressure levels. The variations observed to maltose, maltotriose and soluble solids were adjusted to mathematical models of fourth grade that exhibited a strong influence of pressure without dependence of the time effect. Additionally, the principal component analysis explained the variance with formation of three main clusters: heated wort, 500 MPa / 10 or 15 min wort and the other pressurized worts. The results showed that high hydrostatic pressure was able to promote desirable changes on mashing concerning gelatinization and hydrolysis with formation of desirable sugars, especially at 500 MPa. It suggests that it's possible to produce wort by HHP providing productivity gains, once HHP takes less time (5 min against 80 min of usual heat process) and less energy consumption.

Keywords: Beer, starch, high hydrostatic pressure

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: P-valor da interação Controle*Fatorial para concentração de açúcares em mosto cervejeiro obtido por Tratamento Térmico (1ª fase: 52°C / 20 min; 2ª fase: 72 °C / 25 min; 3ª fase: 78 °C / 5 min) ou Alta Pressão Hidrostática a 300, 400, 500 MPa / 5, 10 ou 15 min.....	30
Tabela 2: P-valor para efeito da pressão, tempo e interação pressão*tempo na concentração de açúcares em mosto cervejeiro produzido por Alta Pressão Hidrostática a 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.....	35
Tabela 3: Matriz de correlação entre concentração dos açúcares presentes nos mostos pressurizados a 300, 400 ou 500 MPa / 5, 10 ou 15 min.....	38
Tabela 4: Modelos de regressão ajustados	41
Tabela 5: Análise de Variância para modelos de segundo e quarto grau para sacarose.....	42
Tabela 6: Análise de Variância para modelos de segundo e quarto graus para frutose.....	43
Tabela 7: Análise de Variância para modelos de segundo e quarto graus para glicose.	44
Tabela 8: Análise de Variância para modelos de segundo e quarto grau para maltose.....	45
Tabela 9: Análise de Variância para modelos de segundo e quarto grau para maltotriose.....	46
Tabela 10: Análise de Variância para modelos de segundo e de quarto grau para teor de sólidos solúveis.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de produção de cerveja (http://dortmund.com.br , 2016)	4
Figura 2: Diagrama do tempo e temperatura de mostura da cerveja tipo Pilsen (KUNZE, 2014).....	6
Figura 3: Cruz de malta presente no amido não gelatinizado, observado em microscópio sob luz polarizada (MILLAN-TESTA et al., 2005)	7
Figura 4: Estrutura molecular de alguns açúcares fermentescíveis do mosto: maltotriose, maltotetraose e maltopentaose (BRIGGS et al., 2004).....	9
Figura 5: Estrutura molecular da Maltose: açúcar mais abundante no malte cervejeiro (BRIGGS et al., 2004)	10
Figura 6: Diagrama tempo x temperatura de mostura tradicional de uma cerveja tipo Pilsen feita com aquecimento e utilizada para produção do mosto controle desta pesquisa	19
Figura 7: Teste do iodo para todos os tratamentos de mostura por APH (300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 min) e TT (1ª fase: 52°C / 20 min; 2ª fase: 72 °C / 25 min; 3ª fase: 78 °C / 5 min).....	21
Figura 8: Amostras pressurizadas a 400 MPa em diferentes tempos de processamento (mostura).	22
Figura 9: Amostras pressurizadas a 500 MPa em diferentes tempos de processamento (mostrura). ...	22
Figura 10: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 300 MPa/5 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido sem a cruz de malta	23
Figura 11: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 300 MPa/10 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido onde é possível observar a cruz de malta em menor intensidade.	23
Figura 12: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 300 MPa/15 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e inchado com menor birrefringência.....	24

Figura 13: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 400 MPa/5 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido sem a cruz de malta	24
Figura 14: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 400 MPa/10 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido sem a cruz de malta	25
Figura 15: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 400 MPa/15 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido sem a cruz de malta	25
Figura 16: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 500 MPa/5 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido sem a cruz de malta	26
Figura 17: Ausência de grânulos de amido em microscopia de mosto tratado por alta pressão a 500 MPa/10 min.....	26
Figura 18: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 500 MPa/15 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido.	27
Figura 19: Ausência de grânulos de amido em microscopia de mosto produzido com tratamento térmico (1ª fase: 52°C / 20 min; 2ª fase: 72 °C / 25 min; 3ª fase: 78 °C / 5 min).	28
Figura 20: Cromatograma de HPLC do mosto tratado com 500 MPa / 5 minutos.....	28
Figura 21: Cromatograma de HPLC do mosto tratado termicamente	29
Figura 22: Teores de frutose, glicose, sacarose, maltotriose, maltose e sólidos solúveis em mosto cervejeiro produzido por tratamento térmico (Controle: 1ª fase: 52°C / 20 min; 2ª fase: 72 °C / 25 min; 3ª fase: 78 °C / 5 min) ou por Alta Pressão Hidrostática a 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.	31
Figura 23: Teores de sacarose em mosto cervejeiro produzido por Alta Pressão Hidrostática a 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.....	34

Figura 24: Teores de frutose em mosto cervejeiro produzido tratamentos a Alta Pressão Hidrostática a 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.	35
Figura 25: Teores de glicose, maltose e maltotriose em mosto cervejeiro produzido Alta Pressão Hidrostática à 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.	36
Figura 26: Teores de sólidos solúveis em mosto cervejeiro produzido Alta Pressão Hidrostática à 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.	37
Figura 27: Gráfico de variância explicada por Componente Principal e Acumulada.....	39
Figura 28: Distribuição dos mostos TT e APHs de acordo com análise de componentes principais (ACP)	40
Figura 29: Distribuição das variáveis respostas (frutose, glicose, maltose, maltotriose, sacarose e teor de sólidos solúveis) dos mostos TT e APHs de acordo com análise de componentes principais (ACP)	40
Figura 30: Superfícies de resposta ajustadas para o comportamento da concentração (%) de maltose, maltotriose e sólidos solúveis em mosto pressurizado a 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.	48

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

µm – Micrômetros
AP – Alta pressão
APH – Alta Pressão Hidrostática
MPa – Mega Pascal
Min - Minutos
DSC – Calorímetro Diferencial de Varredura
nm – Nanômetros
°C – Graus Celsius
°P – Graus Plato
PIB – Produto Interno Bruto
TT – tratado termicamente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.	Objetivos.....	2
1.1.	Objetivo geral.....	2
1.2.	Objetivos específicos.....	2
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1.	Cerveja.....	3
2.2.	Tecnologia de fabricação.....	4
2.3.	Etapa de mostura.....	5
2.4.	Amido e Sua Hidrólise Durante a Mostura.....	6
2.4.1.	O Amido.....	6
2.4.2.	Gelatinização.....	7
2.5.	Enzimas Amilolíticas.....	8
2.5.1.	α -amilase.....	8
2.5.2.	β -amilase.....	8
2.6.	Carboidratos presentes no mosto.....	9
2.7.	Alta Pressão.....	10
2.8.	Enzimas e a Alta Pressão.....	12
2.8.1.	α e β amilases e a alta pressão.....	13
2.8.2.	Outras enzimas importantes na mostura e a alta pressão.....	14
2.9.	O Amido e a Alta Pressão.....	14
2.10.	Cervejas processadas por alta pressão.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19

3.1.	Materiais	19
3.2.	Preparação e Pressurização das Amostras	19
3.3.	Análises	19
3.3.1.	Açúcares fermentescíveis por HPLC	19
3.3.2.	Microscopia	20
3.3.3.	Análises de mosto e cerveja.....	20
3.3.4.	Prova de iodo.....	20
3.4.	Estatística	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1.	Teste qualitativo para presença de amido	21
4.2.	Microscopia.....	22
4.3.	Perfil de açúcares	28
4.3.1.	Efeito dos Processos de Alta Pressão Hidrostática (APH) e Tratamento Térmico (TT) 29	
4.3.2.	Efeito dos Níveis de Alta Pressão.....	34
4.3.3.	Análise de Componentes Principais (ACP).....	39
4.3.4.	Modelagem Matemática.....	41
5	CONCLUSÕES.....	49
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja, que é a 5ª bebida mais consumida no mundo. Isto corresponde a um volume de 14 bilhões de litros em 2014 de acordo com o sistema de controle de produção de bebidas (SICOBE) da Receita Federal (BRASIL, 2015). O primeiro produtor é a China e o segundo os Estados Unidos. Apesar de estar no topo em relação à produção, segundo a CervBrasil Associação brasileira da Indústria da Cerveja (2016), o Brasil está em 27º lugar em relação ao consumo per capita, o que evidencia que o país ainda tem mercado para crescimento. Além disso, ainda segundo esta Associação, em 2014 as indústrias de cerveja no Brasil foram responsáveis por 1,6% do PIB e 2,2 milhões de empregos.

O mercado cervejeiro mundial é dominado pela grande Anheuser-Busch Inbev, seguido pela SABMiller e Heineken. No Brasil, a Ambev, que faz parte da Anheuser-Busch Inbev, é a líder em vendas, seguida do Grupo Petrópolis, Heineken e Brasil Kirin (CERVBRASIL - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2016). Assim como aconteceu nos EUA, no Brasil cresce a cada dia o número de cervejeiros caseiros e micro cervejarias. Por lá, as cervejarias de pequeno porte já correspondem a 12,2% do mercado, enquanto que no Brasil ainda não chega a 1,4% (SEBRAE, 2015). Ainda segundo o SEBRAE (2015), o público consumidor deste tipo de cerveja é bem diferente das cervejas produzidas pelas grandes cervejarias, pois demandam cervejas mais lupuladas, encorpadas e muitas vezes com sabores exóticos.

Independente do tipo, a cerveja é uma bebida alcoólica feita a partir de mosto cervejeiro cujos ingredientes são água, malte de cevada, lúpulo e levedura. O processo é longo, podendo variar de alguns dias até alguns meses, dependendo do tipo de cerveja a ser feito. Para todos os tipos de cerveja são sempre realizadas as etapas de brassagem, fermentação e maturação. Na brassagem, o mosto passa por outras etapas, sendo que a primeira destas etapas, a mostura, acontece exclusivamente pela ação enzimática sobre as substâncias presentes no malte de cevada. Neste momento, as macromoléculas existentes no malte, como o amido e proteínas, são solubilizadas e/ou gelatinizadas e posteriormente degradadas para gerar prioritariamente na cerveja, o álcool e produtos de menor massa molecular, respectivamente. Desta forma, a presença e a atividade das enzimas são fundamentais para a produção de um mosto de qualidade e com as substâncias adequadas para cada tipo de cerveja (KUNZE, 2014).

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores biológicos e podem ser encontradas de forma natural em alimentos e bebidas ou podem ser adicionadas a eles para promover algumas mudanças, como hidrólise de amido e proteínas. Em alguns produtos, a presença de enzima pode ser indesejada, como é o caso da polifenol oxidase na maçã, que escurece a fruta rapidamente em presença de oxigênio. Em outros produtos é justamente o oposto, pois sem a presença de enzimas não seria possível a sua produção, como é o caso da cerveja (AMORE; FARACO, 2015).

Para fazer a hidrólise do amido, atuam na mostura de maneira significativa a α e a β -amilase, que são enzimas endógenas ao malte. As duas são específicas para ligação do tipo α -1,4, sendo a α -amilase considerada uma endo-enzima, pois hidrolisa ligações de forma aleatória por dentro da molécula de amido e gera em maior quantidade dextrinas. Já a β -amilase é considerada uma exo-enzima, pois atua a partir das extremidades não redutoras da

molécula de amido e gera prioritariamente maltose e outros açúcares menores. De maneira geral, a α é considerada uma enzima responsável pela formação de corpo da cerveja, pois as dextrinas são açúcares não fermentescíveis pela levedura cervejeira, enquanto que a β -amilase é uma enzima considerada responsável pelo teor de álcool na cerveja, pois produz maltose e açúcares menores que são fermentescíveis pela levedura (BRIGGS et al., 2004).

O tratamento de um produto com alta pressão (AP) é considerado um método não tradicional de conservação, pois é menos invasivo e danoso ao produto do que outros tratamentos de conservação de alimentos e bebidas tradicionais, em especial os térmicos. Comercialmente, já existem sucos tratados por AP que apresentam período de vida útil comparável com os sucos comerciais e que, além disso, apresentam uma qualidade sensorial superior. Além desta aplicação, a alta pressão também atua modificando a estrutura das proteínas. No caso das enzimas, este processo pode inativá-las ou ativá-las, dependendo da pressão a qual o produto é submetido (RASTOGI, 2013).

O tratamento de cerveja por Alta Pressão Hidrostática (APH) aumenta o seu período de vida útil e pode resultar em uma qualidade sensorial superior. No entanto, poucas pesquisas têm avaliado esta tecnologia na fase da mostura para ativar as enzimas do malte e/ou promover a sacarificação do amido, sem necessidade de calor e com tempo reduzido, o que possibilitaria um aumento de produtividade e da capacidade de produção da indústria cervejeira. Apesar de certos estudos terem sugerido a possibilidade de utilização da alta pressão na fase de mostura para gelatinização e sacarificação do amido, não houve relatos anteriores concernentes ao perfil de açúcares resultante de tal aplicação e, desse modo, a presente pesquisa visa aprofundar a compreensão dos mecanismos e efeitos da aplicação da alta pressão nessa etapa do processo de produção de cerveja, com vistas ao avanço científico e tecnológico.

1. Objetivos

1.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da alta pressão hidrostática na sacarificação do mosto cervejeiro submetidos a diferentes níveis de pressão e tempo.

1.2. Objetivos específicos

- Estudar o perfil de açúcares fermentescíveis no mosto submetido a diferentes níveis de pressão e tempo e compará-lo ao perfil de açúcares do mosto tratado termicamente;
- Analisar a ocorrência de gelatinização de forma visual e qualitativa do amido de cevada submetido a diferentes níveis de pressão e tempo em comparação com a amostra tratada termicamente;
- Analisar a ocorrência de hidrólise de forma visual e qualitativa do amido de cevada submetido a diferentes níveis de pressão e tempo em comparação com a amostra tratada termicamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.Cerveja

A cerveja é a quinta bebida mais consumida no mundo, sendo a primeira o chá, seguido de refrigerante, leite e café (OLAJIRE, 2012). O Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de cerveja, liderada pelos Estados Unidos e China (SEBRAE, 2014). Em 2015, o país teve uma produção de 13,8 bilhões de litros (BRASIL, 2015) e este número alto foi refletido na geração de 2,2 milhões de empregos gerados e pela receita correspondente a 1,6% do PIB Brasileiro (CERVBRASIL - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2016). Estes dados são sobretudo decorrentes da produção dos quatro maiores grupos de cerveja do país: Ambev, Grupo Petrópolis, Heineken e Brasil Kirin.

Além destes grupos, desde 2013 vem crescendo no Brasil o número de microcervejarias com objetivo de produzir cervejas diferentes daquelas produzidas pelos grandes grupos. De acordo com o guia de estilos de cerveja *Brewers Association*, a cerveja mais produzida no mundo e também no Brasil é classificada como *American Lager*, mas é popularmente conhecida como tipo *Pilsen*. Segundo SEBRAE (2015), de 2013 a 2016 houve um crescimento de 36% no consumo de cervejas fortes e *premium* que, em sua maioria, são produzidas pelas 200 micro cervejarias legalizadas no país. Este movimento começou nos EUA há 10 anos atrás com as *craft breweries* e se espalhou pelo mundo todo, modificando em parte o perfil de consumo de cerveja (DONADINI et al., 2016; KRAFTCHICK et al., 2014).

De acordo com o Decreto nº 6871 de 4 de Junho de 2009, “cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”. Segundo esta mesma legislação, é possível substituir o malte por até 45% de outra fonte de amido ou açúcar para resultar em alguma modificação sensorial da bebida e/ou redução de custos, dependendo do adjunto a ser utilizado.

Em relação às matérias-primas, o malte de cevada contribui com os carboidratos e proteínas necessários para fermentação e características da cerveja, assim como os adjuntos que podem ser adicionados em substituição ao malte. A água precisa ser, além de potável, própria para o processo de produção, especialmente no conteúdo de sais. A levedura cervejeira deve produzir álcool e gás carbônico, além de subprodutos característicos do tipo de cerveja que se deseja produzir, e o lúpulo é o responsável pelo amargor da cerveja e também por parte do seu aroma (KUNZE, 2014).

Cerveja também pode fazer bem à saúde se consumida de forma moderada (BAMFORTH, 2002; GAETANO et al., 2016; WRIGHT et al., 2008). De acordo com Gaetano et al. (2016), uma dose para mulheres e 2 para homens diariamente reduz o risco de doenças cardiovasculares, além de contribuir com vitaminas do complexo B, minerais, antioxidantes e fibras (BAMFORTH, 2002). Em geral, cerveja e vinho por serem bebidas fermentadas são benéficas à saúde pelo seu conteúdo alcoólico (BAMFORTH, 2002) e também por outras substâncias presentes, em sua maioria polifenóis. Uma vantagem da cerveja em relação ao vinho é a utilização do lúpulo como matéria-prima, pois além de conferir amargor e aromas característicos, também aporta diversos polifenóis benéficos à saúde, sendo o grupo mais importante o de prenil flavonóides. Neste grupo está incluído o xantohumol, que é considerado um agente de prevenção de amplo espectro para câncer, e a 8-prenilnaringenina, que é o fito estrogênio mais potente conhecido e utilizado no tratamento de osteoporose e diminuição dos sintomas da menopausa (STEVENS, PAGE, 2004).

2.2. Tecnologia de fabricação

Para produzir cerveja, são necessárias as seguintes etapas (Figura 1):

- Brassagem
- Fermentação e Maturação
- Filtração
- Envase

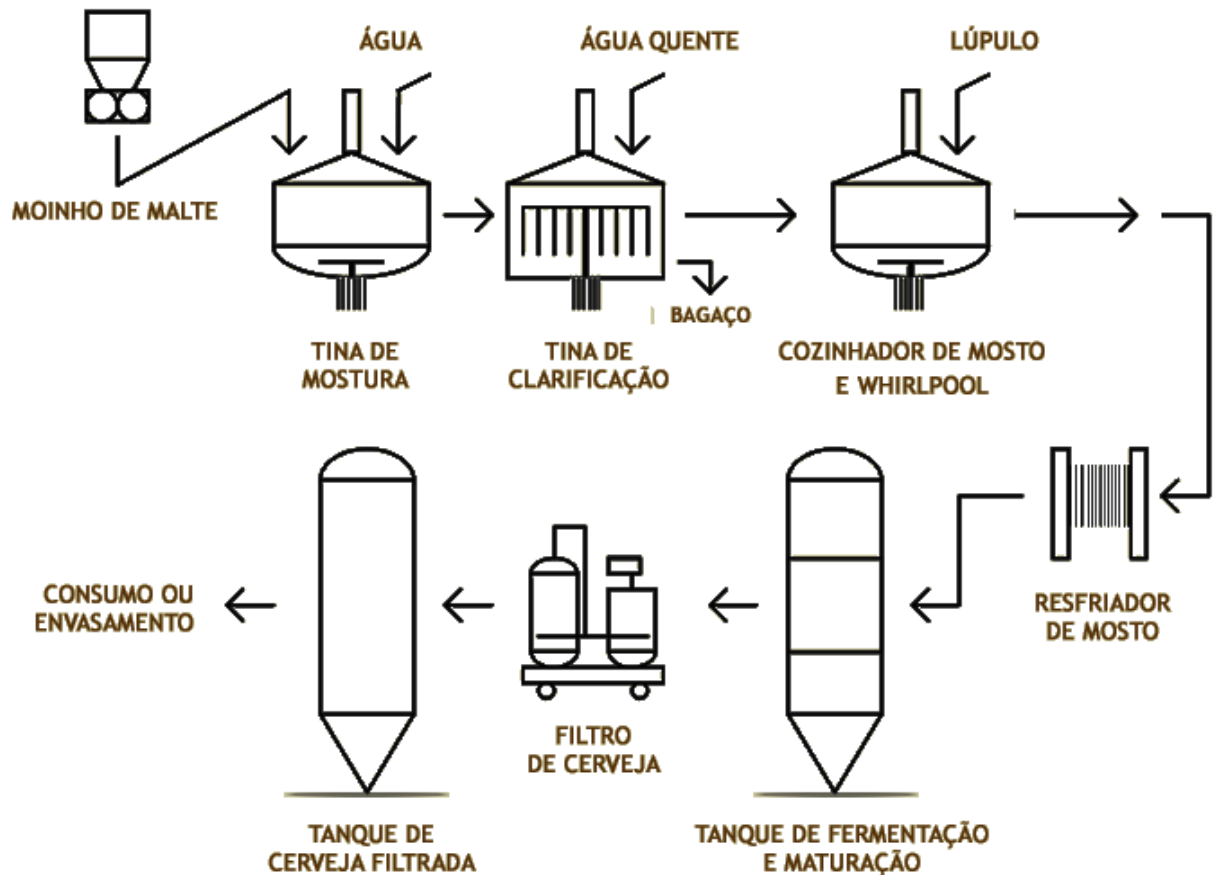


Figura 1: Fluxograma de produção de cerveja (<http://dortmund.com.br>, 2016)

A brassagem é a parte do processo em que o mosto cervejeiro é produzido para depois ser fermentado. Possui as seguintes etapas: moagem do malte, mostura, clarificação do mosto, fervura e decantação (Figura 1). Esse conjunto de etapas visa à degradação, extração e dissolução dos componentes do malte em substâncias capazes de serem metabolizadas pela levedura, a separação do bagaço do malte, a fervura para incremento de cor e solubilização dos componentes de amargor e aroma do lúpulo e a separação das proteínas coaguladas durante a fervura (*trub*) (HAGER et al., 2014; KUNZE, 2014). O mosto pronto é então resfriado e inocula-se a levedura cervejeira para início da etapa de fermentação, que vai durar enquanto houver açúcares passíveis de serem metabolizados. Durante este processo há uma queda natural de pH e são formados diversos componentes de aroma pela própria levedura, que são fundamentais para dar as características sensoriais da cerveja pronta (LODOLO et al., 2008). Após o término da fermentação, a levedura é retirada do tanque e se inicia a maturação, fase em que estes compostos de aroma vão se modificar e ficar mais atraentes e, também, há uma clarificação do líquido, pois a cerveja fica alguns dias decantando (BRIGGS et al., 2004). Em seguida, vem a etapa de filtração, que é onde as substâncias causadoras de

turbidez são retiradas junto com as células de levedura que ficaram em suspensão, mesmo após a retirada na fermentação e maturação (CRISTEA; MAZAEDA; DE PRADA, 2013).

Por fim, a cerveja é enviada para a linha de envase e colocada no recipiente final, lacrada, codificada, empacotada e despachada para o ponto de venda (ESSLINGE, 2009).

2.3. Etapa de mostura

A mostura é a etapa onde o malte e a água são misturados para que sejam possíveis as complexas reações enzimáticas que promoverão a hidrólise das macromoléculas presentes no malte (KUNZE, 2014). A principal reação desta etapa de mostura é a hidrólise enzimática do amido gelatinizado, que vai gerar açúcares fermentescíveis, resultando no teor de álcool da cerveja na etapa de fermentação (BRANDAM et al., 2003). Com isso, um objetivo da mostura é maximizar a produção desses açúcares. No entanto, não são somente os açúcares fermentescíveis que são importantes da hidrólise do amido, pois há também geração de carboidratos não fermentescíveis, em sua maior parte dextrinas, que afetam outras características organolépticas da cerveja, como o atributo de corpo (DURAND et al., 2009).

Além da hidrólise do amido, há também a degradação de outros carboidratos constituintes da parede celular, como os β -glucanos e arabinosilanos, que em altas concentrações são conhecidos por causar problemas como baixo rendimento, dificuldades de filtração e aumento da turbidez do produto (BAMFORTH, 2009; DURAND et al., 2009).

As proteínas também são degradadas durante a mostura. Essa degradação começa na malteação da cevada, junto com os carboidratos da parede celular, resultando na liberação dos grânulos de amido na matriz do endosperma do grão. No geral, 22% das proteínas solúveis no malte já estavam presentes na cevada não germinada, 46% são liberadas durante a malteação e o restante (12%) é liberado durante a mostura (SHUMIN et al., 2014).

Para maximizar a ação enzimática, a mostura é conduzida através de temperaturas, tempos e pH controlados. Usualmente, para que isso aconteça, são feitos repousos às temperaturas de atividade ótima de cada enzima ou grupo de enzimas (BRIGGS et al., 2004). Desta maneira, a atividade enzimática está intimamente ligada ao processo de mostura e, por isso, a manutenção da temperatura é fundamental.

Na Figura 2 é possível observar repousos nas temperaturas de 50, 62, 72 e 78 °C. Estes repousos tem como objetivo maximizar a ação das proteases, β -amilase, α -amilase e inativação enzimática, respectivamente (BRANDAM et al., 2003; HU et al., 2014; KUNZE, 2014). Além destas, há a ação de enzimas citolíticas (β -glucanases e arabinosilanas), que atuam degradando a parede celular do malte de cevada (BAMFORTH, 2009), da dextrinase limite e da amiloglicosidase, ambas enzimas amilolíticas, onde a primeira atua hidrolisando ligações 1,6- α -D-glicosídicas e a segunda atua removendo uma só molécula de glicose das extremidades não redutoras do amido (ligação 1,4- α -D-glicosídica) (GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010; VRIESEKOOOP et al., 2010).

Assim, o diagrama de mostura é feito para maximizar a atividade de algumas enzimas, em especial as α e β amilases. Estas são as principais enzimas amilolíticas presentes no mosto, pois são responsáveis pela hidrólise do amido. As demais enzimas amilolíticas citadas não estão ativas na mostura, ou porque sua temperatura ótima é abaixo da temperatura de gelatinização do amido (35-40°C para a amiloglicosidase e 45 a 55°C para a dextrinase limite) ou, no caso da dextrinase limite, pela presença de um inibidor proteico (DURAND et al., 2009; GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010; VRIESEKOOOP et al., 2010). Outra enzima que tem pouca atividade durante a mostura devido a sua baixa temperatura de

atuação é a invertase. Esta enzima atua hidrolisando moléculas de sacarose e tem atividade máxima entre 33 e 35°C (VRIESEKOOOP et al., 2010).

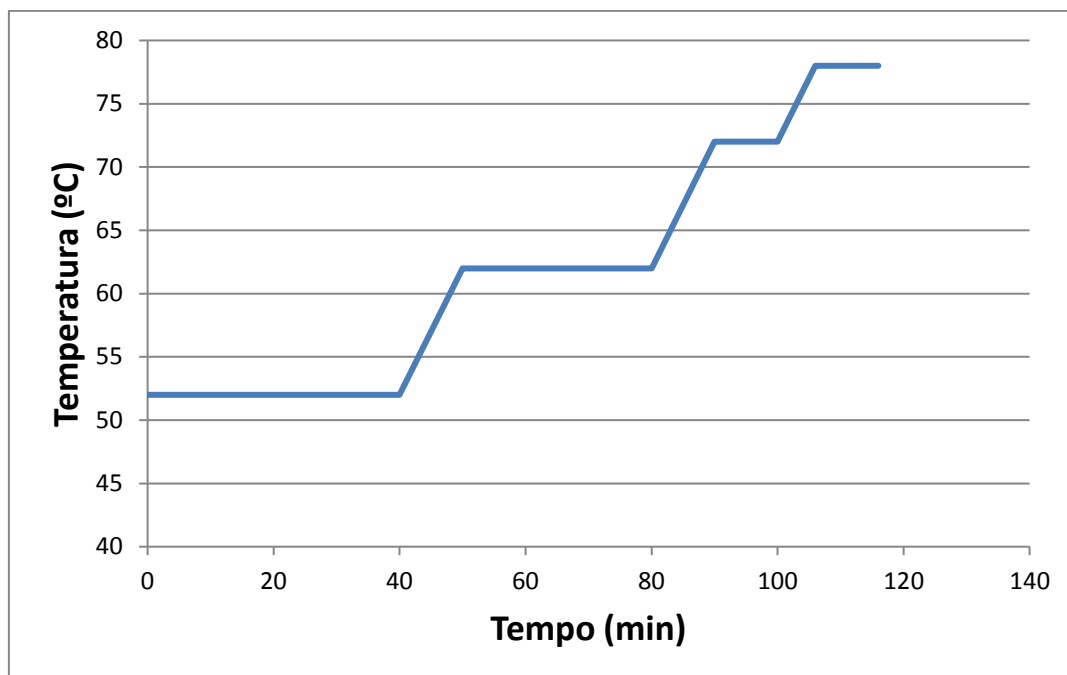


Figura 2: Diagrama do tempo e temperatura de mostura da cerveja tipo Pilsen (KUNZE, 2014)

O processo de mostura não tem uma duração definida, mas para cervejas do tipo *American Lager*, o tempo fica entre 90 e 120 minutos, conforme pode ser observado no diagrama de tempo e temperatura da mostura na Figura 2 (KUNZE, 2014).

Na sala de brassagem, a mostura e a fervura são as etapas onde há mais consumo de energia, principalmente na forma de vapor, e esta demanda está situada entre 20 a 25 MJ/h/L de cerveja produzida (MUSTER-SLAWITSCH et al., 2011; OLAJIRE, 2012). Desse modo, 30 a 60% da energia térmica de uma fábrica de cerveja são utilizados na brassagem (OLAJIRE, 2012). Já em relação somente à etapa de mostura, o consumo de energia está entre 7,2 e 9,0 MJ/h/L de cerveja, segundo Olajire (2012). Entre as possibilidades de economia de energia na sala de brassagem, a utilização de painéis solares na mostura tem alto potencial de aplicação (MUSTER-SLAWITSCH et al., 2011), assim como a alta pressão hidrostática conforme discutido mais adiante.

2.4. Amido e Sua Hidrólise Durante a Mostura

2.4.1. O Amido

O amido no grão de cevada corresponde a aproximadamente 58% do grão em relação ao peso seco, e possui de 75 a 80 % de amilopectina e 20 a 25 % de amilose (PREEDY, 2011; YOSHIMOTO et al., 2000). No malte de cevada, o amido está presente basicamente no endosperma, em organelas chamadas amiloplastos, e seus grânulos estão circundados pelas paredes celulares, no caso de regiões não modificadas durante o processo de malteio, ou seja, onde não houve degradação da parede celular pelas hemicelulases da cevada (BRIGGS et al., 2004). Os grânulos de amido da cevada são compostos por uma mistura de grânulos maiores (10 a 30 μm) e menores (menores do que 6 μm). Os maiores são responsáveis por 10 a 20% do número de grânulos e 85 a 90% do peso total de amido (BEMILLER; WHISTLER, 2009). No entanto, apesar do amido compor a maior parte dos grânulos estão presentes proteínas, lipídios e cinzas (BAMFORTH, 2003).

Os grânulos de amido possuem partes cristalinas e amorfas de maneira alternada e esta característica pode ser observada pela análise de difração de raios-x. Além disso, a região amorfa é mais facilmente atacada por enzimas e é onde a amilose está presente em maior quantidade (IMBERTY et al., 1991; TANG; MITSUNAGA; KAWAMURA, 2004).

Outra característica do amido é que quando ele é colocado no microscópio sob uma luz polarizada, seus grânulos apresentam um formato de uma cruz de malta (Figura 3) e isso acontece pela sua característica birrefringente (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). A perda desta estrutura cristalina e, portanto, da birrefringência, ocorre quando o amido é aquecido e indica uma perda na ordenação do grânulo. Esta observação é utilizada para determinar a temperatura de gelatinização (BEMILLER; WHISTLER, 2009).

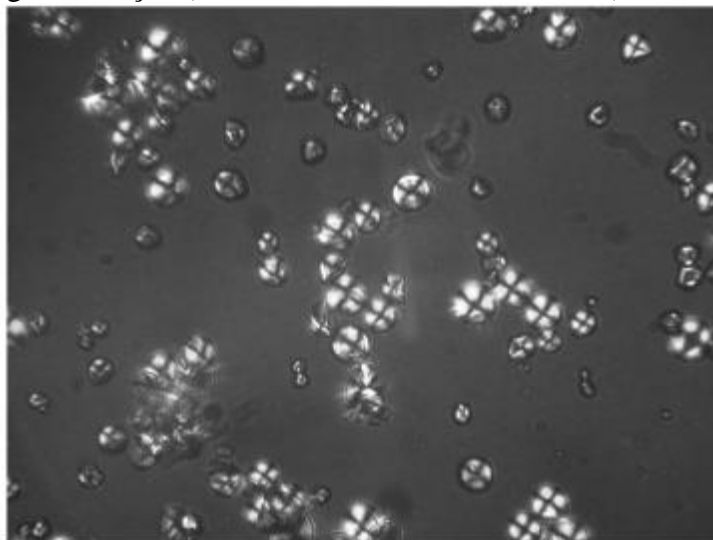


Figura 3: Cruz de malta presente no amido não gelatinizado, observado em microscópio sob luz polarizada (MILLAN-TESTA et al., 2005)

2.4.2. Gelatinização

De acordo com BeMiller e Whistler (2009), quando o amido é aquecido em presença de água em excesso, ele entra numa transição entre a fase ordenada e desordenada em um intervalo de temperatura que varia conforme a fonte de amido. Nesta transição, a água é difundida para dentro do grânulo e há captação de água para a região amorfa do amido, onde está localizada a amilose (JENKINS; DONALD, 1998; LAURO; POUTANEN; FORSELL, 2000). Com isso há um inchamento do grânulo e vazamento da amilose para fora dele e é perdida a ordem molecular e cristalina, não sendo mais possível observar a cruz de malta que antes estava presente no amido. Isso pode ser observado através da microscopia por luz polarizada e pelo equipamento calorímetro diferencial de varredura (DSC) (BEMILLER; WHISTLER, 2009).

No malte de cevada, as paredes celulares compostas por polissacarídeos e os grânulos de amido, ambos presentes no endosperma do grão, estão cobertos por proteínas que impedem a aproximação e posterior degradação deles. Assim, os grânulos não conseguem ser completamente degradados até que se aproxime a temperatura de gelatinização e que eles consigam ser rompidos. Para a cevada malteada, a temperatura de gelatinização está entre 64 e 67°C (BAMFORTH, 2003; BRIGGS, 2002; HOLTZ et al., 2015). No entanto, não é possível afirmar que o amido só é convertido acima da temperatura de gelatinização, mesmo assim, a hidrólise procede de maneira mais acelerada após o rompimento dos grânulos (BRIGGS et al., 2004).

Diante disso, a gelatinização representa uma etapa importante para a digestibilidade do amido pelas enzimas amilolíticas, em especial as amilases (HU et al., 2014). Esta

característica tem sido atribuída a vários fatores como o conteúdo de amilose no grânulo, os complexos entre amilose e lipídios, a presença de buracos prévios nos grânulos (VASANTHAN; BHATTY, 1996), a cultivar, o tamanho dos grânulos de amido e a proporção de grânulos maiores que são hidrolisados mais rapidamente. Apesar de se esperar que os grânulos pequenos gelatinizem antes, não é o que acontece na prática (GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010). Apesar destes fatores, segundo Tang et al. (2004) durante a gelatinização as ligações de hidrogênio entre as moléculas de amido se rompem e são substituídas por ligações de hidrogênio com a água fazendo com que a influência dos lipídios e outros componentes seja minimizada para estabilização do gel e retenção de água.

2.5. Enzimas Amilolíticas

2.5.1. α -amilase

A α -amilase do malte é uma mistura de isoenzimas que possuem diferentes propriedades e são formadas durante o processo de malteação. A α amilase-II é aquela que está presente em maior quantidade no malte. É relativamente termoestável, especialmente em presença de excesso de íons cálcio, e é inibida pela presença de ácido fítico (MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005). Possui um pH ótimo de atuação de 5,3 e é instável em pH abaixo de 4,9. Esta enzima atua de forma aleatória em ligações ligação 1,4- α -D-glicosídica tanto da amilose quanto da amilopectina, tendo como produtos principais as dextrinas ramificadas ou não, mas também é capaz de produzir açúcares menores como glicose e maltose (BRIGGS et al., 2004; BUCKOW; HEINZ; KNORR, 2005; GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010; MACGREGOR et al., 1999).

Em mostos concentrados (*high gravity*), ou seja, em que a relação água/malte é baixa, a α -amilase não atua tão bem, pois nessas condições ela é inibida pela alta concentração de açúcares produzidos (BAMFORTH, 2009).

Já em relação à temperatura, esta enzima tem atividade máxima no intervalo de 70 a 75°C e é associada ao repouso de sacarificação no processo de mostura, onde o amido é totalmente convertido em açúcares. Para verificar sacarificação total executa-se o teste do iodo, conforme descrito no item 3.3.4 (BRANDAM et al., 2003; MONTANARI et al., 2005).

2.5.2. β -amilase

A β -amilase é uma enzima já presente na cevada nas formas solúvel e insolúvel, diferentemente da α -amilase, que é formada durante o processo de malteio do grão (BRIGGS et al., 2004). Segundo Buttimer e Briggs (2000), a enzima solúvel no mosto possui diversas formas e pesos moleculares, entre eles está um dímero que se liga à proteína Z através de ligação dissulfeto. A proteína Z, junto com outras proteínas, é um dos componentes que atua favorecendo a formação da espuma da cerveja e também causa turvação na bebida (EVANS; SHEEHAN; STEWART, 1999; SILVA; FERREIRA; TEIXEIRA, 2006). Comparado com a α -amilase, a β -amilase é menos resistente ao calor e metais pesados, no entanto é resistente à acidez e agentes quelantes.

De acordo com Briggs et al. (2004), β -amilases de cultivares de cevada diferentes possuem comportamentos distintos diante da temperatura. Aquelas que são mais estáveis produzem mosto com maior quantidade de açúcares fermentescíveis. Além disso, possui pH ótimo de atuação entre 5,0 e 5,3 e atua catalisando a hidrólise das ligações 1,4- α -D-glicosídicas da amilose e amilopectina, através da extremidade não redutora dessas cadeias de glicose, liberando prioritariamente o dissacarídeo maltose (GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010; MACGREGOR et al., 1999). No entanto, ela não consegue hidrolisar ligações deste tipo muito próximas às ramificações das ligações 1,6- α -D-glicosídicas presentes na amilopectina ou nas dextrinas. Assim, a α -amilase trabalha de maneira

cooperativa com a β -amilase, pois vai liberando terminações não redutoras para a atuação da β -amilase, o que revela que a ação conjunta das enzimas amilolíticas é que permite a hidrólise mais efetiva do amido (BAMFORTH, 2009).

2.6. Carboidratos presentes no mosto

A hidrólise do amido do malte de cevada durante a produção de mosto resulta na formação dos açúcares fermentescíveis e não fermentescíveis pela levedura, na etapa de fermentação (BRANDAM et al., 2003). Os fermentescíveis resultarão na produção de álcool, gás carbônico e outros subprodutos de fermentação, e os não fermentescíveis permanecerão no produto pronto, mesmo após a sua fermentação completa, pois a levedura não é capaz de metabolizá-los (GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010; PIDDOCKE et al., 2009a). Os açúcares fermentescíveis presentes no mosto são os monossacarídeos glicose e frutose, os dissacarídeos sacarose (que não é proveniente da hidrólise do amido) e a maltose, o trissacarídeo maltotriose (Figura 4). Entre os não fermentescíveis, há as dextrinas que são carboidratos com mais de 3 unidades de glicose, sendo a maltotetraose (Figura 4) aquela presente em maior quantidade, mas também é possível citar a maltopentaose (Figura 4), maltohexaose e a maltoheptaose (RAKETE; KLAUS; GLOMB, 2014). De acordo com MacGregor et al. (1999), de 75 a 80% do total de açúcares presentes no mosto são fermentescíveis e somente 20 a 25% permanece no mosto na forma de dextrinas. Estas contribuem para o corpo da cerveja, que é uma característica de viscosidade, e com o valor calórico do produto final.

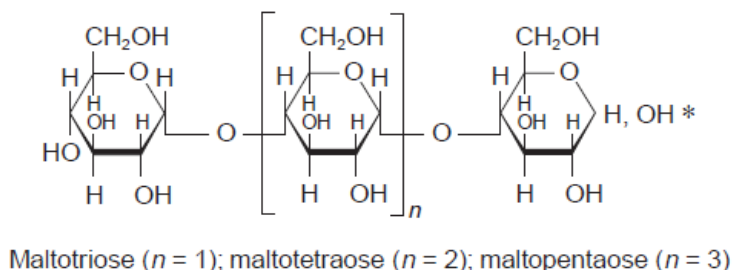


Figura 4: Estrutura molecular de alguns açúcares fermentescíveis do mosto: maltotriose, maltotetraose e maltopentaose (BRIGGS et al., 2004)

Na produção de cerveja, a medição de extrato consiste na porcentagem de sólidos solúveis no mosto ou na cerveja e pode ser feita, entre outros métodos, pela determinação da densidade da amostra. Os carboidratos correspondem a 92 % dos sólidos solúveis, segundo Briggs et al. (2004), e isto significa que em somente 8 % do extrato estão todos os outros sólidos solúveis presentes na cerveja, como proteínas, polifenóis, minerais, etc. Em relação aos tipos de açúcares presentes, Briggs et al. (2004) fizeram um levantamento de um mosto com 12 % (peso/volume) de extrato com 69,2 a 77,5 % de açúcares fermentescíveis, conteria de 7,5 a 10 % correspondente ao teor de glicose mais frutose, 3,3 a 4,2 % de sacarose, 46,7 a 49,2 % de maltose e 11,7 a 14,2 % de maltotriose. A partir destes dados, é possível verificar que a maltose (Figura 5) é o açúcar mais abundante e, portanto, mais importante do mosto cervejeiro.

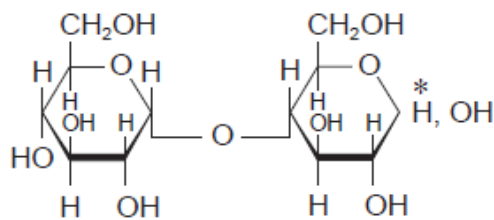


Figura 5: Estrutura molecular da Maltose: açúcar mais abundante no malte cervejeiro (BRIGGS et al., 2004)

Na produção de cerveja, ao final da etapa de mostura, quando todo o amido já foi hidrolisado pelas enzimas, é feita uma análise qualitativa com iodo no mosto cervejeiro. A amilose, que tem a forma de hélice, ou dextrinas com 6 a 8 unidades de glicose, reage com o iodo resultando em uma cor azul escura (HOLTZ et al., 2015; PUTSEYS et al., 2010). Nesta análise, avalia-se a presença de amido, pois caso este amido passe para a próxima etapa, a clarificação do mosto fica prejudicada ou até mesmo impedida, uma vez que o amido aumenta a viscosidade da solução. Desta maneira, a ausência de amido se torna fundamental para o transcorrer do processo de mostura (HOLTZ; GASTL; BECKER, 2015; KÜHBECK; BACK; KROTTENTHALER, 2006). Essa análise só se torna viável, pois o teor de lipídios do mosto cervejeiro é baixo, pois a presença de lipídios pode gerar um resultado errôneo, já que se complexam com a amilose no lugar do iodo (KUNZE, 2014).

2.7. Alta Pressão

A alta pressão (AP) é um método não térmico e não tradicional para a conservação de alimentos. Tem se tornado cada vez mais interessante frente ao processo térmico, pois modifica minimamente os alimentos e bebidas (PATTERSON, 2005). A aplicação de alta pressão comparada com processos térmicos afeta muito pouco pequenas moléculas como as substâncias responsáveis pelo sabor e aroma, vitaminas e pigmentos,. Assim, a qualidade do produto processados por AP em alimentos é muito similar ao produto fresco (RASTOGI, 2013).

A tecnologia de alta pressão pode reduzir a carga microbiana de alimentos e atenuar o uso de conservantes químicos. Com a AP, é possível manter a qualidade de um produto ao longo do tempo (CHEFTEL, 1995; FARKAS; HOOVER, 2000), mudar certas propriedades físicas e funcionais de alimentos (RASTOGI, 2013) e desenvolver estudos sobre transições de fase da água sob pressões extremas, como por exemplo, o abaixamento do ponto de congelamento com o aumento da pressão (KALICHEVSKY; KNORR; LILLFORD, 1995; KNORR; SCHLUETER; HEINZ, 1998).

A primeira pesquisa feita com este tipo de tratamento foi no século XVIII por Hite (1899), que descreveu um aumento no tempo de vida útil de alimentos como frutas e leite, mas a AP só começou a ser desenvolvida cientificamente e aplicada industrialmente para alimentos e bebidas mais recentemente, devido ao alto custo dos equipamentos (RENDUELES et al., 2011), e por consistir essencialmente de um processo não contínuo (em bateladas), especificamente no tocante ao processo de alta pressão hidrostática. Com as melhorias feitas nos equipamentos de AP, aliado a demanda por alimentos mais saudáveis e mais próximos aos naturais, a aplicação industrial no caso do processo de alta pressão hidrostática, se difundiu com pressões de 100 a 1000 MPa e tempos de exposição ou pulsos de milissegundos à acima de 20 minutos (PFLANZER et al., 2008). Segundo Castellari et al. (2000), o Japão foi o primeiro país a processar industrialmente sucos de frutas, geleias e carne por alta pressão. Entre as bebidas alcoólicas, os primeiros resultados foram com vinho de arroz, em que conseguiu-se uma inibição total de leveduras e bactérias lácticas, sem afetar as características sensoriais da bebida (HARA et al., 1990).

De acordo com Huang et al. (2014), nos últimos 5 anos o número de equipamentos industriais de alta pressão praticamente dobraram ao redor do mundo e são entre 200 e 240 e movimentam 10 bilhões de dólares/ano e com tendência de crescimento. Em 2010, existiam cerca de 160 unidades de equipamentos de alta pressão, processando 250.000 toneladas de vegetais (33%), carne (30%), pescado (15%) e sucos e bebidas (12%), sendo 71 indústrias no continente americano, 26 na Europa, 22 na Ásia e 5 na Oceania (CAMPUS, 2010; MÚJICA-PAZ et al., 2011).

No Brasil, em 2013, iniciou-se a comercialização de sucos de fruta processados por alta pressão e, em 2014, o processamento industrial de frios, como presunto e queijos.

O processamento por alta pressão pode ser aplicado como pasteurização ou esterilização não térmica. No caso da pasteurização, a alta pressão se mostrou tão eficaz quanto o tratamento térmico na destruição de microrganismos patogênicos e deteriorantes (RASTOGI, 2013). Industrialmente o mais comum é a pasteurização, comercialmente denominada de pasteurização a frio.

Além disso, existem dois tipos de processo: a homogeneização por alta pressão e alta pressão hidrostática. O primeiro processo consiste em passar um líquido através de um pequeno orifício o que faz com que ele atinja alta pressão e alto fluxo, o que causa efeitos reológicos no fluido como turbulência, cavitação e forças de cisalhamento (LACROIX; FLISS; MAKHLOUF, 2005). Já a alta pressão hidrostática difere mecanicamente da homogeneização por alta pressão e é basicamente um processo por batelada onde o produto já embalado é submetido à alta pressão. Este processo já é realidade para vários tipos de alimentos e bebidas e, entre as novas tecnologias para a conservação de alimentos, a alta pressão hidrostática é a mais utilizada (BUZRUL, 2012).

A aplicação de alta pressão hidrostática é baseada em dois princípios físicos: Le Chatelier e pressão isostática. O princípio de Le Chatelier considera que a pressão favorece todas as reações estruturais e mudanças que envolvam uma diminuição de volume, como por exemplo, as transformações na água, que diminui seu volume em 15 % quando submetida a uma pressão de 600 MPa em temperatura constante. Já o princípio isostático propõe que a distribuição da pressão é proporcional e instantâneo em todas as partes do sólido ou líquido, independente do seu formato ou tamanho (BARBA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2012; MÚJICA-PAZ et al., 2011; PFLANZER et al., 2008). Além disso, a variação de temperatura é pequena, conforme o produto é pressurizado, pois a temperatura aumenta cerca de 3 °C a cada 100 MPa, o que depende, porém, da composição do alimento ou bebida (SMELT, 1998; WILSON et al., 2008). Tais propriedades previnem o alimento de ser severamente deformado ou aquecido, o que modificaria suas características organolépticas (RENDUELES et al., 2011).

O equipamento de alta pressão hidrostática é composto por uma câmara de pressão (usualmente fabricada a partir de um bloco de aço), um sistema de geração de pressão, sistemas de monitoramento de pressão e temperatura e o sistema operacional. A pressão é aplicada ao alimento ou bebida pré-embalados através do bombeamento de água no interior da câmara, que é o que de fato transmite a pressão ao produto. Como a água, que é o meio mais utilizado para exercer a pressão, envolve completamente o alimento, a pressão é aplicada igualmente por todos os lados e impede a perda da forma do produto durante o tratamento. O processo pode ser conduzido à temperatura ambiente ou refrigerado, para evitar a formação de compostos de degradação, devido ao aquecimento, que poderiam alterar sensorialmente o alimento ou bebida, bem como degradar nutrientes e compostos funcionais. O sistema gerador de pressão causa um leve aumento de temperatura do produto, e por isso se torna importante controlá-la (PFLANZER et al., 2008; RASTOGI, 2013), sobretudo quando se trabalha com níveis de pressão muito elevados. Além disso, pode também possibilitar certa elevação intencional de temperatura, quando em certos casos se torna interessante utilizar uma combinação entre processos térmico e de alta pressão. E isso torna-se possível através do

bombeamento de água fria ou quente ao redor da câmara de pressão encamisada (MERTENS; DEPLACE, 1993).

O tratamento por alta pressão hidrostática, de uma forma geral, é dividido em três etapas: *come up time*, *holding time* e descompressão. O *come up time* é o tempo de subida da pressão, o *holding time* é o tempo de processamento ao nível programado de pressão, e a descompressão é o tempo para que a pressão retorne ao nível inicial. Tanto o *come up time* quanto a descompressão ocorrem quase que instantaneamente, porém com possibilidade de controle da taxa de pressurização e descompressão, dependendo do tipo de equipamento,. Durante a descompressão, o alimento ou bebida esfriam até a temperatura de antes do processo, caso não haja perda ou ganho de calor através da câmara de pressão durante o tempo de aplicação da pressão (RASTOGI, 2013).

Em relação à inativação de microrganismos pelo processo de alta pressão, a sua efetividade depende da pressão e o tempo de aplicação e da resistência dos microrganismos. A barorresistência microbiana é variável e depende em grande parte do tipo de alimento e do microrganismo, sendo mais resistentes aqueles com menor grau de organização e complexidade (RENDUELES et al., 2011).

Em pressões altas, a morte microbiana acontece principalmente pela modificação na parede e membranas celulares, pois estas se tornam mais permeáveis (PFLANZER et al., 2008; RASTOGI, 2013). Além disso, há a desnaturação de enzimas chaves e a cristalização de fosfolipídios da membrana celular (PFLANZER et al., 2008). Nesse sentido, à uma pressão de 400 MPa, a estrutura e organelas citoplasmáticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* perderam sua forma e levaram ao vazamento de grandes quantidades de material intracelular, enquanto que a 500 MPa este material foi totalmente perdido e o núcleo da célula não foi reconhecido (FARR, 1990; OSUMI et al., 1996). Já esporos bacterianos necessitam de uma pressão acima de 1200 MPa para serem inativados (RASTOGI, 2013) ou, então, de tratamentos de alta pressão combinados com elevadas temperaturas.

No caso de cerveja, uma possível aplicação é no produto acabado e pronto para ser consumido. Neste caso, o objetivo é a eliminação de microrganismos deteriorantes presentes na cerveja que diminuem seu tempo de vida útil. Usualmente, a cerveja passa por pasteurização térmica e a alta pressão é uma alternativa de processo não térmico de conservação. Alguns estudos descrevem o efeito da alta pressão na cerveja como benéfico e eficaz (BUZRUL, 2012; CASTELLARI et al., 2000; FRANCHI; TRIBST; CRISTIANINI, 2011a; PÉREZ-LAMELA; REED; SIMAL-GÁNDARA, 2004). Este assunto será tratado de forma mais profunda no item 2.10.

2.8. Enzimas e a Alta Pressão

Segundo Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera (2009), em 1977 foi descoberto em uma fenda subaquática nas Ilhas Galápagos um ecossistema completo de microrganismos que sobrevivem em condições extremas de temperatura e pressão (acima de 120 MPa e entre 2 e 100°C). A descoberta destes microrganismos permitiu o desenvolvimento de pesquisas na área de modificações enzimáticas em altas pressões, tendo sido descobertas várias modificações estruturais e aplicações e de enzimas quando submetidas a alta pressão. O processamento por alta pressão hidrostática já foi implantado na indústria de alimentos e farmacêutica com sucesso para pasteurização e esterilização, mas aplicá-lo para melhorar a catálise enzimática ainda requer mais estudos (EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009; MOZHAEV et al., 1996; NORTHROP, 2002).

A utilização de enzimas em indústrias ainda é preterida em muitos casos, devido a instabilidade em seu estado natural e ao custo elevado, comparadas com a via química de uma

reação, e com isso há um grande interesse em melhorar a atividade e estabilidade enzimática (EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009).

Segundo Mozhaev et al. (1996), os efeitos da alta pressão se tornam mais pronunciados quando combinados com uma mudança significativa na hidratação da proteína, o que em parte pode se dar pelo próprio processo de alta pressão. Uma diminuição no conteúdo de água de um sistema aumenta a temperatura na qual proteínas desnaturam reversivelmente, além da desnaturação irreversível também ser mais lenta neste tipo de situação. Em materiais em pó ou em ausência completa de água, a estabilidade da proteína à desnaturação em altas temperaturas é ainda mais acentuada. Ainda conforme pesquisado por estes autores, o processo de alta pressão se provou eficiente para estimular a catálise enzimática proteolítica e desacelerar a desnaturação térmica da α -quimotripsina. Foi observada tanto uma ativação quanto uma estabilização em pressões mais elevadas até um ponto crítico.

Apesar dos mecanismos de estabilização enzimática por alta pressão ainda não terem sido completamente explicados, Eisenmenger e Reyes-de-Corcuera (2009) sugerem que a hidratação de grupos dissociados com carga iônica, interações intermoleculares e estabilização das ligações de hidrogênio são fatores que podem estar correlacionados. Durante a aplicação de alta pressão, há uma diminuição da distância entre os átomos da molécula de proteína o que pode ser um motivo para as ligações de hidrogênio serem fortalecidas durante o processo (HEINZ; BUCKOW; KNORR, 2005; KUNUGI, 1992).

Em relação à ativação enzimática através da alta pressão, esta pode ser devido a mudanças diretas na estrutura da enzima, mudanças no mecanismo de reação ou até mudanças físicas no solvente ou substrato, como pH, densidade ou viscosidade, por exemplo (EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009).

Dependendo da pressão aplicada, algumas enzimas ficam mais estáveis, no entanto, quando a pressão se torna mais alta, pode ocorrer perda total da atividade, devido a modificação do sítio ativo, pelo desdobramento completo ou parcial da estrutura enzimática (GOMES; CLARK; LEDWARD, 1998).

2.8.1. α e β amilases e a alta pressão

A α -amilase foi estudada por Buckow et al. (2007) que concluíram que é possível desnaturar esta enzima com aplicação de alta pressão, mesmo a temperatura ambiente. No entanto, relataram um efeito antagônico entre pressão e temperatura na desnaturação dessa enzima até 200 MPa, pois a pressão estabilizou a enzima mesmo em temperaturas mais altas como 60°C. No entanto, acima dessa pressão, o efeito passa a ser sinérgico, uma vez que acima de 200 MPa e em temperaturas elevadas a inativação desta enzima foi acelerada. Um exemplo deste efeito observado pelos autores foi que a 152 MPa e 64°C a conversão de substrato foi 25% maior do que a 59°C e pressão ambiente. Além disso, os autores verificaram que a α -amilase é mais resistente tanto ao calor quanto à pressão em presença de íons cálcio (3,8 mM de CaCl₂) e em pH de 6,1.

No caso da β -amilase, Heinz, Buckow e Knorr (2005) verificaram que a 200 MPa houve uma significativa estabilização da enzima contra a desnaturação pelo calor. No entanto, o aumento da pressão também dificultou a reação catalítica desta enzima para todas as temperaturas testadas (20 a 70 °C). A melhor condição de atuação deu-se a 106 MPa, 63 °C e pH 5,6 que gerou um rendimento de conversão em maltose 15 % superior e a temperatura 7 °C acima do que seria ideal com uma pressão ambiente (0,1 MPa).

Gomes, Clark e Ledward (1998) estudaram o efeito da alta pressão sobre as amilases dos amidos de trigo e cevada. Neste estudo, foi possível observar que o tratamento com alta pressão levou a um aumento expressivo no total de carboidratos solúveis e açúcares redutores quando as farinhas foram submetidas de 400 a 600 MPa por 10 e 20 minutos à temperatura ambiente. O teor total de carboidratos solúveis foi maior quando as amostras foram

pressurizadas a 600 MPa por 10 minutos, comparado com 20 minutos. Já em pressões de 100 a 300 MPa, os níveis de carboidratos totais e açúcares redutores foram similares àqueles observados nas amostras não tratadas, e em 700 a 800 MPa, tais níveis foram similares ou menores do que os controles. Concluiu-se, então, que tratamentos a 400 - 600 MPa levam a um aumento expressivo da atividade das enzimas que degradam o amido. Porém, em tratamentos de 700 a 800 MPa, o rendimento de formação de açúcares reduz muito, indicando que nesta faixa de pressão as amilases já perderam a sua atividade. Em suma, a perda de atividade das amilases mostrou-se dependente do tempo e da pressão.

Já Pérez-Lamela et al. (2002) verificaram maiores valores de açúcares solúveis em amostras de mosto cervejeiro tratadas a 600 MPa e 20 minutos. Acima desta pressão, houve redução na formação de açúcares, o que pode ser explicado pela inativação das enzimas responsáveis pela hidrólise do amido. Os autores verificaram também que em tratamentos entre 400 e 600 MPa, o conteúdo de sacarose dobrou quando comparado com pressões mais baixas (50 a 200 MPa), mas mesmo assim observaram teores de sacarose inferiores, comparado com o aquecimento tradicional (65 °C por 35 minutos). Através destes estudos, foi também possível verificar que a perda de atividade das amilases é dependente do tempo e da pressão, pois em tempos acima de 20 minutos houve redução na formação de açúcares totais.

Desta maneira, tanto para a α quanto para a β -amilase, a alta pressão mostrou ser eficiente para aumentar o poder de hidrólise destas enzimas em faixas intermediárias de pressão (400 a 600 MPa), sendo susceptíveis à inativação em pressões superiores (EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009).

2.8.2. Outras enzimas importantes na mostura e a alta pressão

A amiloglicosidase foi estudada no mosto cervejeiro por Fischer et al. (2006), em pressões de 0,1 a 1200 MPa de 20 a 90 °C por vários tempos, sendo constatado que a atividade máxima de conversão de glicose a partir de maltose ocorreu a 370 MPa e 85 °C, resultando em um aumento de 35% em comparação com o tratamento a 65 °C e 0,1 MPa. A resistência máxima da enzima à temperatura foi verificada a 700 MPa, e para obter-se 90% de inativação, foi necessário atingir-se 105 °C nesta mesma pressão.

Outra enzima presente no malte de cevada que também é afetada pela alta pressão é a invertase. Eisenmenger e Reyes-de-Corcuera (2009) verificaram que esta enzima se comporta diferentemente em relação à pressão e à temperatura, levando a diferentes mecanismos de desnaturação. Também foi verificado que a meia vida da invertase da *Saccharomyces cerevisiae* aumentou a 60°C, conforme aumentou-se a pressão de 50 para 200 MPa. Já Butz et al. (2003) verificaram que a invertase da levedura de panificação se mostrou estável à pressão acima de 600 MPa.

2.9. O Amido e a Alta Pressão

Além do aquecimento, a alta pressão também foi relatada como sendo uma opção para iniciar a gelatinização do amido e passível de digestão pelas amilases (BUCKOW; HEINZ; KNORR, 2005; DOUZALS et al., 1996; SELMI et al., 2000).

Stolt, Oinonen e Autio (2000) estudaram o efeito da alta pressão nas propriedades físicas do amido de cevada. Neste estudo, foi utilizada uma faixa de pressão entre 400 e 600 MPa a uma temperatura de aproximadamente 30 °C e foi verificado que, quando uma suspensão de amido é submetida a uma pressão acima de 200 MPa, a gelatinização acontece em uma faixa de temperatura menor do quando aquecido a pressão ambiente. Se a pressão for alta o suficiente, a gelatinização pode acontecer mesmo em temperatura ambiente. Através de análises de microscopia, foi possível observar que a estrutura do grânulo de amido foi mantida mesmo depois de 50 minutos a 600 MPa, mas a birrefringência foi quase que totalmente perdida após 30 minutos a 450 MPa e zero minutos a 600 MPa (neste último caso, houve

imediate despressurização após atingimento de 600 MPa). Ainda neste estudo, foi comparado o intumescimento dos grânulos de amido tratados termicamente com aqueles tratados com alta pressão. Através de análises de microscopia na presença de iodo foi constatada a cor azul escura dada pela reação entre a amilose e o iodo, porém o vazamento de amilose para o meio só foi verificado na amostra tratada termicamente. Esse intumescimento restrito sob pressão pode ter sido devido ao fato de que a amilose pode estar estabilizando a estrutura do grânulo de amido. Um exemplo disso é que grânulos de amido de milhos cerosos, com baixo teor de amilose, se desintegram sob pressão, enquanto que grânulos de amido de milho com maior teor de amilose mantêm sua estrutura original até em pressões altas, como 900 MPa (STOLT, OINONEN e AUTIO, 2000).

Outros autores verificaram a gelatinização do amido com aplicação de alta pressão. No caso de Pérez-Lamela et al. (2002) e Gomes, Clark e Ledward (1998), foi verificado que os grânulos de amido do malte de cevada depois de moído começaram a romper a 400 MPa, o que ficou mais evidente a 600 MPa.

2.10. Cervejas processadas por alta pressão

Em relação à cerveja, atualmente o tratamento térmico envolve uma pasteurização do tipo flash, seguido de envase asséptico geralmente em barris de aço inoxidável, ou do tipo túnel, onde a cerveja é envasada em garrafas ou latas que são depois pasteurizadas em túneis de pasteurização (BUZRUL, 2007; BUZRUL; ALPAS; BOZOGLU, 2005a; FEILNER; JACOB, 2015). No entanto, o calor pode causar a desnaturação de proteínas que promovem a formação de novos complexos proteína-tanino, com consequente aumento de turbidez. Além disso, o processo térmico promove a reação de Maillard, que torna a coloração da bebida mais avermelhada, e gera produtos de envelhecimento e oxidação, como o trans-2-nonenal, associado ao aroma “de papelão”. Mais ainda, o pasteurização promove a isomerização dos α ácidos presentes no lúpulo, os quais aumentam o amargor da cerveja e, dessa forma, a pasteurização promove diversas mudanças sensoriais na cerveja, em diversos casos indesejáveis (FRANCHI; TRIBST; CRISTIANINI, 2011b). Desta forma, para preservar o frescor da cerveja, um método de pasteurização que não utilizasse calor seria uma grande vantagem para as cervejarias (BUZRUL, 2012) e, nesse sentido, a Alta Pressão (AP) surge como uma possível alternativa para o processamento de cerveja com melhor qualidade sensorial.

Buzrul et al. (2005a) compararam cervejas tratadas com alta pressão com cervejas tratadas com processo térmico, e observaram que nenhuma delas foi afetada em relação aos teores de etanol, extrato (real, aparente e original), grau de fermentação, densidade e pH, mesmo com tratamento a 600 MPa por 5 minutos, similarmente ao verificado por Castellari et al. (2000). Ainda segundo Buzrul et al. (2005a), os resultados indicaram que é possível utilizar-se pressões abaixo de 350 MPa e garantir uma estabilização da cerveja, sem que os atributos sejam significativamente afetados. Fischer et al. (1998) também compararam uma cerveja *Lager* pasteurizada termicamente (60°C por 2 minutos) e amostras pressurizadas a 300, 500 e 700 MPa por 5 minutos, e também não encontraram diferenças na durabilidade da espuma e nas características sensoriais da cerveja. Tão pouco houve alteração na cor das amostras tratadas conforme se aumentou a pressão, nem nas amostras estocadas por até 56 dias (BUZRUL; ALPAS; BOZOGLU, 2005b). Castellari et al. (2000) também estudaram o efeito da alta pressão em cerveja colocando as amostras a 600 MPa por 5 minutos, em comparação com o tratamento térmico a 60°C por 10 minutos, e não encontraram diferença no parâmetro de luminosidade (L^*). No entanto, todos os outros parâmetros de cor (a^* , b^* e C^*) apresentaram valores mais altos para o tratamento térmico. Segundo Tamaoka, Itoh, Hayashi (1991), conforme anteriormente considerado, o tratamento a alta pressão suprime a reação de Maillard evitando, assim, um escurecimento e aparecimento de aromas não desejáveis,

explicando a não ocorrência de mudanças nos parâmetros avaliados de cor (FRANCHI; TRIBST; CRISTIANINI, 2011b).

Buzrul et al. (2005a) verificaram também um aumento na turbidez das amostras durante a pressurização (200, 250, 300 e 350 MPa / 3 e 5 min), o que também foi verificado por Buzrul et al. (2005b) para as amostras tratadas a 350 MPa por 3 e 5 minutos ao longo de 56 dias de estocagem, momento em que a turbidez a frio atingiu seu máximo. Resultados similares foram obtidos por Castellari et al. (2000), que mantiveram as amostras pressurizadas a 600 MPa / 5 min estocadas por 49 dias. Fischer et al. (1998) também verificaram que a turbidez aumentou, especialmente nos tratamentos de 500 e 700 MPa (5 min), assim como Pérez-Lamela et al. (2004), que fizeram tratamentos a 300, 400, 500 e 600 MPa / 20 min. A cerveja, quando resfriada, muitas vezes produz uma “turbidez a frio” que normalmente desaparece quando é aquecida. No entanto, uma vez que a cerveja é retirada do frio e recolocada após aquecimento, por diversas vezes, a turbidez pode se tornar permanente. A turbidez a frio é um problema ainda pior nas cervejas do tipo *Lager*, pois normalmente são servidas a uma temperatura mais baixa (BUZRUL; ALPAS; BOZOGLU, 2005a). Porém, é preciso levar em consideração que toda cerveja possui uma quantidade considerável de substâncias causadoras de turbidez. Esse aumento de turbidez nas amostras pressurizadas pode ser devido ao fato de que, em pressões mais altas (350 MPa / 5 min), há desnaturação das proteínas gerando novos sítios hidrofóbicos, pelos quais as proteínas da cerveja podem se ligar aos polifenóis e causar maior turbidez, além de uma maior exposição do grupamento sulfidrila. Já a tratamentos com pressões mais baixas (200 MPa / 3 min), haveria um rearranjo destas proteínas, diminuindo as possibilidades de reação das mesmas com polifenóis, o que em uma cerveja *Lager* se torna bem interessante, pois a ausência de turbidez é um dos fatores esperados pelos consumidores deste tipo de cerveja (BUZRUL; ALPAS; BOZOGLU, 2005b; CASTELLARI et al., 2000; FRANCHI; TRIBST; CRISTIANINI, 2011b; SIEBERT; CARRASCO; LYNN, 1996). No tratamento térmico, há uma desnaturação parcial da proteína devido ao efeito sobre as ligações químicas e alta movimentação das moléculas, enquanto que na AP há a desnaturação parcial da proteína por alteração na sua estrutura secundária, terciária e quaternária causando uma diminuição do volume da proteína quando submetida a alta pressão (CASTELLARI et al., 2000; FRANCHI; TRIBST; CRISTIANINI, 2011b). Na indústria, a cerveja é deixada a -1 ou -2 °C durante a etapa de maturação, seguida de uma filtração para a retirada de turbidez. Assim, já que o tratamento sob alta pressão aumenta a turbidez a frio das cervejas, fazê-lo a 20°C poderia ser uma alternativa para posterior estocagem a baixas temperaturas, visando a formação de turbidez (BUZRUL; ALPAS; BOZOGLU, 2005a). Outra opção para o aumento da turbidez ao longo do tempo para amostras tratadas com alta pressão seria a realização de procedimentos já adotados em cervejarias, como a estabilização físico-química através do uso de sílica gel ou polivinilpirrolidona (PVPP) (FRANCHI; TRIBST; CRISTIANINI, 2011b).

Em relação à contaminação microbiológica, Buzrul et al. (2005b) estudaram o efeito do tempo de validade de uma cerveja *Lager*. Com 1, 28 e 56 dias de armazenamento, nas amostras tratadas a 350 MPa / 3 e 5 min, não houve crescimento de colônias ao longo do armazenamento. Ressalta-se que tal preservação pode estar também relacionada com as características e componentes da cerveja, que constitui um meio ácido que contém lúpulo (agente bacteriostático), álcool e gás carbônico, que em conjunto devem aumentar de forma combinada a eficácia do tratamento à alta pressão. Resultados similares foram obtidos por Castellari et al. (2000) para cervejas *Pale Ale* e *Mild Ale* (600 MPa / 5 min), em que verificaram uma redução de 4 ciclos logarítmicos para fungos, leveduras e bactérias aeróbias totais, tanto no tratamento térmico quanto por alta pressão, não havendo em decorrência crescimento de bactérias lácticas, que são deteriorantes comumente encontrados em cervejas (WIEME et al., 2014).

Ulmer et al. (2000) investigaram os efeitos da alta pressão na sobrevivência, atividade metabólica, integridade da membrana e resistência ao lúpulo de *Lactobacillus plantarum* TMW1.460, que é uma cepa altamente resistente ao lúpulo, pois possui mecanismo de defesa HorA. O HorA é um transportador dependente de ATP de resistência a diversas drogas e que confere resistência ao lúpulo para os microrganismos deteriorantes da cerveja (ULMER et al., 2002). A observação através do brometo de etídio permite uma determinação direta deste transportador, o que torna possível a utilização do *L. plantarum* como um sistema modelo para estudo dos efeitos químicos e físicos na membrana e morte celular. A inativação do *L. plantarum* através da alta pressão envolve a inativação do HorA (GÄNZLE; ULMER; VOGEL, 2001) e a perda da sua atividade está correlacionada com a incapacidade deste microrganismo sobreviver em presença de α ácidos do lúpulo (ULMER; GÄNZLE; VOGEL, 2000). Ulmer et al. (2000) fizeram seus experimentos em uma cerveja modelo, inoculando com *L. plantarum* e tratando por alta pressão a 200, 400, 500 e 600 MPa / 15°C por diversos tempos, e constataram que a 600 MPa todas as células foram inativadas. A difusão de brometo de etídio através das membranas das células dos microrganismos pressurizados indica um dano na membrana anterior à morte celular. A pressurização a 600 MPa resultou em uma perda completa da atividade metabólica e da integridade da membrana celular. Células pressurizadas a 200 MPa / 30 a 60 min perderam sua habilidade de excluir o brometo de etídio, indicando uma perda da resistência ao lúpulo. Similarmente, Ulmer et al. (2002) observaram que com pressurização de 200, 300, 400, 500 e 600 MPa / 15°C por diversos tempos houve uma crescente inativação celular. Gänzle et al. (2001) estudaram o efeito do lúpulo e do etanol na inativação do *L. plantarum* em uma cerveja modelo, durante e depois do tratamento com alta pressão (300 MPa / 20°C em diversos tempos). A adição de etanol e extrato de lúpulo acelerou a inativação pela pressão do *L. plantarum* na cerveja modelo. Foram necessários 10 minutos para reduzir as células viáveis em 99% e as não danificadas em 99,99%, enquanto que foram necessários 6 minutos na presença de 100 mg/L de extrato de lúpulo para obter o mesmo efeito. Para diferenciar as células viáveis das danificadas, os autores inocularam o *L. plantarum* em um meio não seletivo (MRS-agar) e outro seletivo (MRS-agar com adição de 4% de NaCl). A diferença entre o crescimento no meio não seletivo e no meio seletivo, os autores chamaram de células danificadas, sendo consideradas como células viáveis as que cresceram no meio não seletivo. Além disso, Gänzle et al. (2001) adicionaram 10% de álcool e este teve um efeito ainda mais potente na inativação pela pressão do que os 100 mg/L de extrato de lúpulo. Observação análoga foi realizada por Ulmer et al. (2000) que pressurizou as amostras de 200 a 400 MPa / 15°C a diversos tempos, constatando que o tratamento com extrato de lúpulo (50 e 100 mg/L) e etanol (5 e 10%) acelerou a inativação do *L. plantarum* pela pressão em uma cerveja modelo, e que o álcool teve um efeito mais efetivo na inativação do que o lúpulo. Fischer et al. (2006) também estudaram o comportamento do *Lactobacillus plantarum* em amostras pressurizadas a 300 MPa / 20°C por até no máximo 120 minutos e verificaram que a sua inativação ocorre de forma mais eficiente em pH mais baixo, e que o efeito subletal acontece com baixos tempos de pressurização. Deve-se observar que o pH intracelular deste microrganismo é de 6,3 ou até mais alto e este valor é independente do pH extracelular. No entanto, após tratamento de 300 MPa, o pH intracelular foi igualado com o pH externo, ou seja, o *L. plantarum* perdeu seu gradiente de pH da membrana. Fischer et al. (2006) ainda fizeram um tratamento a 200 MPa e verificaram que não houve redução significativa das unidades formadoras de colônias, no entanto em uma cerveja modelo com pH 4,0, o transporte de membrana HorA foi completamente destruído, o que tornou as células sensíveis à presença de lúpulo. O mesmo comportamento não pode ser observado em *Lactobacillus brevis* que, segundo Franchi et al. (2011a), é o principal microrganismo deteriorante de bebidas fermentadas, o que sugere que

este microrganismo apresentaria uma resistência maior ao lúpulo em comparação ao *L. plantarum*, tendo sido somente inativado a 400 MPa / 40°C por 30 segundos.

Em relação ao amargor, foi verificado por Buzrul et al. (2005a) um aumento do teor de isohumulonas na cerveja em que foi realizada a pasteurização por calor (60°C / 15 min), como era de se esperar, já que a reação de isomerização do lúpulo ocorre em altas temperaturas (KING; DUINEVELD, 1999). O mesmo aumento não foi observado com o tratamento por pressão até 300 MPa / 3 e 5 min. Buzrul et al. (2005b) também encontraram valores de amargor mais altos para as amostras tratadas termicamente do que com alta pressão ao final dos 56 dias da cerveja pressurizada a 350 MPa, sendo valores iguais obtidos com 3 ou 5 minutos de pressurização, ou seja, não houve diferença de amargor devido ao diferentes tempos para as amostras tratadas por AP. Mesmo assim, as cervejas pasteurizadas com calor (60°C / 15 min) tiveram uma perda de 1,4 unidades de amargor (BU), enquanto que aquelas tratadas com pressão por (350 MPa / 3 ou 5 min) tiveram uma perda de 3,1 e 2,15 BU, respectivamente, ao final do período de armazenamento. Segundo King e Duineveld (1999), para todos os tipos de cerveja o amargor diminui com o envelhecimento, enquanto que a doçura aumenta, mudando o balanceamento do produto para adocicado. Walters et al. (1997) relataram que, para uma cerveja armazenada por 156 dias / 40°C, houve um decréscimo de 71% no teor total de iso- α -ácidos, enquanto que não houve perda quando o armazenamento foi feito a 0 ou 25°C por 220 dias. Esses dados contrariam os encontrados por Buzrul et al. (2005b) o que pode ser devido ao fato de que os tipos de cervejas usados foram diferentes, e também devido às diferentes condições experimentais.

Franchi et al. (2011b) estudaram o processo de homogeneização à alta pressão (250 MPa) aplicadas à cerveja e fizeram teste de vida útil para acompanhar suas características ao longo do tempo. Verificaram que houve uma redução no potencial redox após 100 dias de estocagem, o que provavelmente representa a formação de novos produtos estáveis com radicais óxido e peróxido que também promovem mudanças indesejáveis na cerveja. Em alguns casos, essas mudanças são tão significativas que podem resultar em uma cerveja com atributos sensoriais inaceitáveis. As substâncias mais consideradas para este tipo de problema são ácidos graxos insaturados, álcoois e iso- α -ácidos que resultam em flavours descritos como rançoso e de papelão, produzidos por compostos carbonilados, como o trans-2-nonenal.

Em relação às outras características da cerveja, Buzrul et al. (2005b) encontraram, ao final do período de armazenamento (56 dias a 20°C em amostras pressurizadas a 350 MPa / 3 e 5 min), que o pH das amostras não diferiu entre aquelas tratadas termicamente ou tratadas a alta pressão, mas nas amostras que não foram tratadas houve uma queda de 1,44 unidades de pH ao final da segunda semana, provavelmente devido a contaminação microbiológica. Além disso, Pérez-Lamela et al. (2004) verificaram um aumento na estabilidade de espuma das amostras de cervejas *Ale* e *Lager* tratadas a 300 a 600 MPa / 20 min. Essa melhora na estabilidade de espuma pode ser devido à desnaturação parcial das proteínas com a pressão, o que as torna mais hidrofóbicas (PADIERNOS et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

O malte do tipo Pilsen utilizado foi adquirido da Cooperativa Agraria (Guarapuava, PR, Brasil) e o mesmo lote foi usado em todos os experimentos.

3.2. Preparação e Pressurização das Amostras

O malte foi moído em um moinho piloto de dois rolos modelo ZSM 0-G-4704 (Seeger, Neutraubling, Alemanha) localizado no CTS Alimentos e Bebidas, Vassouras, Rio de Janeiro, com distância de 0,8 milímetros. Em seguida, o malte moído foi misturado à água destilada na proporção de uma parte de malte para quatro partes de água.

Para a pressurização, sacos plásticos de polietileno de alta densidade contendo mistura malte:água na proporção 1:4 foram fechados em uma seladora térmica e colocados no equipamento de alta pressão *Stansted Fluid Power*, modelo S-FL-850-9-W, localizado na Embrapa Agroindústria de Alimentos, no Rio de Janeiro. Os tratamentos de alta pressão envolveram as seguintes condições: 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos à temperatura ambiente. Também foi produzido um mosto nas mesmas condições das amostras pressurizadas, porém este passou pelo processo tradicional de mostura feito com aquecimento a 52°C por 20 minutos, 72°C por 30 minutos e 5 minutos a 78°C (Figura 6) no equipamento de fabricação de mosto em escala laboratorial “Mosto Congresso” (Bender & Hobein, Alemanha).

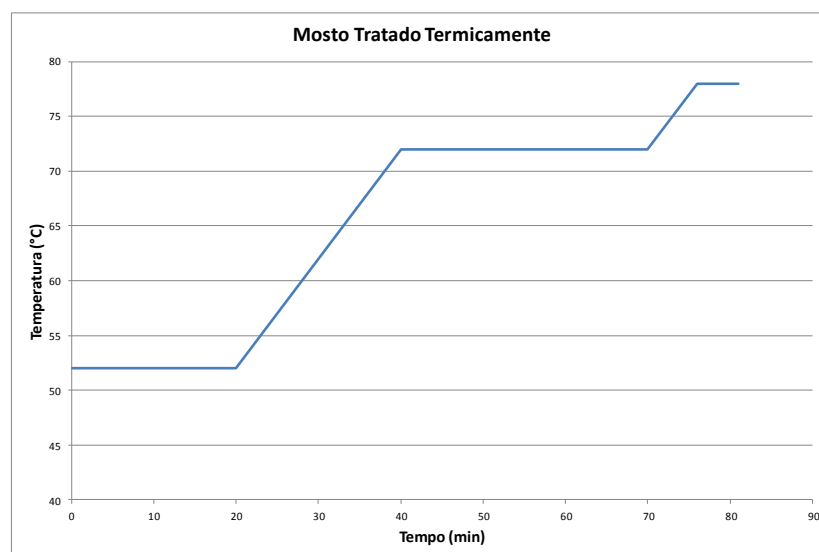


Figura 6: Diagrama tempo x temperatura de mostura tradicional de uma cerveja tipo Pilsen feita com aquecimento e utilizada para produção do mosto controle desta pesquisa

3.3. Análises

3.3.1. Açúcares fermentescíveis por HPLC

O método baseia-se na separação cromatográfica da amostra em coluna de Fase Reversa e consequente determinação da concentração dos açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando método de padronização externa.

Para o preparo da amostra foi feito o seguinte procedimento: pesou-se 1g de amostra em balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se 10 mL de água ultrapurificada, posteriormente seguiu-se para extração em banho ultrassom por 20 minutos, em seguida adicionou-se de 5

mL de acetonitrila, avolumou-se com água ultrapurificada e filtrou-se a solução diretamente para o vial do injetor automático.

As análises foram realizadas em sistema de cromatografia líquida Waters (Milford, MA, USA) composto por injetor automático W717, bomba W600, detector de índice de refração W14 com temperatura interna de 45°C, coluna *Nucleosil Carbohydrate* grupamento amino da Macherey-Nagel (Alemanha). A coluna operou a 30 °C com fluxo de 1mL/minutos. A fase móvel utilizada foi com composição de 75% de acetonitrila e 25% de água ultrapurificada (MiliQ), o volume de injeção foi de 20 µL e o tempo de corrida foi de 20 minutos

3.3.2. Microscopia

O microscópio da marca Leica modelo Lietz Laborluxs (Leica, Wetzlar, Alemanha) com filtro de luz polarizada (localizado na Embrapa Agroindústria de Alimentos, no Rio de Janeiro) foi utilizado para visualizar a morfologia do amido após os tratamentos. A perda da birrefringência (cruz de malta) é um indicativo da ocorrência da gelatinização do amido, que é desejada após os tratamentos com alta pressão, para permitir a atividade enzimática.

3.3.3. Análises de mosto e cerveja

As concentrações de extrato no mosto (teor de sólidos solúveis expresso em °Brix) foram analisadas em densímetro digital DMA 4500 (Anton Paar, Graz, Áustria) a 20°C (localizado no CTS Alimentos e Bebidas, Vassouras, Rio de Janeiro).

3.3.4. Prova de iodo

A presença ou ausência de amido foi verificada adicionando-se uma gota de solução de iodo 0,02 N ao mosto produzido. Neste teste qualitativo, a cor varia de roxa (presença) amarela (ausência).

3.4. Estatística

O experimento seguiu delineamento fatorial completo, com duas repetições, composto por 3 níveis de pressão (300, 400 e 500 MPa), 3 níveis de tempo (5, 10 e 15 min) mais parcela adicional (mosto controle preparado por tratamento térmico) configurando, dessa forma, arranjo 3 x 3 + 1.

Inicialmente procedeu-se análise de variância e teste de médias para discriminar os tratamentos. Os dados foram analisados no programa estatístico R[®] (Lucent Technologies, Boulogne-Billancourt, França) versão 3.3.1., através do pacote estatístico ExpDes.pt. Foram realizados testes de Dunnett ($\alpha = 0,05$), tendo o mosto TT como controle, com objetivo de avaliar se os açúcares formados exibiram diferença de concentração entre o mosto TT e os mostos tratados por APH. Adicionalmente, entre os tratamentos pressurizados, foi realizado teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) para avaliar se os açúcares formados diferiram quanto à concentração entre os níveis de pressurização.

Posteriormente, para avaliar o comportamento da concentração dos açúcares nos mostos tratados por APH, foi realizada modelagem matemática. Por meio do programa STATISTICA v7 (Stat Soft, Tulsa, EUA) foram testados modelos de segundo e quarto grau e avaliados quanto ao ajustamento de acordo com valores do coeficiente de correlação (R^2), significância do modelo, significância dos coeficientes e significância do modelo ajustado. Em todos os testes foi adotado $\alpha = 0,05$.

Adicionalmente, os dados de concentração de açúcares e teor de sólidos solúveis foram tratados em software XLStat (Stat Soft, Tulsa, EUA) e submetidos à Análise de Componentes Principais (ACP) e formação de Clusters.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste qualitativo para presença de amido

Para verificar a presença ou ausência de amido, realizou-se no mosto pressurizado e no controle TT também o teste qualitativo de iodo, cujo resultado é apresentado na Figura 7.

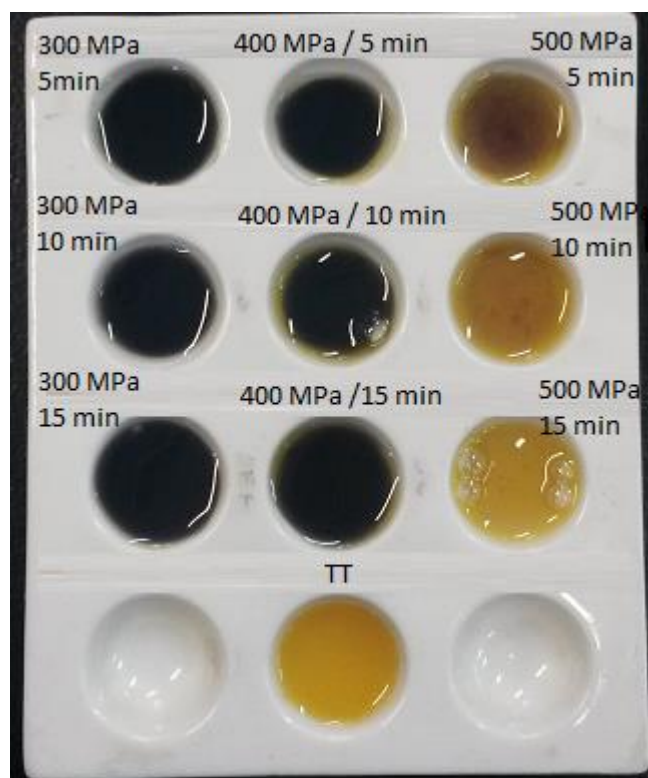


Figura 7: Teste do iodo para todos os tratamentos de mostura por APH (300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 min) e TT (1ª fase: 52°C / 20 min; 2ª fase: 72 °C / 25 min; 3ª fase: 78 °C / 5 min).

Observou-se, visualmente, que tanto a 300 quanto a 400 MPa houve intensa coloração azul, indicativo de presença de amido, para todos os tempos de processo. Neste último nível de pressão foi possível observar que com o aumento do tempo de processo, a coloração se apresentou menos escura, indicando uma possível diminuição na concentração de amido e, por consequência, de uma maior hidrólise em açúcares. No entanto, um comportamento similar não foi observado com relação à concentração de sólidos solúveis, pois não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o teor de sólidos solúveis entre os diferentes tempos de processo, a 500 MPa.

Mesmo assim, é interessante salientar que foi observada, pelo do teste de iodo e da microscopia, a presença de amido granular no mosto proveniente do tratamento a 500 MPa, assim como no controle TT, o que corrobora com dados de outros autores que afirmam que a completa gelatinização do amido de cevada só ocorre após 600 MPa (DOUZALS et al., 1996; GOMES; CLARK; LEDWARD, 1998; LIU; SELOMULYO; ZHOU, 2008; PÉREZ-LAMELA et al., 2002; STOLT; OINONEN; AUTIO, 2000).

Além das análises laboratoriais, verificou-se visualmente mudança de aspecto nas amostras tratadas com APH no nível de 500 MPa. Abaixo desta pressão, a parte líquida da amostra exibiu aspecto leitoso e similar ao aspecto anterior à pressurização devido a presença do amido suspenso em água (Figura 8). No entanto, após o tratamento a 500 MPa, as

amostras perderam este aspecto leitoso e escureceram (Figura 9). Essa mudança é visualizada normalmente no tratamento térmico após 60°C, quando o amido de cevada começa o processo de gelatinização e hidrólise pelas amilases. Este é mais um indicativo, junto com o aumento no teor de sólidos solúveis, a microscopia e o teste da presença de amido, de que houve gelatinização parcial e hidrólise do amido de cevada quando submetido a pressão acima de 500 MPa.



Figura 8: Amostras pressurizadas a 400 MPa em diferentes tempos de processamento (mostura).



Figura 9: Amostras pressurizadas a 500 MPa em diferentes tempos de processamento (mostrura).

4.2. Microscopia

As amostras de extrato da mostura submetidas à alta pressão e do controle com aquecimento foram observadas no microscópio com luz polarizada para a verificação da presença de grânulos de amido sob luz polarizada de forma a permitir a visualização da cruz de malta, que indica se este amido perdeu a sua birrefringência, uma vez que a sua ausência é uma indicação de que o amido gelatinizou tornando-se passível de degradação pelas enzimas amilolíticas (GOMES; CLARK; LEDWARD, 1998; HEINZ; BUCKOW; KNORR, 2005). A alta pressão aplicada ao amido da cevada pode causar a gelatinização do amido de acordo com certos autores (GOMES; CLARK; LEDWARD, 1998; LIU; SELOMULYO; ZHOU, 2008; PÉREZ-LAMELA et al., 2002; STOLT; OINONEN; AUTIO, 2000), ainda que nem sempre cause o rompimento dos grânulos (STOLT; OINONEN; AUTIO, 2000).

Em 300 MPa / 5 min observou-se vários grânulos de amido intactos indicado pela letra “A” na Figura 10, no entanto alguns estavam fragmentados e parcialmente rompidos, conforme indicado pela letra “B” na Figura 10.

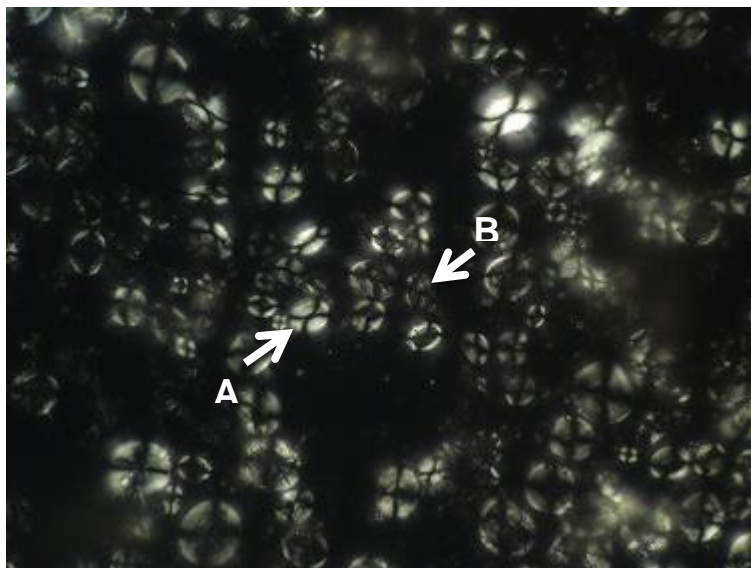


Figura 10: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 300 MPa/5 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido sem a cruz de malta

O mesmo pode ser observado a 300 MPa / 10 e 15 min (Figura 11 e Figura 12). A presença de grânulos de amido na maior parte, intactos e pouco fragmentados, pode explicar a baixa concentração de sólidos solúveis observada nesses mesmos níveis de pressurização. A ausência de fragmentação e preservação da cruz de malta são indícios de que não houve gelatinização e, logo, a estrutura granular ainda se mostra resistente à ação de enzimas que acarretariam a sacarificação do mosto.

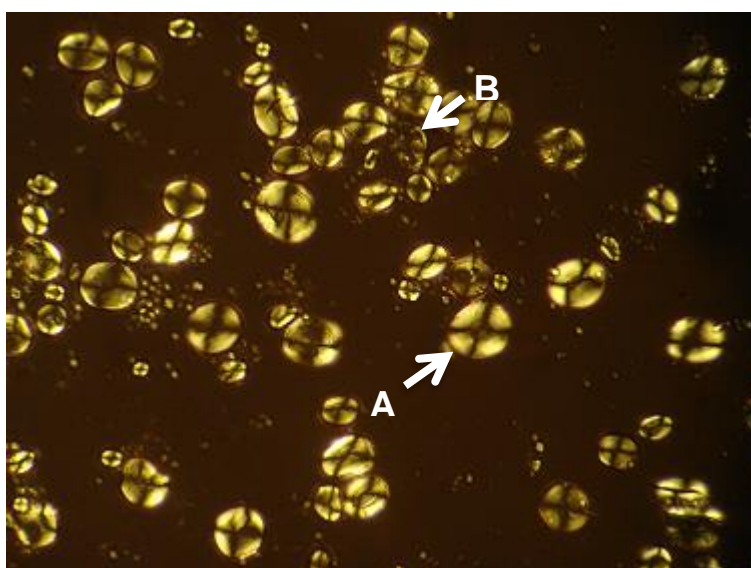


Figura 11: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 300 MPa/10 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido onde é possível observar a cruz de malta em menor intensidade.

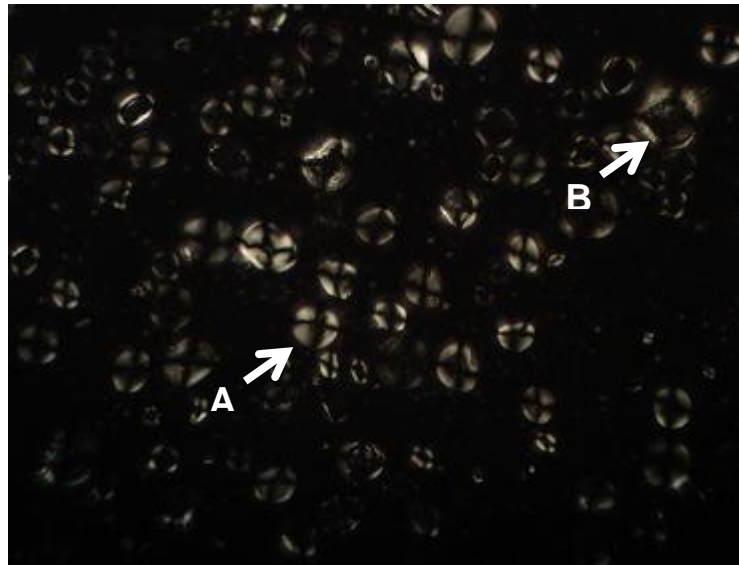


Figura 12: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 300 MPa/15 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e inchado com menor birrefringência.

Em 400 MPa, foram observados tanto grânulos grandes quanto pequenos, todos com cruz de malta, porém alguns rompidos, indicativo de gelatinização (Figura 13, Figura 14 e Figura 15, respectivamente). Não foi possível observar diferença entre os vários tempos de pressurização (5, 10 e 15 min).

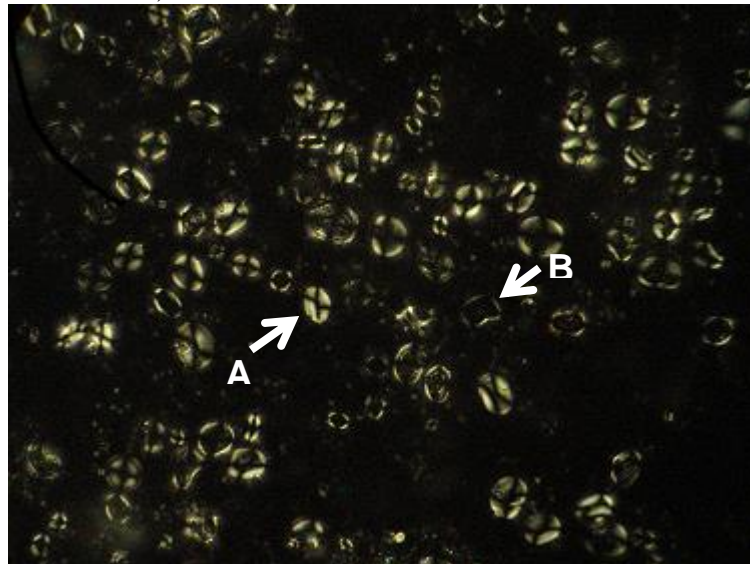


Figura 13: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 400 MPa/5 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido sem a cruz de malta

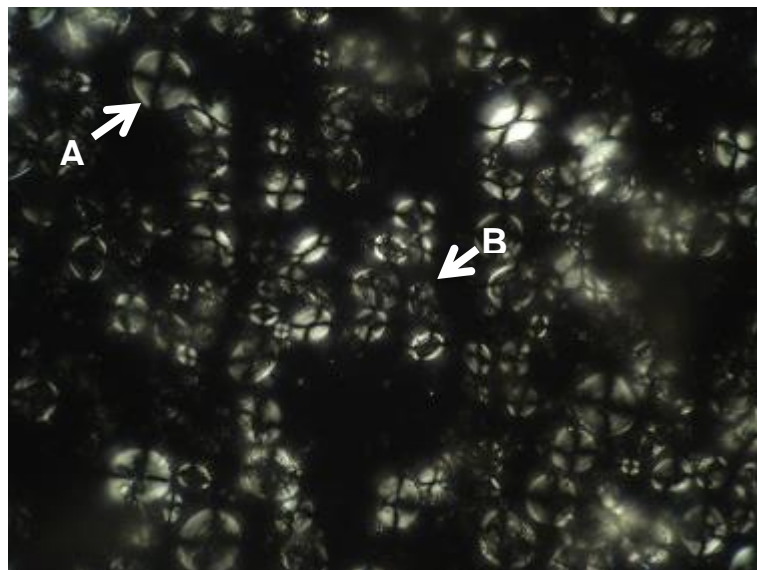


Figura 14: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 400 MPa/10 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido sem a cruz de malta

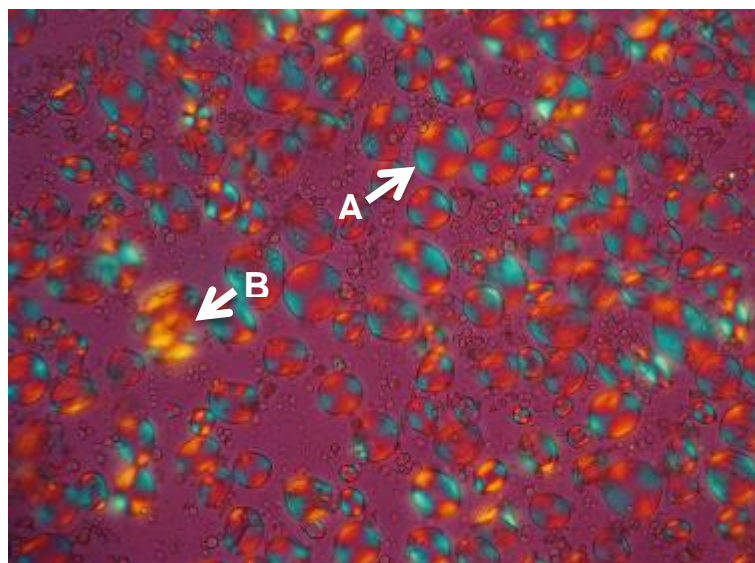


Figura 15: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 400 MPa/15 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido sem a cruz de malta

A 500 MPa, os grânulos menores que apareciam em níveis inferiores de pressão não foram observados, e os grânulos maiores apareceram inchados, porém ainda com a presença cruz de malta, indicando parcial gelatinização (Figura 16, Figura 17 e Figura 18). Mesmo assim, ainda nesta pressão foi possível verificar alguns grânulos rompidos, sendo nítida a menor concentração de grânulos intactos em geral, comparada com as amostras oriundas de tratamento a pressões mais baixas. Este fato sugere que as enzimas amilolíticas podem ter sido responsáveis por essa menor concentração, pois promoveram a degradação do amido em açúcares menores. Inclusive na amostra a 500 MPa / 10 min (Figura 17), onde não foi possível observar grânulos de amido presentes.

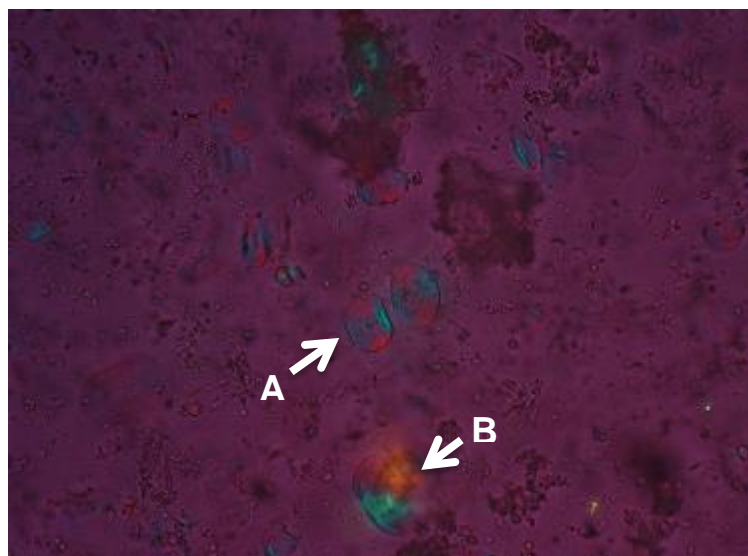


Figura 16: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 500 MPa/5 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido sem a cruz de malta

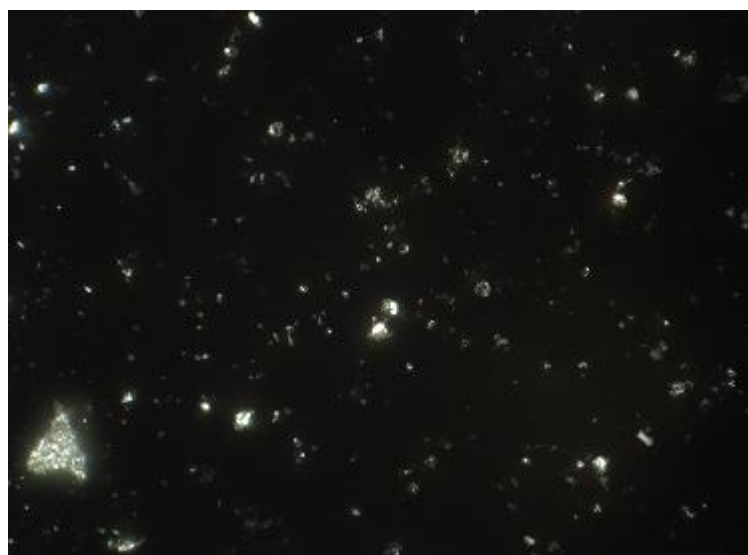


Figura 17: Ausência de grânulos de amido em microscopia de mosto tratado por alta pressão a 500 MPa/10 min

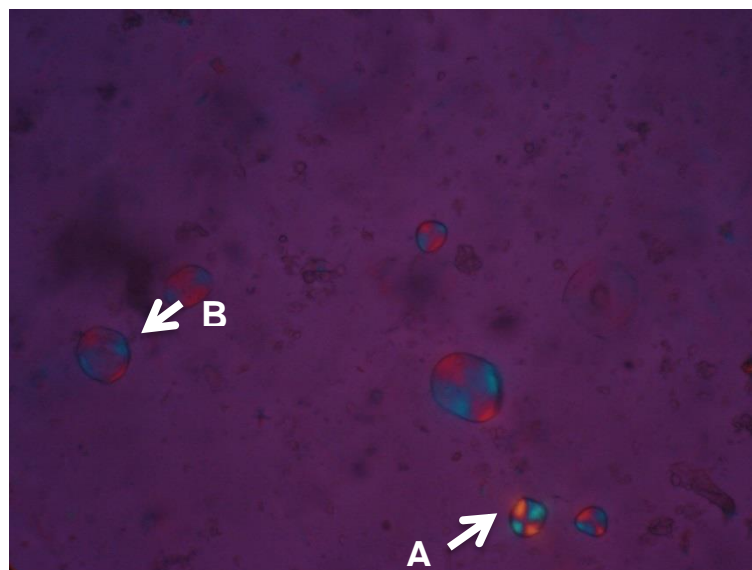


Figura 18: Microscopia de mosto tratado por alta pressão a 500 MPa/15 min. A letra “A” indica um grânulo de amido intacto e com cruz de malta e a letra “B” indica um grânulo fragmentado e parcialmente rompido.

Desta forma, a partir dos tratamentos com APH (300 a 500 MPa) verificou-se uma modificação gradual do amido, apesar da presença da cruz de malta em alguns grânulos. Essa modificação foi se tornando mais intensa com o aumento da pressão e não apresentou variação perceptível quanto ao fator tempo. Tendência similar foi observada em relação à concentração de sólidos solúveis, que aumentou de acordo com o aumento de pressão, o que indica que a pressão induz à gelatinização do amido, de forma a torná-lo mais susceptível à atuação das enzimas, responsáveis pela hidrólise do amido do malte de cevada.

Os resultados desta pesquisa estão de acordo com diversos autores. Stolt, Oinonen e Autio (2000) verificaram que o amido do malte de cevada não gelatiniza da mesma maneira com APH e do tratamento térmico. Eles observaram que o amido de cevada submetido a pressões acima de 200 MPa, gelatinizou a temperaturas mais baixas do que quando aquecido, e este efeito se torna mais pronunciado a partir de 400 MPa. Observaram também que a estrutura do amido se mantém intacta, mesmo com a perda da birrefringência, ao que os autores atribuem à possível capacidade da amilose em estabilizar a estrutura do grânulo de amido, evitando seu rompimento, apesar do intumescimento.

Pérez-Lamela et al. (2002) e Gomes, Clark e Ledward (1998) também observaram que a estrutura do grânulo de amido de cevada começou a se modificar pela gelatinização a partir de 400 MPa e este efeito foi mais marcante a 600 MPa. Ambos estudos utilizaram mistura de malte de cevada moído e água. Pei-Ling, Xiao-Song e Qun (2010) também verificaram a gelatinização da cevada de 300 a 600 MPa

Também foi feita microscopia do mosto obtido com a curva de mostura tradicional através de tratamento térmico e verificou-se a ausência de amido, possivelmente, por ter sido completamente degradado pelas enzimas do malte (Figura 19)

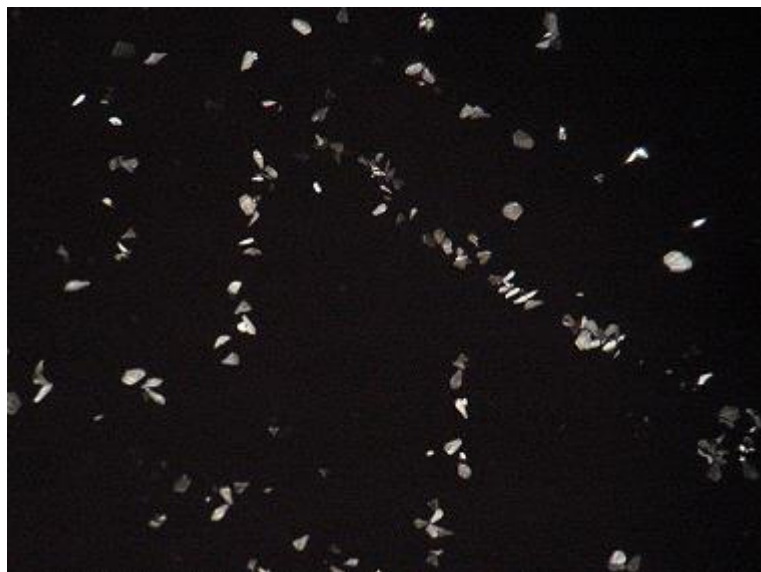


Figura 19: Ausência de grânulos de amido em microscopia de mosto produzido com tratamento térmico (1ª fase: 52°C / 20 min; 2ª fase: 72 °C / 25 min; 3ª fase: 78 °C / 5 min).

4.3. Perfil de açúcares

O objetivo da etapa de mostura é produzir açúcares fermentescíveis para serem metabolizados, posteriormente, pelas leveduras cervejeiras na etapa de fermentação. Dessa forma, torna-se relevante a análise dos tipos e concentrações dos açúcares produzidos no processo, embora não tenha havido anteriormente nenhum estudo de mosto submetido a alta pressão relacionado à análise de perfil de açúcares. A Figura 20 ilustra um cromatograma típico encontrado nessa pesquisa, relativo ao mosto tratado por APH a 500 MPa/ 5 min., com identificação dos principais picos de açúcares observados. A Figura 21 ilustra o cromatograma do mosto tratado termicamente.

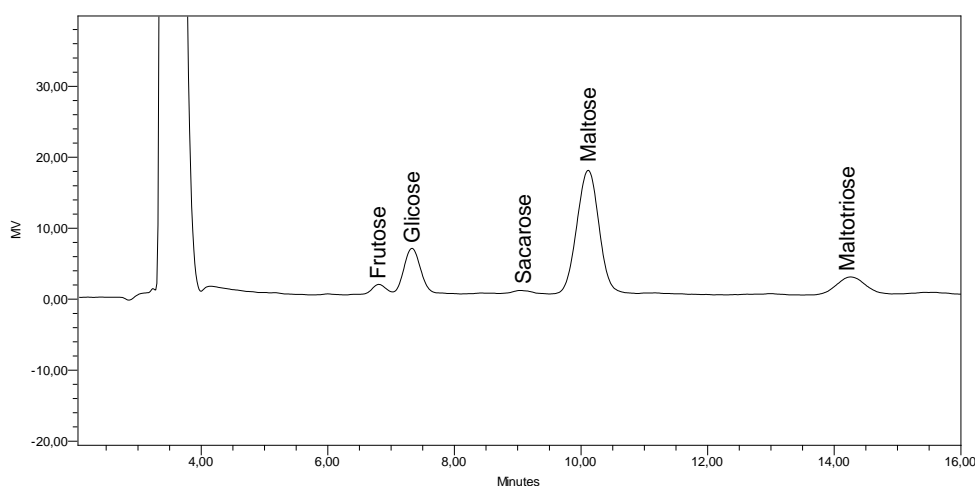


Figura 20: Cromatograma de HPLC do mosto tratado com 500 MPa / 5 minutos

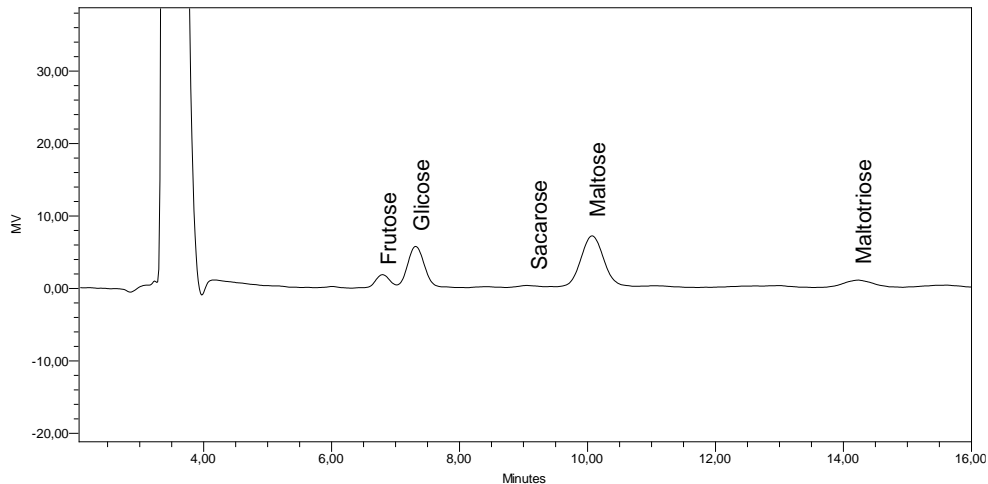


Figura 21: Cromatograma de HPLC do mosto tratado termicamente

Observa-se a presença de cinco picos principais relacionados ao trissacarídeo maltotriose (três unidades de glicose), dissacarídeos maltose (duas unidades de glicose) e sacarose (uma unidade de glicose e uma de frutose) e monossacarídeos glicose, e frutose. Esses são os açúcares de maior interesse na etapa de mostura por serem os únicos fermentescíveis presentes no mosto (BRANDAM et al., 2003; PIDDOCKE et al., 2009b), apesar de ser esperado haver, ainda, presença de dextrinas, que são polissacarídeos com mais de três unidades de glicose (RAKETE, KLAUS e GLOMB, 2014). As dextrinas não aparecem no cromatograma por exibirem tempo de retenção superior aos demais açúcares e por não ser de interesse na presente pesquisa, por não ser fermentescível. Com exceção da sacarose e da frutose, que são formadas durante a germinação do malte (ALLOSIO-OUARNIER et al., 2000), os demais açúcares fermentescíveis derivam da hidrólise enzimática sobre o amido.

As concentrações e tipos dos açúcares encontrados nessa pesquisa, tanto para o mosto por TT, quanto para os tratados por APH estão dentro do esperado para processos de mostura convencional por aquecimento (BOURQUE, 2013; MONTANARI et al., 2005). Ressalta-se que há grande variabilidade entre os teores de açúcares entre diferentes mostos produzidos por processos convencionais de mostura. Isso se deve ao fato de que esses processos variam muito quanto à faixa de temperaturas (usualmente entre 45 e 80 °C, sendo crescente ao longo de todo processo) e tempo (90 e 120 min) empregados, e essas variações podem influenciar o perfil de açúcar produzido.

A influência do tempo e temperatura no perfil dos açúcares se deve à capacidade de ativação ou inativação das principais enzimas presentes, como a α e β amilases, amiloglicosidase e invertase, que são responsáveis pela formação de açúcares (VRIESEKOOOP et al., 2010). Analogamente, considerando o potencial da APH em influenciar a atividade enzimática, é esperado que, nesse processo, os níveis de pressão e tempo exerçam efeito sobre a atividade dessas enzimas.

4.3.1. Efeito dos Processos de Alta Pressão Hidrostática (APH) e Tratamento Térmico (TT)

As concentrações dos principais açúcares presentes no mosto cervejeiro produzido pelo processo convencional de tratamento térmico (TT) ou por Alta Pressão Hidrostática (APH) estão dispostas na Figura 22. Ressalta-se que não há nenhuma referência na literatura que tenha feito análise de perfil de açúcares de mosto tratados por alta pressão. Análise estatística dos resultados, conforme apresentado na

Tabela 1, demonstra que a interação controle*fatorial foi significativa ($P < 0,05$) para concentração de todos os açúcares e teor de sólidos solúveis, sugerindo haver diferença entre o controle (mosto TT) e pelo menos algum tratamento entre os mostos tratados por APH. Observa-se que certos níveis de pressão foram capazes de promover aumento ($P < 0,05$) na concentração de frutose e glicose em comparação ao mosto TT, e, por outro lado, alguns níveis de pressão contribuíram para diminuição ($P < 0,05$) nas concentrações de sacarose, maltose, maltotriose e teor de sólidos solúveis. Condição de similaridade ($P > 0,05$) de concentrações de açúcares entre mosto TT e mostos APH foram observadas para frutose a 300 MPa / 5 ou 10 min e 500 MPa / 5, 10 e 15 min, para glicose a 300 MPa / 10 min, maltotriose a 500 MPa / 5 min e maltose a 500 MPa / 5, 10 e 15 min.

Tabela 1: P-valor da interação Controle*Fatorial para concentração de açúcares em mosto cervejeiro obtido por Tratamento Térmico (1ª fase: 52°C / 20 min; 2ª fase: 72 °C / 25 min; 3ª fase: 78 °C / 5 min) ou Alta Pressão Hidrostática a 300, 400, 500 MPa / 5, 10 ou 15 min.

Açúcar	P-valor
Frutose	0,0023
Glicose	0,0000
Sacarose	0,0000
Maltose	0,0000
Maltotriose	0,0000
Brix	0,0279

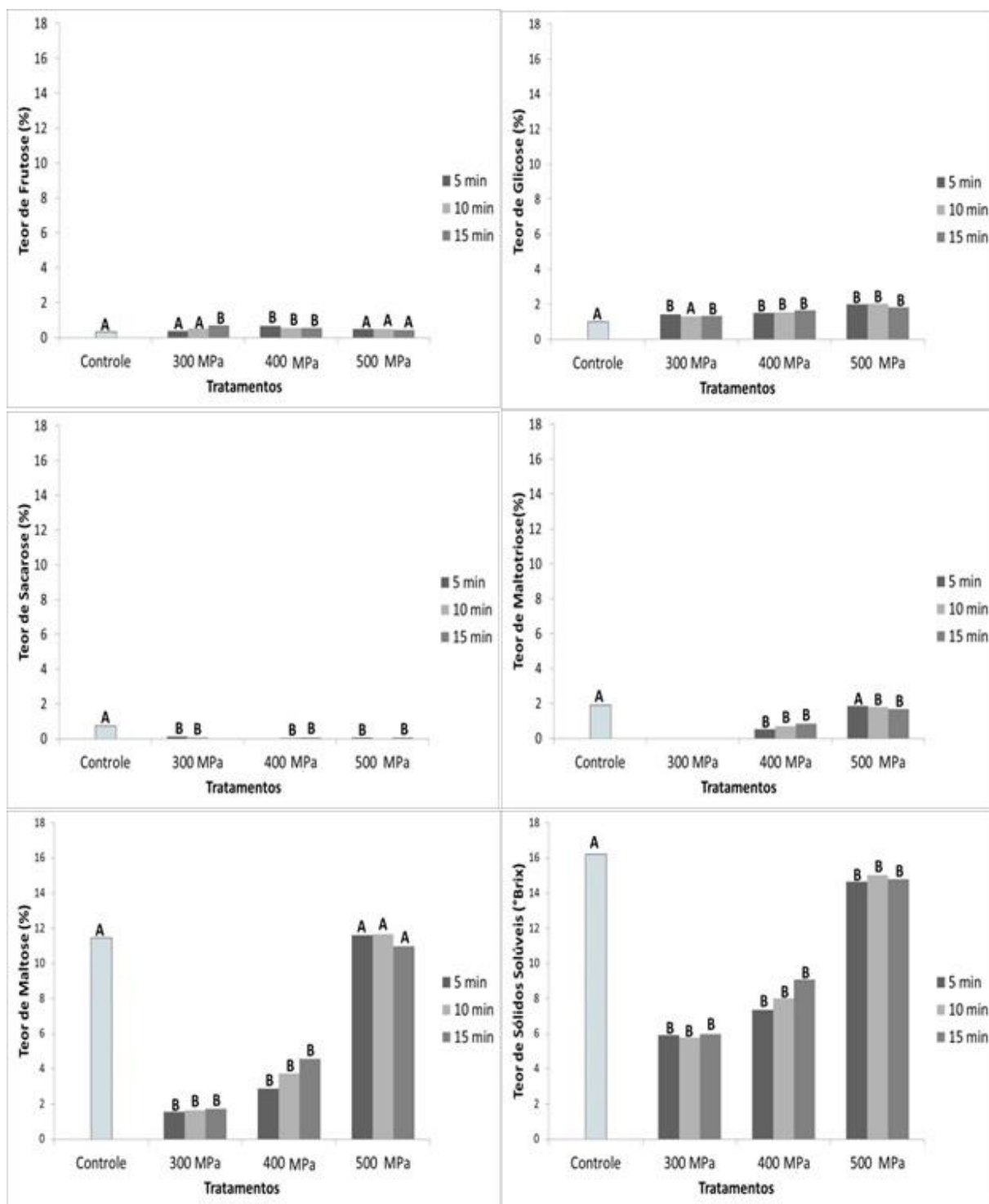


Figura 22: Teores de frutose, glicose, sacarose, maltotriose, maltose e sólidos solúveis em mosto cervejeiro produzido por tratamento térmico (Controle: 1ª fase: 52°C / 20 min; 2ª fase: 72 °C / 25 min; 3ª fase: 78 °C / 5 min) ou por Alta Pressão Hidrostática a 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.

A, B Letras iguais indicam similaridade ($P < 0,05$) e letras diferentes indicam diferença ($P > 0,05$) entre as médias dos tratamentos sob alta pressão e o controle, de acordo com o teste de Dunnett.

A maltose, assim como a maltotriose, é um açúcar proveniente da atividade da β -amilase, enzima endógena ao malte, sobre o amido. Ambos os açúcares são fermentescíveis para maior parte das leveduras cervejeiras, ainda que a maltotriose seja considerada somente parcialmente fermentescível, uma vez que algumas leveduras não a assimilam, ou assimilam

somente após o consumo dos demais açúcares fermentescíveis (HEITMANN; ZANNINI; ARENDT, 2015; PIDDOCKE et al., 2009b; SCHNEIDERBANGER et al., 2016).

A concentração maltose e maltotriose nos mostos APH foram menores ($P < 0,05$) que as observadas nos mostos TT até 400 MPa / 15 min passando a maiores ($P > 0,05$) no mosto APH a 500 MPa / 5 min. Esse resultado pode ser decorrente do fato da APH ter sido menos eficiente que o calor na ativação das enzimas em pressões até 400 MPa e ter exibido mesma eficiência a 500 MPa. De fato, tanto o processo térmico quanto o de pressurização se mostram capazes de promover ativação da β -amilase de acordo com intensidade dos tratamentos. Em condições de APH (100 MPa / 62 °C), a β -amilase exibe 15 % a mais de atividade que a condição ótima ambiente de temperatura e pressão (HEINZ; BUCKOW; KNORR, 2005).

A sacarose é um dissacarídeo fermentescível presente no mosto em baixa concentração, quando comparado aos demais açúcares. Ela está naturalmente presente no malte de cevada, sem relação direta com a hidrólise do amido. No entanto, há no malte uma enzima capaz de hidrolisar a sacarose em suas unidades formadoras (glicose e frutose), a invertase (VRIESEKOOOP et al., 2010).

Na mostura por TT, não é esperada atividade da invertase, uma vez que sua atividade ótima é entre 33 e 35°C e, em geral, os processos de mostura iniciam com temperatura acima deste intervalo (VRIESEKOOOP et al., 2010). Por outro lado, a invertase pode exibir aumento de atividade quando submetida a altas pressões (BUTZ et al., 2003; EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009; NOEL MARIE-OLIVE; ATHES; COMBES, 2000; PÉREZ-LAMELA et al., 2002), o que pode justificar a redução do teor da sacarose do mosto tratado por APH em relação ao mosto controle TT. Liu et al. (2014), avaliando atividade da invertase em néctar de manga, verificou que a atividade dessa enzima aumenta em condição de APH (600 MPa / 1 min) e reduz em condição de processo térmico (110 °C / 8,6 s), ambos em relação ao controle não processado. Em mosto cervejeiro, da forma semelhante, foi observado redução no teor de sacarose sob condição de APH (50 a 600 MPa) em relação a mosto TT (65°C / 30 min), sendo esse efeito atribuído a atividade da invertase (PÉREZ-LAMELA et al., 2002). Corroborando com os resultados, Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera (2009) demonstraram que calor e pressão exercem efeitos antagônicos sobre a estabilidade da invertase.

Glicose e frutose exibiram concentrações iguais ou superiores nos mostos tratados por APH em relação ao mosto TT. A glicose apresentou concentração superior ($P < 0,05$) em todos os mostos pressurizados em relação ao mosto TT, exceto no mosto 300 MPa / 10 min que foi similar ($P > 0,05$). A frutose exibiu concentração similar ($P > 0,05$) ao mosto controle quando pressurizados por 300 MPa / 5 ou 10 min e 500 MPa / 5, 10 ou 15 min e superior ($P < 0,05$) em todos os demais tratamentos de APH.

A frutose e a glicose podem estar presentes no mosto cervejeiro devido à hidrólise da sacarose realizada pela invertase. Adicionalmente, a glicose pode ser também resultado da β -amilase e amiloglicosidase sobre o amido (VRIESEKOOOP et al., 2010). Conforme discutido anteriormente, a hidrólise de sacarose pela invertase tende a ser menos acentuada em condição de aquecimento e pode ser potencializada pela APH. Essas condições justificam o fato de, simultaneamente, haver maior concentração de frutose e glicose e menor de sacarose nos mostos tratados por APH em relação ao mosto TT. De forma semelhante, como também discutido acima, a ativação da β -amilase pela APH também pode ter contribuído para o aumento na concentração da glicose nos mostos tratados por APH em relação ao mosto TT. Há indícios de que a atividade da amiloglicosidase pode ser influenciada pela APH, principalmente, se associada com a temperatura (TRIBST; AUGUSTO; CRISTIANINI, 2013; TRIBST; CRISTIANINI, 2012). No entanto, escassas pesquisas não permitem concluir sobre o efeito da APH nesses aspectos em maior profundidade.

Pesquisas sobre processos de mostura TT com malte de cevada em diferentes condições de tempo e temperatura analisaram o perfil de açúcares e encontraram resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa, ainda que os parâmetros dos processos tenham sido distintos. Montanari et al. (2005) avaliaram mosturas de 52 °C / 20 min, 65 °C / 10 min, 72 °C / 20 min, e 76 °C / 1 min. Já Bourque (2013) utilizou método de produção de mosto em escala laboratorial descrito na *European Brewery Convention* (EBC), onde o mosto começa com um repouso a 45°C por 30 minutos e depois a temperatura é elevada até 70 °C e permanece por 60 minutos. Muller (1991) utilizou o método de produção de mosto em escala laboratorial descrito pelo *Institute of Brewing and Distilling* (IBD), onde o mosto permanece a 70°C por 1 hora. Por fim, Vriesekoop et al. (2010) realizou uma mostura a 66° C por 2 horas. Todos os autores citados encontraram resultados para teor de glicose similares comparados ao mosto TT e menores que o observado no mosto APH por 500 MPa. Este fato sugere que APH pode ter promovido maior atividade das α e β amilases, formando glicose adicional em relação ao TT, ou que outras enzimas, como a amiloglicosidase e a invertase, foram adicionalmente ativadas. Ressalta-se que amiloglicosidase e a invertase não exibem atividade considerável no mosto TT, pois esse processo emprega temperaturas elevadas que causam desnaturação dessas enzimas (VRIESEKOOP et al., 2010).

Em relação à maltose, os mesmos autores encontraram menores concentrações que os observados nessa pesquisa em ambos os processos. Este resultado pode ser indicativo de maior atividade das enzimas α e β amilases sob APH ou ao fato das temperaturas utilizadas nesse experimento terem ativado mais eficientemente que as temperaturas das pesquisas citadas.

Já com relação à maltotriose, Muller (1991) e Vriesekoop et al. (2010) obtiveram valores mais baixos de concentração comparados com aqueles resultantes do tratamento por APH a 500 MPa no presente estudo e para o mosto controle. No entanto, Montanari et al. (2005) e Bourque (2013) obtiveram valores mais altos. Como as pesquisas foram conduzidas com processos de mostura com tempos e temperaturas distintos, é possível que os resultados variem entre si e também em comparação aos resultados obtidos nesta pesquisa.

Os mostos tratados por APH mostraram-se, de maneira geral, adequados para produção de cerveja, principalmente aqueles tratados a 500 MPa. Alterações nas concentrações dos açúcares mais simples, como glicose, frutose e sacarose poderiam influenciar o metabolismo da levedura na etapa de fermentação. Elevada concentração desses açúcares, quando acima de 30 %, poderiam direcionar o metabolismo da levedura para rota fermentativa mesmo em presença de oxigênio (efeito *crab tree*) (BRIGGS et al., 2004). A ocorrência desse fenômeno inibe o crescimento aeróbio da levedura fazendo com que a contagem final seja inferior à desejada, o que pode causar fermentação arrastada (longa e insuficiente) com residual final de maltose e maltotriose não fermentada. Residuais elevados desses açúcares no produto final poderiam causar gosto adocicado indesejável (PÁTKOVÁ et al., 2000; PIDDOCKE et al., 2009a) e tais açúcares poderiam ser fonte de substrato para microrganismos contaminantes (LIMA et al., 2011). No entanto, considerando as baixas concentrações observadas desses açúcares em todos os mostos, e o fato de pressão causar simultaneamente aumento na concentração de alguns e redução na concentração de outros, não é esperada a ocorrência do efeito *crab tree* nos mostos pressurizados. Dessa forma, o discreto efeito na concentração desses açúcares pode não ser importante na composição do mosto na etapa de fermentação.

Já a capacidade da APH a 500 MPa em promover concentração de maltose nos mostos similares ao mosto TT é um indicativo de boa eficiência do processo. Elevados teores de maltose garantem que o processo de fermentação ocorrerá de forma semelhante nos mostos produzidos por ambas as tecnologias, uma vez que se trata do principal e mais abundante açúcar presente no mosto e principal substrato para levedura cervejeira durante a fermentação (MENESES; HENSCHKE; JIRANEK, 2002).

Ao avaliar os resultados de TT e APH encontrados nessa pesquisa, torna-se relevante considerar, além das diferenças ou semelhanças nos teores finais de cada um dos açúcares, características de cada um dos processos. O mosto produzido por TT demandou 80 minutos sob condição de aquecimento constante, o que agrega ao processo custo elevado pelo alto consumo de energia e tempo. Já os mostos produzidos por APH demandaram menor tempo (entre 5 e 15 minutos) e menor consumo de energia, uma vez que a elevação de pressão demanda pouca energia quando comparado ao processo térmico, e a manutenção após alcançar o set point não demanda energia adicional (RASTOGI, 2013). Dessa forma, eventuais resultados que sugerem teores similares de açúcares entre os mostos processados por APH e TT são bastante positivos quando se considera aspecto de produtividade do processo.

4.3.2. Efeito dos Níveis de Alta Pressão

A intensidade dos tratamentos da APH influenciou a concentração de todos os açúcares presentes nos mostos, exceto a concentração de sacarose (Figura 23) que não foi influenciada pelos níveis de pressão ou de tempo. Em geral, os teores de sacarose foram muito baixos e ficaram no limite de detecção do método utilizado para esta determinação (cromatografia líquida de alta eficiência). Assim, alguns picos não foram suficientemente definidos para sua integração e posterior cálculo da área para determinação do teor de sacarose. Mesmo quando os picos foram integrados, eles foram muito pequenos, o que pode explicar a variabilidade dos valores.

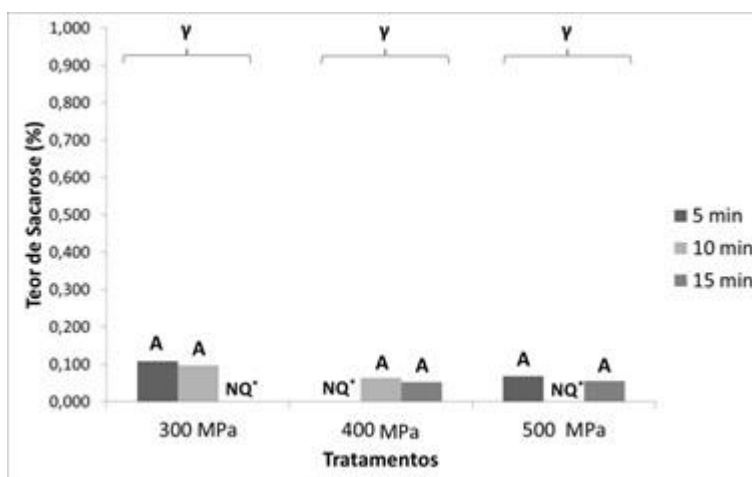


Figura 23: Teores de sacarose em mosto cervejeiro produzido por Alta Pressão Hidrostática a 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.

A, B, C Diferentes letras, dentro de um mesmo nível de pressão, diferem pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

γ, α, β Diferentes letras, dentro de um mesmo nível de tempo, diferem pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

*NQ: Não quantificável

Apesar de os fatores de pressão e tempo terem influenciado as concentrações dos açúcares, o fator pressão exerce efeito mais importante, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: P-valor para efeito da pressão, tempo e interação pressão*tempo na concentração de açúcares em mosto cervejeiro produzido por Alta Pressão Hidrostática a 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.

Fator	P-valor					
	Frutose	Glicose	Sacarose	Maltose	Maltotriose	Brix
Pressão	0,0390	0,0000	0,4673	0,0000	0,0000	0,0000
Tempo	0,4754	0,9012	0,6784	0,0753	0,0616	0,0296
Pressão*Tempo	0,0058	0,3054	0,0564	0,0003	0,0000	0,0279

A concentração de frutose foi influenciada pelo nível de tempo e pressão de forma distinta, de acordo com intensidade do tratamento (Figura 24). O efeito do tempo se manifestou a 300 MPa, de forma que o seu aumento promoveu aumento ($P < 0,05$) na concentração do açúcar. Já o efeito da pressão mostrou-se dependente do tempo de processo. Enquanto a 15 minutos o progressivo aumento da pressão causou redução ($P < 0,05$) na concentração de frutose, a 5 minutos o aumento da pressão de 300 para 400 MPa promoveu aumento ($P < 0,05$) na concentração do açúcar, e o aumento de 400 para 500 MPa promoveu ligeira redução. Como discutido anteriormente, a concentração de frutose no meio deriva da atividade da invertase, enzima cuja atividade se mostra sensível ao nível de pressão aplicado. Os resultados encontrados nessa pesquisa sugerem que a enzima exibiu ponto de máxima atividade em tratamento entre 300 MPa / 15 min e 400 MPa / 5 min.

São escassas pesquisas que avaliam efeito da APH sobre atividade de invertases em mosto cervejeiro. Pérez-Lamela et al. (2002) observaram no mosto cervejeiro produzido por APH em níveis entre 400 e 600 MPa / 10 e 20 min, que o teor de sacarose dobrou quando comparado com níveis entre 50 e 200 MPa, sugerindo, dessa forma, maior atividade da enzima invertase à pressões reduzidas inferiores a 400 MPa, como encontradas nessa pesquisa.

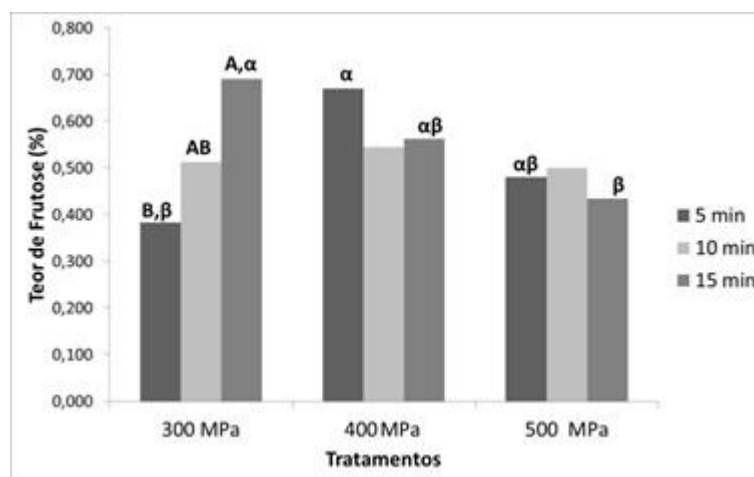


Figura 24: Teores de frutose em mosto cervejeiro produzido tratamentos a Alta Pressão Hidrostática a 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.

A, B Diferentes letras, dentro de um mesmo nível de pressão, diferem pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

α, β Diferentes letras, dentro de um mesmo nível de tempo, diferem pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

As concentrações de glicose, maltose e maltotriose exibiram comportamentos bastante similares (Figura 25). Ambos sacarídeos exibiram aumento de concentração ($P < 0,05$) com aumento da intensidade do tratamento, a exceção da maltotriose que nos tratamentos mais intensos (500 MPa / 10 min e 500 MPa / 15 min) exibiram queda ($P < 0,05$) na concentração. O efeito do nível de pressão foi significativo ($P < 0,05$) para todos os açúcares, de modo que o

aumento entre 300 e 500 MPa promoveu aumento na concentração. Já o efeito do tempo, foi significativo ($P < 0,05$) para maltose e maltotriose e dependente do nível de pressão. Para maltose, houve aumento ($P < 0,05$) da concentração com aumento do nível de tempo quando pressurizada a 400 MPa. Já a maltotriose exibiu mesmo comportamento que a maltose quando pressurizada a 400 MPa, mas a 500 MPa, antagonicamente, o aumento do tempo causou redução ($P < 0,05$) na concentração do açúcar.

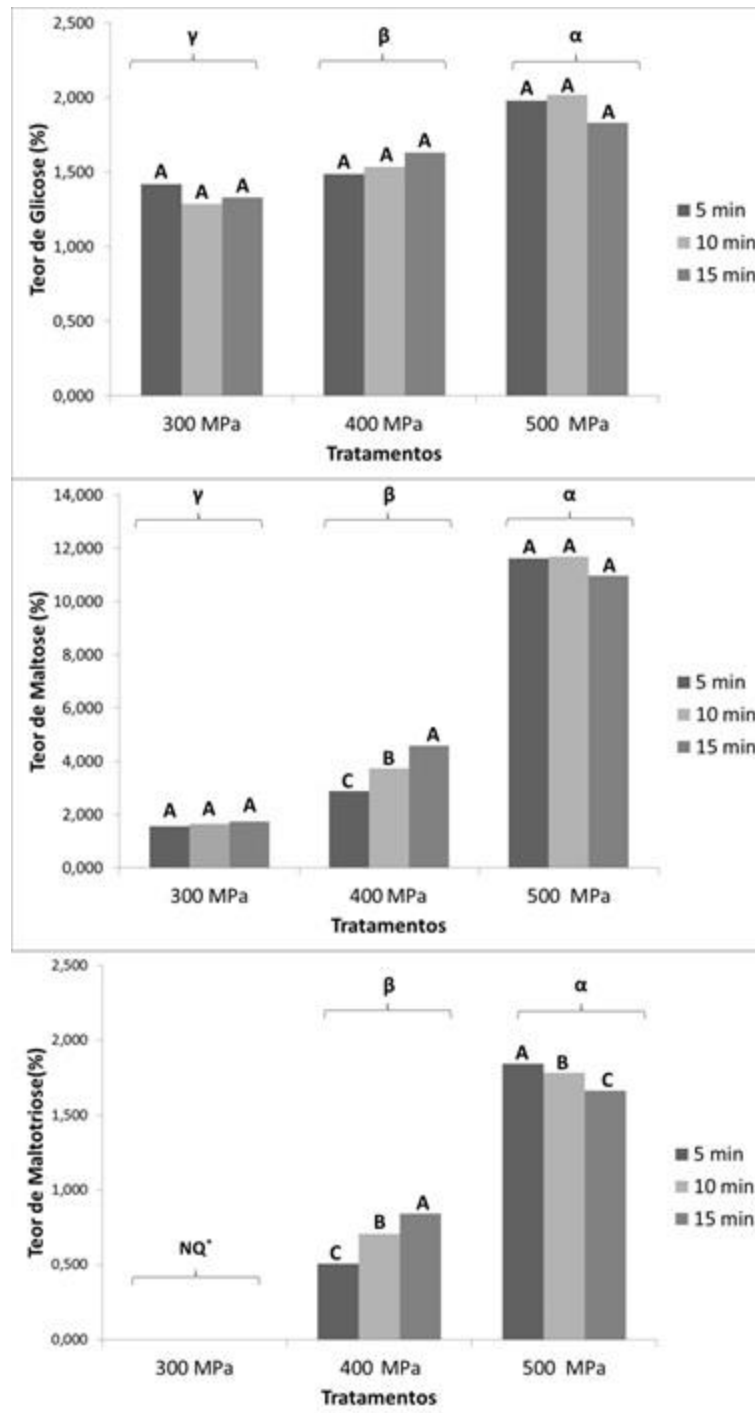


Figura 25: Teores de glicose, maltose e maltotriose em mosto cervejeiro produzido Alta Pressão Hidrostática à 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.

A, B, C Diferentes letras, dentro de um mesmo nível de pressão, diferem pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

γ , α , β Diferentes letras, dentro de um mesmo nível de tempo, diferem pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

*NQ: Não quantificável

Esses três açúcares estão presentes no mosto pela atividade de um mesmo grupo de enzimas. A α -amilase tem como produto principal as dextrinas que são açúcares não fermentescíveis, mas produzem em menor quantidade glicose, maltose e maltotriose (MULLER, 2000; MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005). A β -amilase tem como produto principal a maltose, mas também produzem glicose e maltotriose em menor quantidade (BRANDAM et al., 2003). Adicionalmente, as amiloglicosidases atuam na hidrólise do amido com formação de glicose (VRIESEKOP et al., 2010). Dessa forma, é consistente que o perfil desses açúcares seja semelhante quando submetidos a APH.

De fato, algumas pesquisas demonstram a sensibilidade dessas enzimas a diferentes intensidades de tratamentos de APH. Heinz, Buckow e Knorr (2005) avaliaram o efeito da APH sobre a β -amilase em solução de amido solúvel e observaram maior atividade entre 100 e 300 MPa. Buckow et al. (2007) avaliaram atividade da amilase sob APH em malte de cevada (meio tampão 0,1 M ACES) em níveis 0,1 e 650 MPa / 20 a 70°C e observaram que pressões acima de 400 MPa promovem inativação da enzima. Amiloglicosidade isolada de *Aspergillus niger* pode exibir atividade máxima entre 318 e 370 MPa em condição de temperatura elevada ($\approx 85^\circ\text{C}$) em meio de tampão ACES e em malte (BUCKOW; HEINZ; KNORR, 2005; FISCHER et al., 2006).

Na presente pesquisa, o aumento contínuo de glicose com aumento na intensidade da APH pode ser devido a ser esse açúcar produto de atividade de todas as três enzimas e, logo, eventual perda de atividade de uma delas pode ter sido compensada pela atividade de outra, mascarando eventual efeito de perda de atividade enzimática. Já a queda na concentração de maltotriose em níveis mais intensos de APH pode sugerir a queda ou inativação das enzimas α ou β -amilase. Considerando que a β -amilase tenha apresentado atividade ótima entre 100 e 300 MPa (HEINZ; BUCKOW; KNORR, 2005) é possível esperar que a níveis mais intensos já ocorra queda da atividade e, portanto, justifique redução na concentração desse açúcar. Os resultados encontrados sugerem que o máximo de produção de maltotriose tenha ocorrido entre 400 MPa / 15 min e 500 MPa / 5 min.

O teor dos sólidos solúveis acompanhou os comportamentos da glicose, maltose e maltotriose, exibindo aumento com aumento do nível de pressão entre 300 e 500 MPa (Figura 26). Já o tempo de processamento só influenciou essa variável quando o nível de pressão foi 400 MPa, de maneira que o aumento da concentração dos sólidos solúveis aumentou com 15 minutos de pressurização. Este mesmo efeito do tempo no nível de 400 MPa também foi observado no comportamento de maltose e maltotriose.

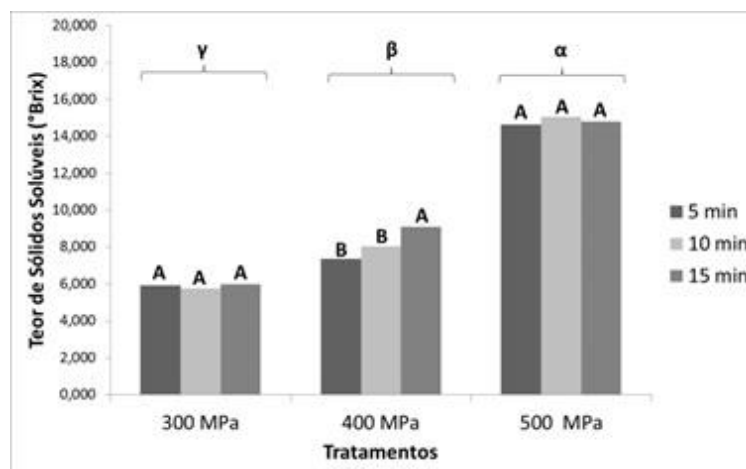


Figura 26: Teores de sólidos solúveis em mosto cervejeiro produzido Alta Pressão Hidrostática à 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.

A, B Diferentes letras, dentro de um mesmo nível de pressão, diferem pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

γ , α , β Diferentes letras, dentro de um mesmo nível de tempo, diferem pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

Gomes, Clark e Ledward (1998) também estudaram o efeito da alta pressão sobre a hidrólise do amido pelas amilases, no entanto utilizaram a farinha de cevada como base e fizeram tratamentos com alta pressão de 100 a 800 MPa nos tempos de 10 e 20 minutos. Já Pérez-Lamela et al. (2002) também estudaram o efeito da alta pressão em mosto de malte de cevada na hidrólise do amido em pressões de 50, 100, 200, 400 e 600 MPa por 20 minutos. Ambos os estudos observaram o aumento de carboidratos com o aumento da pressão, de forma que entre 100 e 300 MPa resultaram em teores semelhantes ao observados nas amostras não controle tratadas e concentrações mais elevadas a 400 e 600 MPa. Estes autores atribuem este efeito a uma maior atividade das enzimas α e β amilases e também à gelatinização do amido de cevada, que foi observada a partir de 400 MPa / 10 min. Segundo os mesmos, a gelatinização dos grânulos permite um ataque ao amido mais agressivo pelas amilases e, por consequência, um aumento no teor de sólidos solúveis. No entanto, não há trabalhos que relatem o perfil de açúcares fermentescíveis em mostos tratados a alta pressão hidrostática.

De maneira geral, os resultados sugerem que a APH é capaz de influenciar a formação de açúcares fermentescíveis no mosto cervejeiro por ativação de enzimas. Alterações nos teores de glicose, frutose a sacarose estão intimamente relacionadas, uma vez que os dois monossacarídeos são constituintes do dissacarídeo. Se uma eventual redução de sacarose ocorrer em função de atividade de invertase, é esperado que haja, proporcionalmente, um aumento de glicose e frutose. Na presente pesquisa, apesar de não ter sido detectado efeito significativo da APH sobre o teor de sacarose, a variação no teor desse açúcar exibe correlação significativa e inversa com a concentração de frutose e glicose (Tabela 3), o que reforça a hipótese de atuação da enzima invertase. Por outro lado, maltose e maltotriose também exibem correlação significativa e elevada ($>0,98$), o que também corrobora com que ambos são produzidos por um mesmo grupo de enzimas que foram influenciadas da mesma forma pela APH. Já a correlação observada entre o teor de sólidos solúveis e maltose e maltotriose se deve ao fato da maltose ser o açúcar de maior concentração no mosto, independente do nível de pressão e, dessa forma, influencia mais intensamente o teor de sólidos solúveis.

Tabela 3: Matriz de correlação entre concentração dos açúcares presentes nos mostos pressurizados a 300, 400 ou 500 MPa / 5, 10 ou 15 min.

	Frutose	Glicose	Sacarose	Maltose	Maltotriose	Brix
Frutose	1	0,129	-0,643	-0,520	-0,451	-0,533
Glicose	0,129	1	-0,639	0,443	0,434	0,395
Sacarose	-0,643	-0,639	1	0,375	0,387	0,422
Maltose	-0,520	0,443	0,375	1	0,982	0,997
Maltotriose	-0,451	0,434	0,387	0,982	1	0,987
Brix	-0,533	0,395	0,422	0,997	0,987	1

* Valores em negrito expressam significância a 5%.

Observa-se que o efeito da APH sobre a concentração de frutose causa um pico de concentração em nível intermediário de intensidade, e concentrações reduzidas nos níveis mais intensos de APH. Como já discutido anteriormente, esse evento se relaciona, possivelmente, à ativação enzimática proporcionada pela APH. No entanto, o crescente aumento na concentração de maltose e maltotriose com o aumento da intensidade da APH pode se dever, além da possível ativação progressiva das enzimas, também ao fato da APH ter

causado progressiva gelatinização do amido, tornando-o mais sensível à atividade dessas enzimas.

4.3.3. Análise de Componentes Principais (ACP)

A Figura 27 apresenta a variância explicada de cada componente e acumulada para os efeitos dos tratamentos de APH e TT na concentração dos açúcares dos mostos cervejeiros. Os dois primeiros componentes explicam 92,04 % da variação, de modo que o Componente Principal 1 (CP1) explica 61,03 % e o Componente Principal 2 (CP2) 31,01%.

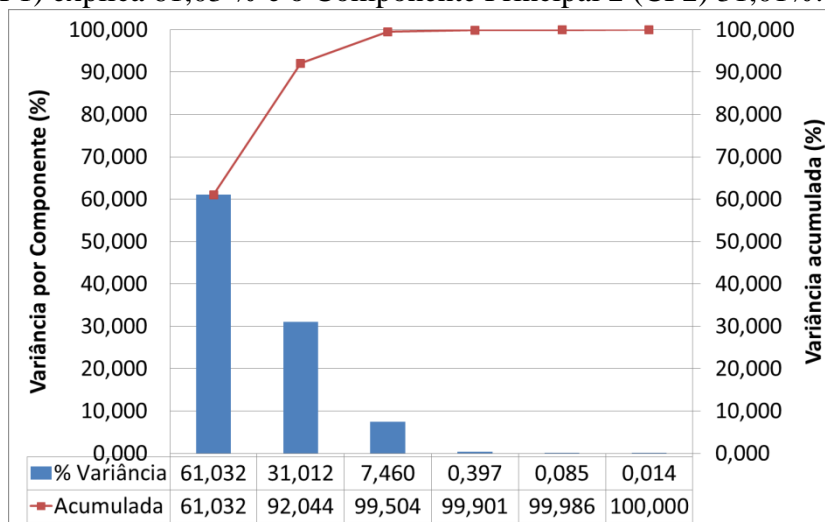


Figura 27: Gráfico de variância explicada por Componente Principal e Acumulada

O gráfico de ACP (CP1 vs CP2) contendo os tratamentos é apresentado na Figura 27. A distribuição espacial dos tratamentos os permite agrupar em três grupos (clusters): grupo 1 composto pelo tratamento TT; grupo 2 pelos tratamentos de APH mais intensos 500 MPa / 5 min, 500 MPa / 10 min e 500 MPa / 15 min; grupo 3 pelos demais tratamentos de APH a 300 ou 400 MPa / 5, 10 ou 15 min. Esses resultados sugerem, a partir da avaliação exclusiva do perfil de açúcares e teor de sólidos solúveis, que o mosto TT apresentou características distintas de todos os demais mostos APH. Entre os mostos APH, os dois grupos formados se distinguem pelo nível de pressão, corroborando que o efeito da pressão exerce efeito mais importante que o tempo de processo.

Já as Figura 28 e Figura 29 exibem, simultaneamente, os tratamentos e os teores de açúcares e o teor de sólidos solúveis. A similaridade de localização de tratamentos e variáveis de resposta sugere mais forte relação entre as partes. Dessa forma, é possível que os níveis de tratamentos mais intensos de APH se relacionem mais fortemente com a concentração de maltose, maltotriose e teor de sólidos solúveis. Já o tratamento térmico se relaciona mais com teor de sacarose. Os tratamentos de APH de intensidade moderada se relacionam mais com o teor de frutose. E por fim, o teor de glicose é fracamente influenciado pelos tratamentos de intensidade severa e intermediária de APH.

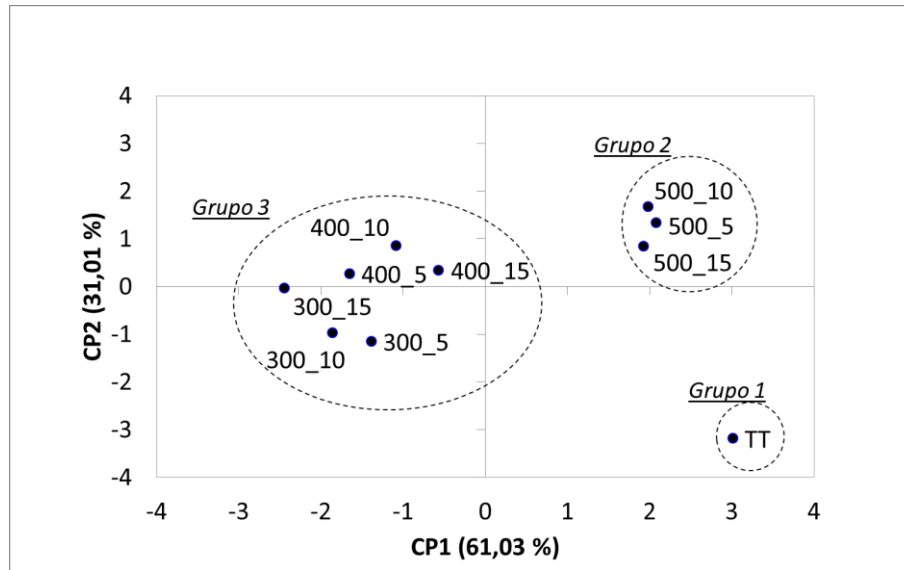


Figura 28: Distribuição dos mostos TT e APHs de acordo com análise de componentes principais (ACP)

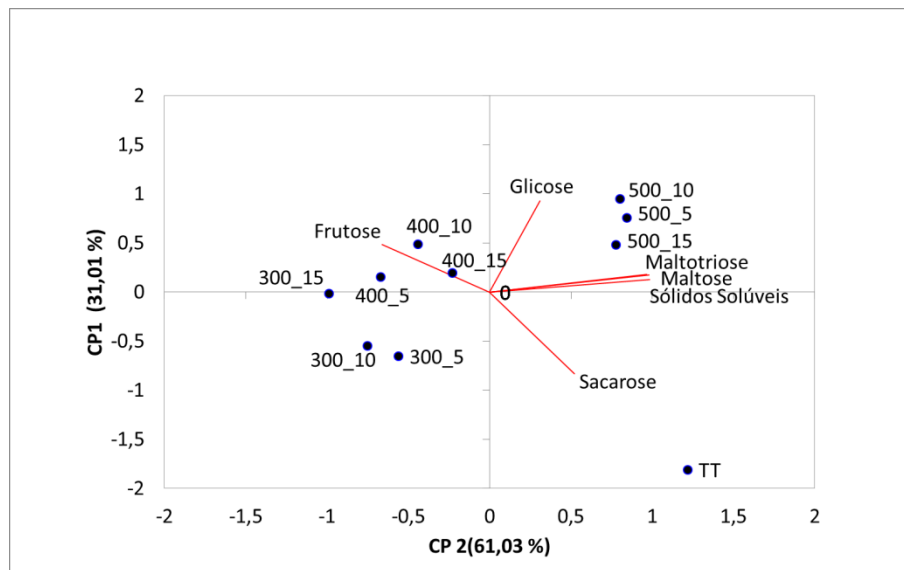


Figura 29: Distribuição das variáveis respostas (frutose, glicose, maltose, maltotriose, sacarose e teor de sólidos solúveis) dos mostos TT e APHs de acordo com análise de componentes principais (ACP)

É possível que esses resultados expressem a capacidade de cada grupo de tratamento ativar enzimas responsáveis pela formação ou hidrólise dos açúcares. Como foi observado em itens anteriores, o mosto TT exibe maiores teores de sacarose, e isso pode se dever ao fato da temperatura empregada desnaturar a enzima invertase e, dessa forma, prevenir a hidrólise e consequente redução da concentração do açúcar.

Os tratamentos mais intensos (Grupo 2) de APH, possivelmente, ativam mais eficientemente as enzimas relacionadas à hidrólise do amido, com liberação de maltose e maltotriose, e o aumento da concentração desses dois açúcares, por sua vez, contribui de forma expressiva para aumento do teor de sólidos solúveis.

Já os tratamentos de APH de intensidade moderada (Grupo 3) se caracterizam por ativar discretamente a enzima invertase contribuindo para aumento na concentração de frutose.

Apesar do teor de glicose ser influenciado tanto pelo Grupo 3 quanto pelo Grupo 2, a tendência discretamente mais acentuada no sentido do Grupo 2 pode se dever ao fato de as enzimas que produzem maltose e maltotriose liberem também menor quantidade de glicose.

4.3.4. Modelagem Matemática

A modelagem matemática é uma técnica utilizada para propor modelos empíricos (equações) capazes de descrever comportamento de determinadas variáveis de resposta diante da variação de um ou mais parâmetros de interesse. O ajuste de um modelo permite prever o comportamento de uma determinada característica quando os fatores assumem valores distintos e intermediários àqueles avaliados experimentalmente. Adicionalmente, a interpretação do modelo possibilita detectar condições capazes de otimizar a expressão da variável de resposta.

Dessa forma, foram realizadas tentativas de ajustamento de regressões capazes de descrever o comportamento do teor dos açúcares sacarose, glicose, frutose maltose e maltotriose e a concentração de sólidos solúveis diante da variação do tempo e pressão nos processos de APH.

A

Tabela 4 apresenta os resultados encontrados de análise de regressão dos modelos referentes ao teores dos diferentes açúcares e da concentração de sólidos solúveis.

Tabela 4: Modelos de regressão ajustados

Resposta	R ² (Modelos testados)		Modelo ajustado	
	4º ordem	2º ordem	(T e P: níveis codificados)	R ²
Frutose	0,4461	0,3174		-
Glicose	0,7277	0,6818	= 1,61 +0,30(P)	0,6576
Sacarose	0,2773	0,0974		-
Maltose	0,9912	0,9832	= 30,73 +40,89(P) +20,81(P ²) -0,12(T×P ²)	0,9880
Maltotriose	0,9967	0,9843	= 0,69 +0,88 (P) +0,20(P ²) -0,04(T×P ²)	0,9939
S. solúveis	0,9818	0,9743	= 80,16 +40,47(P) +20,20 (P ²)	0,9696

Não houve significância para os modelos de segundo e quarto grau ajustados para os açúcares sacarose, glicose e frutose. Frutose e sacarose geraram modelos empíricos que não servem para descrever o comportamento destes açúcares em função de tempo e pressão (valores baixos de R², não significância do modelo e não significância de todos os coeficientes dos modelos (P>0,05), conforme apresentados nas Tabela 5 e Tabela 6).

Tabela 5: Análise de Variância para modelos de segundo e quarto grau para sacarose.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P
Modelo de quarto grau ($R^2 = 0,27734$)	0,0271	8	0,0033	0,4317	0,8744
T	0,0023	1	0,0022	0,2891	0,6037
T ²	0,0011	1	0,0010	0,1346	0,7221
P	0,0015	1	0,0015	0,1935	0,6703
P ²	0,0002	1	0,0001	0,0199	0,8908
T x P	0,0045	1	0,0045	0,5751	0,4676
T x P ²	0,0074	1	0,0073	0,9368	0,3583
T ² x P	0,0084	1	0,0084	1,0754	0,3267
T ² x P ²	0,0018	1	0,0018	0,2294	0,6433
Error	0,0706	9	0,0078		
Total	0,0977	17			
Modelo quadrático ($R^2 = 0,09735$)	0,0095	5	0,0019	0,2588	0,9270
T	0,0023	1	0,0023	0,3087	0,5887
T ²	0,0011	1	0,0011	0,1437	0,7112
P	0,0015	1	0,0015	0,2066	0,6575
P ²	0,0002	1	0,0002	0,0213	0,8865
T x P	0,0045	1	0,0045	0,6139	0,4485
Error	0,0882	12	0,0074		
Total	0,0977	17			

T: coeficiente linear de tempo; P: coeficiente linear de pressão; T²: coeficiente quadrático de tempo; P²: coeficiente quadrático de pressão; TxP, TxP², T²xP, T²xP²: interações entre fatores lineares e quadráticos de tempo e pressão.

Tabela 6: Análise de Variância para modelos de segundo e quarto graus para frutose.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P
Modelo de quarto grau ($R^2 = 0,44606$)	0,161	8	0,0202	0,9059	0,5500
T	0,008	1	0,0080	0,3584	0,5641
T ²	0,001	1	0,0012	0,0548	0,8201
P	0,009	1	0,0096	0,4311	0,5278
P ²	0,034	1	0,0342	1,5318	0,2471
T x P	0,062	1	0,0621	2,7806	0,1297
T x P ²	0,038	1	0,0380	1,7008	0,2245
T ² x P	0,002	1	0,0029	0,1309	0,7257
T ² x P ²	0,005	1	0,0057	0,2586	0,6233
Error	0,201	9	0,0223		
Total	0,363	17			
Modelo quadrático ($R^2 = 0,3174$)	0,115	5	0,023	1,1159	0,4023
T	0,008	1	0,0080	0,3878	0,5450
T ²	0,001	1	0,0012	0,0593	0,8116
P	0,009	1	0,0096	0,4665	0,5075
P ²	0,034	1	0,0342	1,6574	0,2222
T x P	0,062	1	0,0621	3,0087	0,1084
Error	0,247	12	0,0206		
Total	0,363	17			

T: coeficiente linear de tempo; P: coeficiente linear de pressão; T²: coeficiente quadrático de tempo; P²: coeficiente quadrático de pressão; TxP, TxP², T²xP, T²xP²: interações entre fatores lineares e quadráticos de tempo e pressão.

Para glicose, apesar de o modelo quadrático ter sido significativo, apenas o termo linear da pressão exibiu significância e o R² foi de apenas 0,68 (Tabela 7). Assim, o modelo, apesar de ajustado, não pode ser usado para descrever o comportamento do teor de glicose em função do tempo e pressão. Contudo, é possível sugerir que a concentração de glicose exibe pequeno efeito linear positivo com aumento da pressão.

Tabela 7: Análise de Variância para modelos de segundo e quarto grau para glicose.

Fonte de Variação	SQ	Gl	QM	F	P
Modelo de quarto grau ($R^2 = 0,72769$)	1,1886	8	0,1485	3,0063	0,0607
T	0,0032	1	0,0031	0,0641	0,8057
T ²	0,0000	1	0,0000	0,0000	0,9941
P	1,0740	1	1,0740	21,7329	0,0011
P ²	0,0345	1	0,0345	0,6988	0,4248
T x P	0,0018	1	0,0018	0,0364	0,8528
T x P ²	0,0459	1	0,0459	0,9295	0,3601
T ² x P	0,0280	1	0,0280	0,5669	0,4707
T ² x P ²	0,0011	1	0,0010	0,0220	0,8852
Error	0,4448	9	0,0494		
Total	1,6333	17			
Modelo quadrático ($R^2 = 0,6817$)	1,1135	5	0,2227	5,14118	0,0094
T	0,0032	1	0,0032	0,0732	0,7914
T ²	0,0000	1	0,0000	0,0001	0,9937
P	1,0740	1	1,0740	24,7939	0,0003
P ²	0,0345	1	0,0345	0,7972	0,3895
T x P	0,0018	1	0,0018	0,0416	0,8419
Error	0,5198	12	0,0433		
Total	1,6333	17			
Modelo ajustado ($R^2 = 0,6575$)	1.0740	1	1.0740	30.7236	0.0001
P	1.0740	1	1.0740	21.7330	0.0012
Perda de ajuste	0.1145	7	0.0164	0.3311	0.9204
Erro puro	0.4448	9	0.0494		
Total	1.6333	17			

T: coeficiente linear de tempo; P: coeficiente linear de pressão; T²: coeficiente quadrático de tempo; P²: coeficiente quadrático de pressão; TxP, TxP², T²xP, T²xP²: interações entre fatores lineares e quadráticos de tempo e pressão.

Maltose e maltotriose geraram os melhores modelos com bons ajustes ($R^2 > 0,98$), sendo considerados significativamente ajustados para descrever o comportamento dos teores desses açúcares em função do tempo e pressão. Quando os termos não significativos (Tabela 8 e Tabela 9) foram retirados dos modelos de quarta ordem para ambos açúcares, as faltas de ajuste mostraram-se não significativas ($p = 0,2883$ e $0,6665$, respectivamente) e os modelos mostraram-se significativos.

Tabela 8: Análise de Variância para modelos de segundo e quarto grau para maltose.

Fonte de Variação	SQ	GI	QM	F	P
Modelo de quarto grau ($R^2 = 0,99122$)	321,775	8	40,22194	126,9615	< 0,0001
T	0,496	1	0,496	1,566	0,2423
T ²	0,071	1	0,0711	0,224	0,6469
P	286,749	1	286,749	905,132	0,0000
P ²	31,509	1	31,509	99,460	0,0000
T x P	0,342	1	0,342	1,080	0,3257
T x P ²	2,480	1	2,480	7,828	0,0208
T ² x P	0,094	1	0,0944	0,297	0,5985
T ² x P ²	0,0323	1	0,0323	0,102	0,7568
Error	2,851	9	0,316		
Total	324,626	17			
Modelo quadrático ($R^2 = 0,98319$)	319,168	5	63,8338	140,3463	< 0,0001
T	0,496	1	0,496	1,090	0,3169
T ²	0,071	1	0,0711	0,156	0,6995
P	286,749	1	286,749	630,454	0,0000
P ²	31,509	1	31,509	69,277	0,0000
T x P	0,342	1	0,342	0,752	0,4026
Error	5,458	12	0,454		
Total	324,626	17			
Modelo ajustado ($R^2 = 0,98802$)	9,607	3	3,202	765,747	< 0,0001
P	9,336	1	9,336	2610,693	< 0,0001
P ²	0,152	1	0,152	42,710	0,0001
T x P ²	0,118	1	0,118	33,078	0,0003
Perda de ajuste	0,026	5	0,005	1,474	0,2883
Error puro	0,032	9	0,003		
Total	9,666	17			

T: coeficiente linear de tempo; P: coeficiente linear de pressão; T²: coeficiente quadrático de tempo; P²: coeficiente quadrático de pressão; TxP, TxP², T²xP, T²xP²: interações entre fatores lineares e quadráticos de tempo e pressão.

Tabela 9: Análise de Variância para modelos de segundo e quarto grau para maltotriose.

Fonte de Variação	SQ	GI	QM	F	P
Modelo de quarto grau (R ² = 0,99667)	9,634	8	1,204	336,731	< 0,0001
T	0,496	1	0,496	1,566	0,2423
T ²	0,071	1	0,071	0,224	0,6469
P	286,749	1	286,749	905,132	0,0000
P ²	31,509	1	31,509	99,460	0,0000
T x P	0,342	1	0,342	1,080	0,3257
T x P ²	2,480	1	2,480	7,828	0,0208
T ² x P	0,094	1	0,094	0,297	0,5985
T ² x P ²	0,032	1	0,032	0,102	0,7568
Error	2,851	9	0,316		
Total	324,626	17			
Modelo quadrático (R ² = 0, 98434)	9,515	5	1,903	150,877	<0,0001
T	0,008	1	0,008	0,634	0,4410
T ²	0,001	1	0,001	0,137	0,7171
P	9,336	1	9,336	740,253	0,0000
P ²	0,152	1	0,152	12,110	0,0045
T x P	0,015	1	0,015	1,249	0,2856
Error	0,151	12	0,012		
Total	9,666	17			
Modelo ajustado (R ² =0, 99394)	9,607	3	3,202	765,747	<0,0001
P	9,336	1	9,336	2610,693	< 0,0001
P ²	0,152	1	0,152	42,710	0,0001
T x P ²	0,118	1	0,118	33,078	0,0003
Perda de ajuste	0,026	5	0,005	1,474	0,2883
Error puro	0,032	9	0,003		
Total	9,666	17			

T: coeficiente linear de tempo; P: coeficiente linear de pressão; T²: coeficiente quadrático de tempo; P²: coeficiente quadrático de pressão; TxP, TxP², T²xP, T²xP²: interações entre fatores lineares e quadráticos de tempo e pressão.

Para o teor de sólidos solúveis, da mesma forma, o modelo ajustado foi significativo e a perda de ajuste não significativa (

Tabela 10). Dessa forma, o modelo ajustado é adequado para descrever o comportamento frente às variações de pressão e tempo. No entanto, o modelo ajustado exibe coeficientes significativos apenas para o fator pressão, com termos linear e quadrático. O efeito dos termos linear e quadrático foram similares aos do modelo ajustado para a maltose. Esta observação sugere que a variação dos sólidos solúveis se dá, predominantemente, devido à variação do teor de maltose.

Tabela 10: Análise de Variância para modelos de segundo e de quarto grau para teor de sólidos solúveis.

Fonte de Variação	SQ	Gl	QM	F	P
Modelo de quarto grau (R ² = 0,99667)	262,181	8	32,7726	60,692	< 0,0001
T	1,252	1	1,252	2,319	0,1621
T ²	0,001	1	0,001	0,002	0,9592
P	239,497	1	239,497	443,531	< 0,0001
P ²	19,432	1	19,432	35,986	0,0002
T x P	0,003	1	0,003	0,005	0,9413
T x P ²	1,764	1	1,764	3,267	0,1041
T ² x P	0,171	1	0,171	0,318	0,5865
T ² x P ²	0,057	1	0,057	0,106	0,7512
Error	4,859	9	0,540		
Total	267,040	17			
Modelo quadrático (R ² = 0, 98434)	260,187	5	52,037	91,109	< 0,0001
T	1,252	1	1,252	2,193	0,1644
T ²	0,001	1	0,001	0,002	0,9601
P	239,497	1	239,497	419,323	< 0,0001
P ²	19,432	1	19,432	34,022	0,0001
T x P	0,003	1	0,003	0,005	0,9425
Error	6,853	12	0,571		
Total	267,040	17			
Modelo ajustado (R ² =0, 99394)	258,9290	2	129,464	239,421	< 0,0001
P	239,4976	1	239,4976	443,5310	< 0,0001
P ²	19,4321	1	19,4321	35,9867	0,0002
Perda de ajuste	3,2513	6	0,5419	1,0035	0,4780
Error puro	4,8598	9	0,5400		
Total	267,0408	17			

T: coeficiente linear de tempo; P: coeficiente linear de pressão; T²: coeficiente quadrático de tempo; P²: coeficiente quadrático de pressão; TxP, TxP², T²xP, T²xP²: interações entre fatores lineares e quadráticos de tempo e pressão.

Assim, foi possível construir superfícies de resposta capazes de descreverem os teores de maltose, maltotriose e sólidos solúveis em função do tempo e pressão dentro dos intervalos avaliados (Figura 30). De acordo com esses gráficos, o teor de maltose, maltotriose e sólidos solúveis dependem pouco ou nada do tempo de pressurização, na faixa de experimentação (5 – 15 min). Já a pressão influencia positivamente e de forma não linear, sendo menos notório para a maltotriose devido aos pequenos valores dos coeficientes.

Esses resultados sugerem ser possível incrementar os teores de maltose, maltotriose e sólidos solúveis no mosto cervejeiro operando em altas pressões (500 MPa) com pouca

duração do processo (5 min), como pode ser visto nas regiões vermelhas das superfícies de resposta.

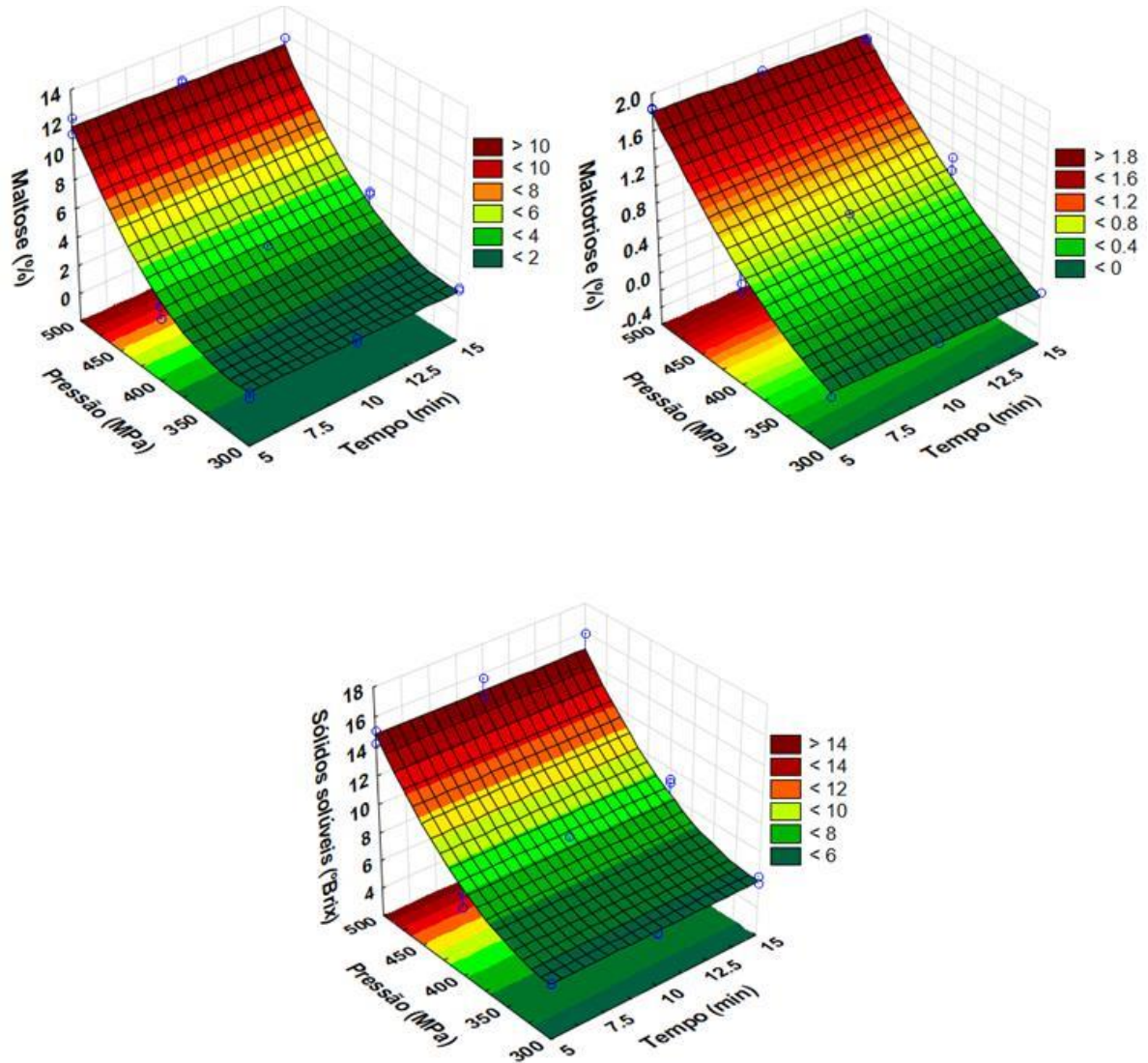


Figura 30: Superfícies de resposta ajustadas para o comportamento da concentração (%) de maltose, maltotriose e sólidos solúveis em mosto pressurizado a 300, 400 ou 500 MPa por 5, 10 ou 15 minutos.

5 CONCLUSÕES

A Alta Pressão Hidrostática foi capaz de alterar o perfil de açúcares do mosto cervejeiro. Observou-se uma tendência ao aumento na produção de sólidos solúveis, maltose, maltotriose e frutose com o aumento da pressão, principalmente nos níveis mais intensos. O fator tempo exerceu menor influência que o fator pressão em todos os níveis. Única exceção foi a sacarose que não foi detectado efeito da APH sobre a sua concentração.

Em relação ao efeito da APH, observou-se a gelatinização do amido, indicativo de hidrólise, e um progressivo inchamento, que é um indicativo da gelatinização, dos grânulos de amido com o aumento da pressão, principalmente a 500 MPa. Mais uma vez, o fator tempo não foi tão expressivo quanto o fator pressão, mas pelo teste de presença de amido (teste do iodo) sugere-se que o aumento do tempo diminuiu o teor de amido no tratamento a 500 MPa.

De maneira geral, a APH se mostrou capaz de propiciar uma gelatinização parcial do amido e com isso permitiu a sua hidrólise enzimática gerando açúcares fermentescíveis e não fermentescíveis no mosto pressurizado. No nível mais intenso de pressão (500 MPa), inclusive, os teores de maltose, maltotriose e frutose foram similares ao mosto controle (produzido por TT).

Considerando que a APH hidrostática demonstrou melhor efeito com 5 minutos de processo e o tratamento térmico tem duração ao redor de 80 minutos com aquecimento constante, a economia em vapor e tempo de processo é relevante.

Com esta redução considerável de vapor e tempo de processo, sugere-se como continuidade desta pesquisa, a produção de cerveja a partir de mosto pressurizado com objetivo de comparar se a mudança no perfil de açúcares em relação ao tratamento térmico resulta de fato em uma cerveja diferente do ponto de vista físico-químico e sensorial se torna interessante. Também poder-se-ia quantificar a atividade das enzimas amilolíticas no mosto pressurizado e associando à formação de açúcares desta pesquisa com objetivo de elucidar quais enzimas são ativadas e inativadas ao longo dos diferentes níveis de pressão e tempo. De qualquer forma, é importante ressaltar que não há outros trabalhos na literatura que tenham efetuados a análise do perfil de açúcares e, desse modo, a contribuição do presente estudo abre novas perspectivas de avanço científico e tecnológico para elucidação dos efeitos e potenciais benefícios da alta pressão na fase de mostura no processamento de cerveja.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLOSIO-OUARNIER, B. N.; QUEMENER, B.; BERTRAND, D.; BOIVIN, P.; CEDEX, V. Application of High Performance Anion Exchange Chromatography to the Study of Carbohydrate Changes in Barley During Malting. **Exchange Organizational Behavior Teaching Journal**, v. 106, n. 1, p. 45–52, 2000.
- AMORE, A.; FARACO, V. Enzymes for Food and Beverage Industries: Current Situation, Challenges and Perspectives. In: RAVISHANKAR, R. V. (Ed.). **Advances in Food Biotechnology**. 1a edição ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2015. p. 165.
- BAMFORTH, C. W. Nutritional aspects of beer—a review. **Nutrition Research**, v. 22, n. 1–2, p. 227–237, 2002.
- BAMFORTH, C. W. Barley and Malt Starch in Brewing : A General Review. **MBAA TQ**, v. 40, n. 2, p. 89–97, 2003.
- BAMFORTH, C. W. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 3, p. 353–357, 2009.
- BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. High Pressure Treatment Effect on Physicochemical and Nutritional Properties of Fluid Foods During Storage: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 3, p. 307–322, 2012.
- BEMILLER, J. N.; WHISTLER, R. L. (EDS.). **Starch Chemistry and Technology. 3rd Edition**. 3a edição ed. Amsterdam: Academic Press, 2009. v. 1
- BOURQUE, C. **Fermentability of Canadian Two-Row Barley Malt: Wort Turbidity, Density, and Sugar Content as Measures of Fermentation Potential**. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2013.
- BRANDAM, C.; MEYER, X. M.; PROTH, J.; STREHAIANO, P.; PINGAUD, H. An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 1, p. 43–52, 2003.
- BRASIL. **Produção de cervejas e refrigerantes** Brasília: Receita Federal do Brasil SICOBEB - Sistema de Controle de Produção de Bebidas, , 2015.
- BRIGGS, D. E. Malt Modification — A Century Of Evolving Views. **J. Inst. Brew.**, v. 108, n. 4, p. 395–405, 2002.
- BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing Science and Practice**. 1. ed. Nova Iorque: CRC Press LCC, 2004.
- BUCKOW, R.; WEISS, U.; HEINZ, V.; KNORR, D. Stability and Catalitic Activity of Alpha-Amylase from Barley Malt at Different Pressure-Temperature Conditions. **Biotechnology and bioengineering**, v. 97, n. 1, p. 1–11, 2007.
- BUCKOW, R.; HEINZ, V.; KNORR, D. Effect of high hydrostatic pressure-temperature combinations on the activity of beta-glucanase from barley malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, n. 3, p. 282–289, 2005.
- BUTTNER, E. T.; BRIGGS, D. E. Characterization of solubilized forms of bound β -amylase released by various agents. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 106, n. 2, p. 71–82, 2000.

- BUTZ, P.; GARCÍA, A. F.; LINDAUER, R.; DIETERICH, S.; BOGNAR, A.; TAUSCHER, B. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 233–236, 2003.
- BUZRUL, S. A suitable model of microbial survival curves for beer pasteurization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 1330–1336, 2007.
- BUZRUL, S. High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 13, n. JANUARY, p. 1–12, 2012.
- BUZRUL, S.; ALPAS, H.; BOZOGLU, F. Effect of high hydrostatic pressure on quality parameters of lager beer. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 10, p. 1672–1676, 2005a.
- BUZRUL, S.; ALPAS, H.; BOZOGLU, F. Effects of high hydrostatic pressure on shelf life of lager beer. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 5–6, p. 615–618, 2005b.
- CAMPUS, M. High Pressure Processing of Meat, Meat Products and Seafood. **Food Engineering Reviews**, v. 2, n. 4, p. 256–273, 2010.
- CASTELLARI, M.; ARFELLI, G.; RIPONI, C.; CARPI, G.; AMATI, A. High hydrostatic pressure treatments for beer stabilization. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p. 974–977, 2000.
- CERVBRASIL - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA. **Anuário 2015**. Disponível em: <http://cervbrasil.org.br/arquivos/anuario_cb_2015_web.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2016.
- CHEFTEL, J. C. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation / Revisión: Alta-presión, inactivación microbiológica y conservación de alimentos. **Food Science and Technology International**, v. 1, n. 2–3, p. 75–90, 1995.
- CRISTEA, S. P.; MAZAEDA, R.; DE PRADA, C. Optimal control of beer filtration process. **IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)**, v. 10, n. PART 1, p. 762–767, 2013.
- DONADINI, G.; FUMI, M. D.; KORDIALIK-BOGACKA, E.; MAGGI, L.; LAMBRI, M.; SKOKAI, P. Consumer interest in specialty beers in three European markets. **Food Research International**, v. 85, p. 301–314, 2016.
- DOUZALS, J. P.; MARECHAL, P. A.; COQUILLE, J. C.; GERVAIS, P. Microscopic Study of Starch Gelatinization under High Hydrostatic. **J. Agric. Food Chem**, v. 4, p. 1403–1408, 1996.
- DURAND, G. A.; CORAZZA, M. L.; BLANCO, A. M.; CORAZZA, F. C. Dynamic optimization of the mashing process. **Food Control**, v. 20, n. 12, p. 1127–1140, 2009.
- EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. High pressure enhancement of enzymes: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 5, p. 331–347, 2009.
- ESSLINGE, H. M. (ED.). **Handbook of Brewing**. weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
- EVANS, D.; SHEEHAN, M. C.; STEWART, D. C. Impact of Malt Derived Proteins on Beer Foam Quality. Part II: The Influence of Malt Foam positive Proteins and Non- starch Polysaccharides on Beer Foam Quality. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 105, n. 2, p. 171–177, 1999.
- FARKAS, D. F.; HOOVER, D. G. High pressure processing. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8 SPEC. SUPPL., p. 47–64, 2000.
- FARR, D. High pressure technology in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 1, p. 14–16, 1990.
- FEILNER, R.; JACOB, F. F. Improving resistance to aging and increasing haze stability in southern German wheat beer through process optimization. **Monatsschrift für Brauwissenschaft**, v. 68, p. 58,

2015.

FISCHER, S.; SCHÖBERL, H.; RUSS, W. MEYER-PITTRROFF, R. Auswirkungen von hydrostatischem Hochdruck auf den Brauprozess und das Bier. **Monatsschrift für Brauwissenschaft**, v. 51, n. 7–8, p. 120–123, 1998.

FISCHER, S.; RUSS, W.; BUCKOW, R.; HEINZ, V.; ULMER, H.; BEHR, J.; KNOOR, D.; VOGEL, R. F. Effects of hydrostatic high pressure on micro- biological and technological characteristics of beer. **Monatsschrift für Brauwissenschaft**, June, p. 90–99, 2006.

Fluxograma de produção de cerveja. Disponível em: <<http://www.dortmund.com.br/fabricacao.php>>. Acesso em: 1 out. 2016.

FRANCHI, M. A.; TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M. Inactivation of *Lactobacillus brevis* in beer utilizing a combination of high-pressure homogenization and lysozyme treatment. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 4, p. 634–638, 2011a.

FRANCHI, M. A.; TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M. Effects of High Pressure Homogenization on Beer Quality Attributes. **Journal Of The Institute Of Brewing**, v. 117, n. 2, p. 195–198, 2011b.

GAETANO, G. DE; CONSTANZO, S.; CASTELNUOVO, A. DI; BADIMON, L.; BEJKO, D. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 26, n. 6, p. 443–467, 2016.

GÄNZLE, M. G.; ULMER, H. M.; VOGEL, R. F. High pressure inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a model beer system. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 1174–1181, 2001.

GOMES, M. R. A.; CLARK, R.; LEDWARD, D. A. Effects of high pressure on amylases and starch in wheat and barley flours. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 363–372, 1998.

GUPTA, M.; ABU-GHANNAM, N.; GALLAGHAR, E. Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 318–328, 2010.

HAGER, A.; TAYLOR, J. P.; WATERS, D. M.; ARENDT, E. K. Gluten free beer-A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, p. 44–54, 2014.

HARA, A.; NAGAHAMA, G.; OHBAYASHI, A.; HAYASHI, R. Effects of high pressure on inactivation of enzymes and microorganisms in non-pasteurized rice wine (Namazake). **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan (Japan)**, 1990.

HEINZ, V.; BUCKOW, R.; KNORR, D. Catalytic Activity of β -Amylase from Barley in Different Pressure/ Temperature Domains. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 1632–1638, 2005.

HEITMANN, M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Impact of different beer yeasts on wheat dough and bread quality parameters. **Journal of Cereal Science**, v. 63, p. 49–56, 2015.

HITE, B. H. The effect of pressure in the preservation of milk: a preliminary report. **West Virginia Agricultural Experiment Station**, v. 58, 1899.

HOLTZ, C.; GASTL, M.; BECKER, T. Turbidity potentials of single long-chain fatty acids and gelatinised starch in synthetic lautering wort. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 4, p. 906–912, 2015.

HU, S.; DONG, J.; FAN, W.; YU, J.; YIN, H.; HUANG, S.; LIU, J.; HUANG, S.; ZHANG, X. The influence of proteolytic and cytolytic enzymes on starch degradation during mashing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 379–384, 2014.

HUANG, H. W.; HSU, C. P. YANG, B. B.; WANG, C. Y. Potential utility of high-pressure processing to address the risk of food allergen concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 1, p. 78–90, 2014.

- IMBERTY, A.; BULÉON, A.; TRAN, V.; PÉREZ, S. Recent Advances in Knowledge of Starch Structure. **Starch - Stärke**, v. 43, n. 10, p. 375–384, 1991.
- JENKINS, P. J.; DONALD, A. M. Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/SANS study. **Carbohydrate Research**, v. 308, p. 133–147, 1998.
- KALICHEVSKY, M. T.; KNORR, D.; LILLFORD, P. J. Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions. **Trends in Food Science Technology**, v. 6, n. 8, p. 253–259, 1995.
- KING, B. M.; DUINEVELD, C. A. . Changes in bitterness as beer ages naturally. **Food Quality and Preference**, v. 10, n. 4–5, p. 315–324, 1999.
- KNORR, D.; SCHLUETER, O.; HEINZ, V. **Impact of high hydrostatic pressure on phase transitions of foods** Food technology (USA), , 1998.
- KRAFTCHICK, J. F.; BYRD, E. T.; CANZIANI, B. GLADWELL, N. J. Understanding beer tourist motivation. **Tourism Management Perspectives**, v. 12, p. 41–47, 2014.
- KÜHBECK, F.; BACK, W.; KROTTENTHALER, M. Influence of Lauter Turbidity on Wort Composition, Fermentation Performance and Beer Quality - A Review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 3, p. 215–221, 2006.
- KUNUGI, S. Enzyme Reactions under High Pressure and Their Applications. **Enzyme Engineering XI**, v. 672, n. 1, p. 293–304, 1992.
- KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. 5. ed. Berlin: VLB, 2014.
- LACROIX, N.; FLISS, I.; MAKHLOUF, J. Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. **Food Research International**, v. 38, p. 569–576, 2005.
- LAURO, M.; POUTANEN, K.; FORSELL, P. Effect of partial gelatinization and lipid addition on α -amylolysis of barley starch granules. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 595–601, 2000.
- LIMA, L.; BRANDÃO, T.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Comparing the Impact of Environmental Factors During Very High Gravity Brewing Fermentations. **J. Inst. Brew.**, v. 117, n. 3, p. 359–367, 2011.
- LIU, F.; LI, R.; WANG, Y.; BI, X.; LIAO, X. Effects of high hydrostatic pressure and high-temperature short-time on mango nectars: Changes in microorganisms, acid invertase, 5-hydroxymethylfurfural, sugars, viscosity, and cloud. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 22–30, 2014.
- LIU, Y.; SELOMULYO, V. O.; ZHOU, W. Effect of high pressure on some physicochemical properties of several native starches. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 1, p. 126–136, 2008.
- LODOLO, E. J.; KOCK, J. L. F.; AXCELL, B. C.; BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1018–1036, 2008.
- MACGREGOR, A. W.; BAZIN, S. L.; MACRI, L. J.; BABB, J. C. Modelling the Contribution of Alpha-Amylase , Beta-Amylase and Limit Dextrinase to Starch Degradation During Mashing. **Journal of Cereal Science**, v. 29, p. 161–169, 1999.
- MENESES, F. J.; HENSCHKE, P. A.; JIRANEK, V. A survey of industrial strains of *saccharomyces cerevisiae* reveals numerous altered patterns of maltose and sucrose utilisation. **Journal Of The Institute Of Brewing**, v. 108, n. 3, p. 310–321, 2002.
- MERTENS, B.; DEPLACE, G. **Engineering aspects of high pressure technology in the food industry** Food technology (USA), , 1993.
- MILLAN-TESTA, C. E.; MENDEZ-MONTEALVO, M. G.; OTTENHOF, M. A.; FARHAT, I. A.;

- BELLO-PÉREZ, L. A. Determination of the molecular and structural characteristics of okenia, mango, and banana starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 495–501, 2005.
- MONTANARI, L.; FLORIDI, S.; MARCONI, O.; TIRONZELLI, M.; FANTOZZI, P. Effect of mashing procedures on brewing. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 1–2, p. 175–179, 2005.
- MOZHAEV, V. V.; LANGE, R.; KUDRYASHOVA, E. V.; BALNY, C. Application of high hydrostatic pressure for increasing activity and stability of enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, n. 2, p. 320–331, 1996.
- MÚJICA-PAZ, H.; VALDEZ-FRAGOSO, A.; SAMSON, C. T.; WELTI-CHANES, J.; TORRES, A. High-Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 969–985, 2011.
- MULLER, R. the Effects of Mashing Temperature and Mash Thickness on Wort Carbohydrate Composition. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 97, n. 2, p. 85–92, 1991.
- MULLER, R. A mathematical model of the formation of fermentable sugars from starch hydrolysis during high-temperature mashing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3–5, p. 337–344, 2000.
- MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases - An overview. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 2, p. 163–173, 2005.
- MUSTER-SLAWITSCH, B.; WEISS, W.; SCHNITZER, H.; BRUNNER, C. The green brewery concept - Energy efficiency and the use of renewable energy sources in breweries. **Applied Thermal Engineering**, v. 31, n. 13, p. 2123–2134, 2011.
- NOEL MARIE-OLIVE, M.; ATHES, V.; COMBES, D. Combined effects of pressure and temperature on enzyme stability. **International Journal of High Pressure Research**, v. 19, n. 1–6, p. 317–322, 2000.
- NORTHROP, D. B. Effects of high pressure on enzymatic activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1595, n. 1–2, p. 71–79, 2002.
- OLAJIRE, A. A. The brewing industry and environmental challenges. **Journal of Cleaner Production**, p. 1–21, 2012.
- OSUMI, M.; SATO, M.; KOBORI, H.; FENG, Z. H.; ISHIJIMA, S. A.; HAMADA, K.; SHIMADA, S. Morphological effects of pressure stress on yeasts. **Progress in Biotechnology**, v. 13, p. 37–46, 1996.
- PADIERNOS, C. A.; LIM, S.-Y.; SWANSON, B. G.; ROSS, C. F.; CLARK, S. High hydrostatic pressure modification of whey protein concentrate for use in low-fat whipping cream improves foaming properties. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 7, p. 3049–56, 2009.
- PÁTKOVÁ, J.; SMOGROVICOVÁ, D.; BAFRNCOVÁ, P.; DÖMÉNY, Z. Changes in the yeast metabolism at very high-gravity wort fermentation. **Folia microbiologica**, v. 45, n. 4, p. 335–338, 2000.
- PATTERSON, M. F. Microbiology of pressure-treated foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1400–1409, 2005.
- PEI-LING, L.; XIAO-SONG, H.; QUN, S. Effect of high hydrostatic pressure on starches: A review. **Starch - Stärke**, v. 62, p. 615–628, 2010.
- PÉREZ-LAMELA, C.; LEDWARD, D. A.; REED, R. J. R.; SIMAL-GÁNDARA, J. Application of high-pressure treatment in the mashing of white malt in the elaboration process of beer. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. October 2001, p. 258–262, 2002.

- PÉREZ-LAMELA, C.; REED, R. J. R.; SIMAL-GÁNDARA, J. High pressure application to wort and beer. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 100, n. 2, p. 53–56, 2004.
- PFLANZER, S.; CRUZ, A.; HATANAKA, C.; GIGANTE, M. Revisão : Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas , microbiológicas e nutricionais do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 4, p. 241–251, 2008.
- PIDDOCKE, M. P.; KREISZ, S.; HELDT-HANSEN, H. P.; NIELSEN, K. F.; OLSSON, L. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 453–464, 2009.
- PREEDY, V. R. (ED.). **Beer in Health and Disease Prevention**. California: Press, Academic, 2011.
- PUTSEYS, J. A.; LAMBERTS, L.; DELCOUR, J. A. Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 238–247, 2010.
- RAKETE, S.; KLAUS, A.; GLOMB, M. A. Investigations on the maillard reaction of dextrans during aging of pilsner type beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9876–9884, 2014.
- RASTOGI, N. K. **Recent Developments in High Pressure Processing of Foods**. 1a edição ed. Nova Iorque: Springer, 2013.
- RENDUELES, E.; OMER, M. K.; ALVSEIKE, O.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R.; PRIETO, M. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 5, p. 1251–1260, 2011.
- SCHNEIDERBANGER, H.; KOOB, J.; POLTINGER, S.; JACOB, F.; HUTZLER, M. Gene expression in wheat beer yeast strains and the synthesis of acetate esters. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 3, p. 403–411, 2016.
- SEBRAE. **Potencial de consumo de cervejas no Brasil**. 2014 Disponível em: <<http://segmentos.sebrae2014.com.br/agronegocio/potencial-de-consumo-de-cervejas-no-brasil/>>. Acesso em: 3 nov. 2014.
- SEBRAE. **Relatório de Inteligência sobre Cervejas Artesanais**. 2015 Disponível em: <<https://www.sebraeinteligenciasetorial.com.br/produtos/relatorios-de-inteligencia/cervejas-artesanais/55c4ad3614d0c01d007ffeae#download>>. Acesso em: 28 jul. 2016.
- SELMI, B.; MARION, D.; PERRIER CORNET, J. M.; DOUZALS, J. P.; GERVAIS, P. Amyloglucosidase hydrolysis of high-pressure and thermally gelatinized corn and wheat starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2629–2633, 2000.
- SHUMIN, H.; YU, J.; DONG, J.; EVANS, D.; LIU, J.; HUANG, S.; HUANG, S.; FAN, W.; YIN, H.; LI, M. Relationship between levels of diastatic power enzymes and wort sugar production from different barley cultivars during the commercial mashing process of brewing. **Starch - Stärke**, v. 66, p. 615–623, 2014.
- SIEBERT, K. J.; CARRASCO, A.; LYNN, P. Y. Formation of Protein - Polyphenol Haze in Beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry ...**, v. 44, n. 5, p. 1997–2005, 1996.
- SILVA, F.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; TEIXEIRA, N. Polipeptídeos e proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja e métodos analíticos utilizados no seu estudo. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1326–1331, 2006.
- SMELT, J. P. P. . Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 4, p. 152–158, 1998.
- STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! **Phytochemistry**, v. 65, n. 10, p. 1317–1330, 2004.

- STOLT, M.; OINONEN, S.; AUTIO, K. Effect of high pressure on the physical properties of barley starch. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, n. 3, p. 167–175, 2000.
- TAMAOKA, T.; ITOH, N.; HAYASHI, R. High Pressure Effect on Maillard Reaction. **Agricultural and biological chemistry**, v. 55, n. 8, p. 2071–2074, 1991.
- TANG, H.; MITSUNAGA, T.; KAWAMURA, Y. Relationship between functionality and structure in barley starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 2, p. 145–152, 2004.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch - Composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004.
- TRIBST, A. A. L.; AUGUSTO, P. E. D.; CRISTIANINI, M. Multi-pass high pressure homogenization of commercial enzymes: Effect on the activities of glucose oxidase, neutral protease and amyloglucosidase at different temperatures. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 18, p. 83–88, 2013.
- TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M. Changes in commercial glucose oxidase activity by high pressure homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 355–360, 2012.
- ULMER, H. M.; HERBERHOLD, H.; FAHSEL, S.; GÄNZLE, M. G.; WINTER, R.; VOGEL, R. F. Effects of pressure-induced membrane phase transitions on inactivation of HorA, an ATP-dependent multidrug resistance transporter, in *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1088–1095, 2002.
- ULMER, H. M.; GÄNZLE, M. G.; VOGEL, R. F. Effects of High Pressure on Survival and Metabolic Activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1. 460. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3966–3973, 2000.
- VASANTHAN, T.; BHATTY, R. S. **Physicochemical properties of small- and large-granule starches of waxy, regular, and high-amylose barleys** *Cereal Chemistry*, 1996.
- VRIESEKOOP, F.; RATHBAND, A.; MACKINLAY, J.; BRYCE, J. H. The evolution of dextrans during the mashing and fermentation of all-malt Whisky production. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, n. 3, p. 230–238, 2010.
- WALTERS, M. T.; HAESMAN, A. P.; HUGHES, P. S. Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavour stability. Part 2: Extended storage trials. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 55, n. 3, p. 91–98, 1997.
- WIEME, A. D.; SPITAEELS, F.; AERTS, M.; DE BRUYNE, K.; VAN LANDSCHOOT, A.; VANDAMME, P. Identification of beer-spoilage bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 41–50, 2014.
- WILSON, D. R.; DABROWSKI, L.; STRINGER, S.; MOEZELAAR, R.; BROCKLEHURST, T. F. High pressure in combination with elevated temperature as a method for the sterilisation of food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 6, p. 289–299, 2008.
- WRIGHT, C. A.; BRUHN, C. M.; HEYMANN, H.; BAMFORTH, C. W. Beer and wine consumers' perceptions of the nutritional value of alcoholic and nonalcoholic beverages. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 1, 2008.
- YOSHIMOTO, Y.; TASHIRO, J.; TAKENOUCI, T.; TAKEDA, Y. Molecular Structure and Some Physicochemical Properties of High-Amylose Barley Starches. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 3, p. 279–285, 2000.