

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

Aaron Horowitz
Bruno Cardoso Real Martins



**MAPEAMENTO CIENTÍFICO DA APLICAÇÃO DE
PROTEASES NA PRODUÇÃO DE CERVEJA**

RIO DE JANEIRO
2025

Aaron Horowitz

Bruno Cardoso Real Martins

MAPEAMENTO CIENTÍFICO DA APLICAÇÃO DE PROTEASES NA PRODUÇÃO DE CERVEJA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Orientador(es): Priscilla Filomena Fonseca Amaral
Adejanildo Pereira
Luciana Moura

Rio de Janeiro

2025

CIP - Catalogação na Publicação

H796m Horowitz, Aaron., Martins, Bruno Cardoso Real.
MAPEAMENTO CIENTÍFICO DA APLICAÇÃO DE PROTEASES
NA PRODUÇÃO DE CERVEJA / Martins, Bruno Cardoso
Real. Horowitz, Aaron.. -- Rio de Janeiro, 2025.
82 f.

Orientadora: Priscilla Filomena Fonseca Amaral.
Coorientador: Moura, Luciana Silva de Mattos.
Pereira, Adejanildo da Silva..
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de
Química, Bacharel em Engenharia de Bioprocessos,
2025.

1. Proteases. 2. Cerveja. 3. Indústria
cervejeira. I. Amaral, Priscilla Filomena Fonseca,
orient. II. Pereira, Adejanildo da Silva., Moura,
Luciana Silva de Mattos., coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Aaron Horowitz

Bruno Cardoso Real Martins

MAPEAMENTO CIENTÍFICO DA APLICAÇÃO DE PROTEASES NA PRODUÇÃO DE
CERVEJA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Química da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Engenheiro de
Bioprocessos.

Aprovado em _____ de _____ de 2025.

Priscilla Filomena Fonseca Amaral Sécca, DSc., DEB/EQ/UFRJ

Luciana Silva de Mattos Moura, MSc., IQ/UFRJ

Adejanildo da Silva Pereira, DSc., IQ/UFRJ

Daniel Tinôco Campos Neto, D.Sc., DEB/EQ/UFRJ

Tamires Carvalho dos Santos, DSc., EPQB/EQ/UFRJ

Rio de Janeiro
2025

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão à professora Priscilla por ter aceitado ser nossa orientadora. Sua disponibilidade, paciência e orientações foram essenciais ao longo dessa jornada. Agradeço também ao Deja e à Lu, que contribuíram de forma valiosa e constante durante todo o processo de construção deste trabalho — sem vocês, nada disso teria sido possível.

Um agradecimento muito especial ao meu amigo Aaron, que esteve presente em todos os momentos em que precisei. Sua parceria, apoio e dedicação fizeram toda a diferença; não poderia ter escolhido alguém melhor para dividir essa trilha. À Jujuba, por sempre me acolher com seu sorriso nos dias bons e ruins, trazendo conforto e leveza nos momentos em que eu mais precisava.

Sou imensamente grato aos meus amigos queridos, que conseguiram transformar cada desafio — até mesmo depois de uma prova de cálculo — em motivo de riso. Vocês tornaram a faculdade mais leve, divertida e inesquecível. Um carinho especial para a casa do Tigo — cujo verdadeiro nome só a gente conhece — que tornava a ida para o Fundão muito mais divertida, vou sentir saudade dos encontros no BG.

E, por fim, agradeço profundamente aos meus pais e ao meu irmão e a Calu. Sem o sacrifício, o apoio e o amor incondicional de vocês, eu não teria chegado até aqui. Do fundo do meu coração, muito obrigado por tudo.

*Melhor eu ir
Tudo bem, vai ser melhor só.*

RESUMO

HOROWITZ, Aaron; MARTINS, Bruno C. R.. **Mapeamento científico da aplicação de proteases na produção de cerveja.** Rio de Janeiro, 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

O presente trabalho teve como objetivo mapear a produção acadêmica sobre a aplicação de proteases em processos cervejeiros, com ênfase na análise bibliométrica e sistemática de artigos científicos classificados por meio da metodologia *Methodi Ordinatio*. As proteases, enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas, são essenciais em diversas etapas do processo cervejeiro, como maltagem, mosturação, fermentação e estabilização final. A busca sistemática resultou em 423 artigos, dos quais 82 atenderam aos critérios de inclusão e foram classificados segundo o índice *InOrdinatio*. Considerando o fator de impacto dos periódicos, o número de citações e o ano de publicação dos artigos, identificou-se os artigos mais relevantes no assunto, com os dez primeiros apresentando mais de 55,9 citações em média, publicados em revistas com FI médio de 3,76. Das proteases identificadas nos artigos analisados, a maioria corresponde a endopeptidases (68,7%) e é de origem comercial (58,5%), predominantemente produzidas por microrganismos do gênero *Aspergillus* e *Bacillus*. Cerca de 37% das enzimas aplicadas foram de origem endógena da cevada ou produzida por leveduras. Entre as enzimas mais estudadas destacam-se: papaína (com 18 ocorrências), tripsina (com 12 ocorrências) e prolil endopeptidase, PEP, (com 11 ocorrências), cada uma com papéis estratégicos no controle de turbidez, degradação de proteínas do glúten e modulação da estabilidade da espuma. A análise também indicou uma maior concentração de estudos provenientes do Reino Unido (15 artigos publicados), seguidos pela China e Estados Unidos (9 artigos cada), e Alemanha e Dinamarca (8 artigos cada), no período selecionado, revelando uma distribuição geográfica coerente com os principais mercados e centros de pesquisa cervejeira. A revisão aponta ainda para tendências de inovação, como o uso de proteases para a produção de cervejas sem glúten, aplicação de ferramentas proteômicas para caracterização enzimática e o aumento da utilização de enzimas recombinantes de alta pureza em processos industriais. Dessa forma, conclui-se que as proteases representam ferramentas biotecnológicas promissoras e indispensáveis para o avanço, a diversificação e a competitividade da indústria cervejeira contemporânea.

Palavras-chave: proteases; cerveja; indústria cervejeira.

ABSTRACT

HOROWITZ, Aaron; MARTINS, Bruno C. R.. **Mapeamento científico da aplicação de proteases na produção de cerveja.** Rio de Janeiro, 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

This study aimed to map the academic production regarding the application of proteases in brewing processes, with an emphasis on bibliometric and systematic analysis of scientific articles classified using the *Methodi Ordinatio* methodology. Proteases, enzymes that catalyze protein hydrolysis, play essential roles in various stages of the brewing process, such as malting, mashing, fermentation, and final stabilization. The systematic search yielded 423 articles, of which 82 met the inclusion criteria and were ranked according to the InOrdinatio index. Considering journal impact factor, number of citations, and publication year, the most relevant articles were identified, with the top ten averaging over 55.9 citations and being published in journals with an average impact factor of 3.76. Among the proteases identified, most were endopeptidases (68.7%) and of commercial origin (58.5%), predominantly produced by microorganisms of the *Aspergillus* and *Bacillus* genera. About 37% of the enzymes used were endogenous to barley or produced by yeasts. The most frequently studied enzymes included papain (18 occurrences), trypsin (12 occurrences), and prolyl endopeptidase, PEP, (11 occurrences), each playing strategic roles in turbidity control, gluten protein degradation, and foam stability modulation. The analysis also indicated a higher concentration of studies from the United Kingdom (15 articles), followed by China and the United States (9 articles each), and Germany and Denmark (8 articles each), reflecting a geographical distribution consistent with major beer markets and research hubs. The review also highlights emerging innovation trends, such as the use of proteases for gluten-free beer production, application of proteomic tools for enzymatic characterization, and increasing use of high-purity recombinant enzymes in industrial processes. Thus, proteases are concluded to be promising and essential biotechnological tools for the advancement, diversification, and competitiveness of the contemporary brewing industry.

Keywords: proteases; beer; brewing industry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma esquemático das etapas de produção da cerveja, com indicação das etapas em que as proteases podem atuar.

Figura 2 – Rampas de temperatura para ação enzimática durante o processo de mosturação da produção de cerveja com a etapa proteolítica.

Figura 3 – Rampas de temperatura para ação enzimática durante o processo de mosturação da produção de cerveja sem a etapa proteolítica.

Figura 4 – Consumo de cerveja por país (BL).

Figura 5 – Consumo de cerveja por país per capita (em L/capita).

Figura 6 – Reserva de lucro por produto de bens embalados.

Figura 7 – Market share da indústria de cerveja.

Figura 8 – Fluxograma esquemático das etapas do método InOrdinatio.

Figura 9 – País de publicação dos artigos selecionados na base SCOPUS sobre o uso de proteases na produção de cerveja.

Figura 10 – Revistas científicas associadas à base SCOPUS com mais de um artigo publicado sobre o uso de proteases em processos de produção de cerveja.

Figura 11 – Ano de publicação dos artigos selecionados na base SCOPUS sobre uso de proteases na produção de cerveja.

Figura 12 – Percentual relativo às proteases classificadas quanto ao local de ação da enzima na cadeia polipeptídica identificadas nos artigos selecionados na base SCOPUS sobre uso na produção de cerveja

Figura 13 – Quantidade de artigos que utilizam as diferentes endopeptidases dentre os selecionados na base SCOPUS sobre uso na produção de cerveja

Figura 14 – Percentual de artigos que utilizaram os diferentes métodos utilizados para obtenção das proteases utilizadas nos artigos selecionados na base SCOPUS sobre uso na produção de cerveja.

Figura 15 – Percentual de artigos que aplicaram as proteases nas diferentes fases do processo de fabricação da cerveja nos estudos selecionados na base SCOPUS.

Figura 16 – Motivação para estudo de proteases na indústria da cerveja por artigos selecionados na base SCOPUS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de proteases

Tabela 2 – Top 10 artigos científicos na base SCOPUS sobre utilização de proteases na indústria da cerveja segundo o método do InOrdinatio

Tabela A – Artigos científicos na base SCOPUS sobre utilização de proteases na indústria cervejeira classificados de acordo com o método InOrdinatio

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- FAN - Nitrogênio Livre Disponível
- MMP - Metaloproteinases da Matriz
- SUMO - *small ubiquitin-related modifier*
- TEV - *Tobacco Etch Virus* protease
- GST - Glutathione S-Transferase
- CAGR - Taxa de Crescimento Anual Composta
- EBITDA - Lucros antes de juros, impostos, depreciação e amortização
- MSCRI - *The Management System of the Central Research Institute*
- ProKnow-C - *Process of Knowledge Development - Constructivist*
- MCDA - *Multiple Criteria Decision Aiding*
- PEP - Prolil Endopeptidase
- AN-PEP - Prolil Endopeptidase produzida por *Aspergillus niger*
- GRAS - *Generally Recognized as Safe*
- EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
- FDA - *Food and Drug Administration*

LISTA DE SÍMBOLOS

α Constante do índice *InOrdinatio*

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| SUMÁRIO | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 OBJETIVOS GERAIS | 17 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 18 |
| 3.1 PROTEASES | 18 |
| 3.1.1 CLASSIFICAÇÕES | 18 |
| 3.1.2 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS | 19 |
| 3.1.3 ASPECTOS MERCADOLÓGICOS DA PROTEASE | 23 |
| 3.2 CERVEJA | 24 |
| 3.2.1 PROCESSO DE FABRICAÇÃO | 25 |
| 3.2.2 CONSUMO MUNDIAL DE CERVEJA | 29 |
| 3.2.3 ASPECTOS MERCADOLÓGICOS DA CERVEJA | 31 |
| 3.3 ANÁLISE SISTEMÁTICA DE ARTIGOS | 35 |
| 4 METODOLOGIA | 38 |
| 4.1 BUSCA SISTEMÁTICA NA LITERATURA | 38 |
| 4.1.1 DEFINIÇÃO DA INTENÇÃO DE PESQUISA | 38 |
| 4.1.2 BUSCA EXPLORATÓRIA PRELIMINAR | 39 |
| 4.1.3 DEFINIÇÃO DAS PALAVRAS-CHAVE E DAS BASES DE DADOS | 39 |
| 4.1.4 REALIZAÇÃO DA BUSCA FINAL | 39 |
| 4.1.5 PROCEDIMENTOS DE FILTRAGEM | 39 |
| 4.1.6 COLETA DE DADOS BIBLIOMÉTRICOS | 40 |
| 4.1.7 CÁLCULO DO ÍNDICE INORDINATIO | 40 |
| 4.1.8 OBTENÇÃO DOS ARTIGOS COMPLETOS | 40 |
| 4.1.9 LEITURA E ANÁLISE SISTEMÁTICA DOS ARTIGOS | 40 |
| 4.1.10 ANÁLISE DOS DADOS | 40 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSÃO | 41 |
| 5.1 PORTFÓLIO SELECIONADO | 41 |
| 5.2 PAÍSES | 41 |
| 5.3 REVISTAS | 43 |
| 5.4 ANO DE PUBLICAÇÃO | 44 |
| 5.5 CLASSIFICAÇÃO DOS ARTIGOS SEGUNDO O METHODI ORDINATIO | 45 |
| 5.6 TENDÊNCIAS IDENTIFICADAS NOS ARTIGOS | 51 |
| 6 CONCLUSÕES | 65 |
| 7 REFERÊNCIAS | 67 |
| APÊNDICE A – Classificação InOrdinatio | 76 |

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida consumida há mais de 8.000 anos, tendo como principais ingredientes cereais maltados, água, lúpulo e leveduras (ANDERSON, 2017). Trata-se de uma das bebidas alcoólicas mais antigas da humanidade, com evidências arqueológicas apontando para sua produção na antiga Mesopotâmia, e sua relevância permanece até os dias atuais. No Brasil, a cerveja possui expressiva importância econômica, com 1.847 estabelecimentos registrados e mais de 40 mil empregos diretos gerados pela cadeia produtiva (MAPA, 2024). O país ocupa o terceiro lugar no ranking mundial de consumo total de cerveja e a 21^a posição em consumo per capita (KIRIN, 2024). Além disso, abriga o grupo controlador da AB InBev, maior cervejaria do mundo, que detém mais de 33% do capital votante da companhia (AB InBev, 2025). Entre as enzimas amplamente empregadas na produção estão as amilases, betaglucanases e, especialmente, as proteases, dentre elas destacam-se as papaínas, tripsinas e prolyl endopeptidases.

As proteases são enzimas essenciais na indústria cervejeira, desempenhando papéis multifuncionais durante a maltagem, mosturação, fermentação e até nas etapas finais da produção. Sua principal função é catalisar a hidrólise de proteínas em peptídeos menores e aminoácidos livres, influenciando diretamente a composição do mosto, o desempenho da fermentação, a claridade da cerveja e a estabilidade do sabor (LEI et al., 2013; MATTER, 2023).

Durante a maltagem e a mosturação, as proteases endógenas da cevada — principalmente do tipo cisteína e serina — hidrolisam parcialmente proteínas de reserva, liberando compostos nitrogenados essenciais à nutrição das leveduras (JONES e MARINAC, 2001; NÁJERA-TORRES et al., 2022; JONES, 2005). O grau de proteólise pode ser ajustado por rampas de temperatura específicas, otimizando a liberação de nitrogênio assimilável (FAN) e favorecendo a eficiência fermentativa e o desenvolvimento de sabores (LEI et al., 2013; LIN et al., 2022; MURMANN et al., 2015).

A atividade proteolítica também contribui para atributos de qualidade como estabilidade da espuma e prevenção de turbidez. Proteínas espumígenas favorecem a formação e retenção do colarinho, mas podem ser degradadas por proteólise excessiva, exigindo controle rigoroso da atividade enzimática (LUND et al., 2014; ORMROND et al., 1991; EVANS e HEJGAARD, 1999). Ao mesmo tempo, as proteases auxiliam na quebra de proteínas que causam turbidez por interação com polifenóis, melhorando a estabilidade coloidal (ORMROND et al., 1991; EVANS, 2005).

Na produção moderna, proteases exógenas de *Bacillus*, *Aspergillus* e outros microrganismos são frequentemente adicionadas para suplementar ou substituir enzimas do malte, sobretudo em mostos com alto teor de adjuntos (PHAM et al., 2024; ALVES et al., 2024). Em processos de alta densidade (*high-gravity brewing*), a suplementação com proteases aumenta o nível de FAN, acelera a fermentação, eleva o rendimento alcoólico e estimula a formação de compostos de sabor e aroma (LEI et al., 2013; PIDDOCKE et al., 2011; LIN et al., 2022).

Além disso, as proteases têm sido aplicadas em inovações como a redução do teor de glúten, degradando fragmentos de hordeína ricos em prolina — proteínas naturalmente resistentes à proteólise convencional (BENUCCI et al., 2020). Enzimas de *Aspergillus tamarii*, por exemplo, destacam-se por sua estabilidade em ampla faixa de temperatura e pH, ampliando seu uso em diferentes condições (ALVES et al., 2024; PHAM et al., 2024).

Outro benefício relevante envolve a promoção do potencial antioxidante da cerveja, por meio da liberação de peptídeos contendo grupos tióis durante a mosturação, o que contribui para maior estabilidade de sabor e vida útil do produto (LUND et al., 2014; MURMANN et al., 2015). Esses avanços se integram a abordagens proteômicas e metabolômicas que investigam as complexas relações entre a proteólise, o metabolismo de aminoácidos, a fermentação e os atributos sensoriais da bebida (LIN et al., 2022; BERGER et al., 2015).

Dessa forma, as proteases se consolidam como ferramentas indispensáveis tanto na cervejaria artesanal quanto industrial, permitindo adaptar processos às variações de matérias-primas, desenvolver novos estilos de cerveja e produzir bebidas de alta qualidade, estáveis e alinhadas às demandas de mercado.

Diante da crescente quantidade de informações disponíveis na literatura científica, torna-se essencial o uso de métodos sistemáticos para identificar, organizar e analisar os estudos mais relevantes sobre um determinado tema. O mapeamento tecnológico de artigos científicos surge, nesse contexto, como ferramenta estratégica para revelar tendências, lacunas de conhecimento e oportunidades de inovação tecnológica. Essa abordagem permite uma visão estruturada sobre os avanços em áreas como a biotecnologia aplicada à cervejaria.

Entre os métodos disponíveis, destaca-se o Methodi Ordinatio, adotado neste trabalho, que combina critérios quantitativos (número de citações e fator de impacto) e qualitativos (análise de conteúdo) para ranquear os estudos mais relevantes. Isso fornece uma base sólida para a construção do estado da arte e garante rigor, transparência e reproduzibilidade à seleção dos artigos (PAGANI et al., 2015; CARVALHO et al., 2020).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo mapear tecnologias de produção de cerveja com utilização de proteases, por meio da análise de artigos indexados na base de dados SCOPUS®, utilizando o Methodi Ordinatio como ferramenta de seleção e priorização de estudos.

2 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo realizar mapeamento de artigos científicos publicados em revistas internacionais da base SCOPUS® que reportam a aplicação de proteases em processos de produção de cerveja e inovações acerca do tema.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar estudos e inovações tecnológicas relacionadas à aplicação de proteases na produção de cerveja, presentes na literatura acadêmica;
- Identificar países, instituições e autores responsáveis pelas pesquisas relacionadas à aplicação de proteases em processo de produção de cerveja;
- Identificar os principais tipos de proteases e desafios da utilização dessas enzimas no processo cervejeiro.
- Verificar tendências tecnológicas das pesquisas relacionadas à utilização de proteases na indústria cervejeira.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PROTEASES

As proteases, também conhecidas como peptidases ou enzimas proteolíticas, são biomoléculas especializadas na quebra das ligações peptídicas que mantêm os aminoácidos unidos em uma cadeia proteica. Por meio desse processo, denominado proteólise, essas enzimas fragmentam proteínas complexas em peptídeos menores ou em aminoácidos livres. Essa atividade é fundamental para diversos mecanismos biológicos, como a digestão dos alimentos, a ativação da cascata de coagulação sanguínea, a modificação e maturação de hormônios, a regulação da resposta imune e a eliminação de proteínas defeituosas ou danificadas (MATTER, 2023).

Para além do ambiente biológico, as proteases também exercem papel central em diversos setores industriais. Elas são amplamente utilizadas na formulação de detergentes enzimáticos, no processamento de couro e tecidos, na produção farmacêutica e, especialmente, nas indústrias de alimentos e bebidas, onde contribuem para a modificação de texturas, a liberação de sabores e a otimização de processos fermentativos (MATTER, 2023).

3.1.1 CLASSIFICAÇÕES

As proteases podem ser classificadas de diversas formas. Uma das formas da classificação é quanto ao pH de maior atividade enzimática, em que são classificadas como proteases alcalinas (pH 8,0 a 13,0), neutras (pH 6,0 a 8,0) ou ácidas (pH 2,0 a 6,0) (MATTER, 2023).

Podem também ser classificadas quanto à sua ação na posição da molécula de proteína: quando atuam nas ligações terminais de C e N, são classificadas como exoproteases ou exopeptidases, e quando atuam em regiões internas da cadeia polipeptídica, são classificadas como endoproteases. As exopeptidases podem ser posteriormente caracterizadas em amino proteases (que atuam no terminal livre de N), liberando um único resíduo de aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo, ou carboxiproteases (que atuam nos terminais C do peptídeo), liberando um único aminoácido ou um dipeptídeo (SOUZA, 2015).

Outra classificação é em relação à natureza dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo destas enzimas, sendo as principais classes: proteases serínicas, proteases cisteínicas, proteases aspárticas e metaloproteases (SOUZA, 2015).

As proteases serínicas são caracterizadas pela presença de um grupo serina no sítio ativo, são geralmente ativas em pH neutro a alcalino (entre 7 - 11) e possuem baixa massa molar. Um exemplo notório seria a tripsina. As proteases cisteínicas são caracterizadas pela ação de dois aminoácidos presentes no seu sítio ativo, de forma concomitante: cisteína e histidina. Normalmente são ativas somente na presença de agentes redutores, como HCN. A protease mais conhecida do grupo é a papaína. As proteases aspárticas são endopeptidases que dependem de resíduos de ácido aspártico para atividade catalítica, e por isso atuam em pH ácido. Um exemplo seria a pepsina. Por fim, existem as metaloproteases que são o grupo mais diverso dentre os descritos. Essas enzimas são caracterizadas pela necessidade de um íon metálico divalente para realizar a catálise, que no caso das MMPs (metaloproteinases da matriz) o mais usual é a presença do metal zinco (SOUZA, 2015).

As principais fontes de proteases são os animais, as plantas e os microrganismos. No entanto, o uso de fontes de origem animal e vegetal apresenta diversas limitações, como questões éticas relacionadas ao bem-estar animal e à exploração de recursos naturais, além de impactos ambientais associados à extração. Além disso, esses processos geralmente apresentam baixa produtividade, o que limita sua viabilidade em larga escala (SONG, 2023).

A Tabela 1 a seguir apresenta uma síntese das classificações de proteases.

Tabela 1 - Classificação de proteases

| Tipo de Classificação | Classificação | Definição |
|--------------------------------|----------------------|--|
| Quanto ao local de ação | Endopeptidases | Atuam no interior da cadeia polipeptídica. |
| | Exopeptidases | Atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica. |
| Quanto ao pH ótimo de ação | Proteases ácidas | Atuam melhor em meio ácido (baixo pH). |
| | Proteases neutras | Atuam melhor em pH neutro (em torno de 7). |
| | Proteases alcalinas | Atuam melhor em meio alcalino (pH básico). |
| Quanto ao mecanismo catalítico | Serínicas | Possuem um resíduo de serina no sítio ativo. |
| | Cisteínicas | Utilizam uma cisteína catalítica para quebrar a ligação peptídica. |
| | Aspárticas | Utilizam resíduos de ácido aspártico no sítio ativo. |

| | |
|-----------------|---|
| Metaloproteases | Dependem de um íon metálico para ativar uma molécula de água que cliva a ligação peptídica. |
|-----------------|---|

Fontes: elaboração própria com base em: Matter (2023) e Souza (2015).

3.1.2 APLICAÇÕES INDUSTRIAS

As proteases têm despertado crescente interesse por parte da indústria devido à sua ampla gama de aplicações. Esses biocatalisadores estão presentes em diversos setores, sendo notadamente empregados nas indústrias de detergentes, couro, gerenciamento de resíduos sólidos, alimentos, farmacêutica e cervejeira (MATTER, 2023).

No setor de detergentes, a introdução de proteases remonta à década de 1990. Desde então, sua utilização tem se consolidado como uma estratégia eficaz na formulação de produtos de limpeza, especialmente por sua capacidade de remover resíduos de origem biológica, como sangue, suor e restos de alimentos, que contêm proteínas em sua composição. Essa atuação direta sobre a matéria orgânica promove um aumento substancial na eficiência dos detergentes, melhorando sua qualidade e ampliando sua eficácia em diversas condições de lavagem (MATTER, 2023).

Para aplicação na indústria de detergentes, geralmente são utilizadas proteases alcalinas de origem microbiana, sendo benéficas mesmo em pequenas quantidades (0,4 a 0,8%). Além disso, também exibem estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura, garantindo um tempo de prateleira alta. Por fim, o uso dessas proteases ainda possui a vantagem de ser ambientalmente amigável (SONG, 2023).

Na indústria do couro, as proteases desempenham um papel fundamental no processamento das peles. Utiliza-se proteases alcalinas provenientes de *Aspergillus*, *Streptomyces* e *Bacillus*. Sua principal função é a remoção seletiva de tecidos não colagênicos, ou seja, estruturas que não contêm colágeno, o que resulta em um material final com maior resistência mecânica e textura mais macia. Esse processo enzimático é considerado uma alternativa mais sustentável e menos agressiva em comparação com métodos químicos tradicionais, já que os métodos químicos fazem uso de produtos agressivos que geram problemas de descarte (MATTER, 2023; SONG, 2023).

Em relação ao setor de gerenciamento de resíduos sólidos, as proteases são empregadas no tratamento de resíduos orgânicos, promovendo a sua degradação em moléculas menores.

Essas moléculas podem, então, ser metabolizadas por outros organismos presentes no ambiente, facilitando o processo de biorremediação e contribuindo para uma destinação mais eficiente e ecológica dos resíduos urbanos e industriais (MATTER, 2023).

No âmbito da indústria alimentícia, as aplicações das proteases são igualmente diversas e relevantes, tratando-se do segmento com 55% do total de enzimas industriais utilizadas. Um dos usos mais comuns é no amaciamento de carnes, por meio da hidrólise das proteínas musculares, tornando o produto mais palatável ao consumidor. Além disso, essas enzimas são utilizadas na coagulação de proteínas do leite para a fabricação de queijos, no processamento de massas para modificação do glúten, e em outras etapas industriais que requerem transformações específicas das proteínas alimentares para melhorar textura, sabor ou digestibilidade (MATTER, 2023; OKPARA, 2022).

A indústria farmacêutica também se beneficia amplamente das propriedades das proteases. Um exemplo é seu uso em soluções para limpeza de lentes de contato, promovendo a remoção de depósitos proteicos derivados das lágrimas, garantindo maior conforto e higiene aos usuários. Além disso, essas enzimas estão presentes em formulações terapêuticas voltadas para o tratamento de diversas patologias, como o câncer, infecções bacterianas, doenças inflamatórias crônicas e tromboses. Nesses contextos, as proteases podem atuar dissolvendo coágulos sanguíneos, promovendo ação antibacteriana, identificando deficiências enzimáticas específicas e até mesmo auxiliando na preparação de curativos e dispositivos médicos com propriedades bioativas (MATTER, 2023).

Aplicações mais recentes na área de biotecnologia têm se tornado mais comuns com proteases sendo amplamente utilizadas na modificação, processamento e purificação de proteínas recombinantes. A protease SUMO (do inglês, *small ubiquitin-related modifier*, ou modificador pequeno semelhante à ubiquitina), por exemplo, é essencial para a remoção do peptídeo SUMO de proteínas de fusão, promovendo maior solubilidade e estabilidade durante a expressão em sistemas heterólogos. Já a protease Kex2, derivada de levedura, destaca-se pela sua especificidade na clivagem de ligações peptídicas entre aminoácidos básicos, sendo amplamente empregada na maturação de peptídeos secretados em sistemas de expressão em leveduras. A protease TEV (Tobacco Etch Virus protease) é uma enzima com alta especificidade utilizada para clivar regiões específicas de proteínas, sendo especialmente empregada para remover etiquetas de fusão após a purificação. Entre essas etiquetas, destaca-se a GST (Glutathione S-Transferase), que serve como tag de afinidade para purificação em

colunas de glutationa, e a His-tag (His₆, ou poli-histidina), amplamente usada em processos de purificação por afinidade com colunas contendo íons metálicos como níquel (Ni^{2+}) ou cobalto (Co^{2+}). Essas estratégias facilitam o isolamento e posterior manipulação de proteínas recombinantes em protocolos de biotecnologia e biologia molecular. (SONG, 2023).

Outras proteases de destaque incluem a Proteinase K, aplicada em protocolos de extração de DNA e remoção de contaminantes proteicos em experimentos de biologia molecular e celular, e a tripsina recombinante, que atua na clivagem de proteínas em resíduos de lisina e arginina. Esta última possui ampla aplicação em processos como dissociação celular para cultivo, degradação de proteínas desnaturadas e preparação de amostras para sequenciamento. Em contextos mais avançados, como terapias celulares e com células-tronco, a tripsina também se mostra indispensável. Assim, o uso estratégico de diferentes proteases permite maior controle e eficiência nas etapas de produção, modificação e purificação de biomoléculas, consolidando seu papel central na biotecnologia moderna (SONG, 2023).

Dessa forma, observa-se que as proteases constituem ferramentas biotecnológicas de grande versatilidade e valor agregado, contribuindo para a inovação e sustentabilidade de diferentes cadeias produtivas. Seu estudo e aplicação continuam sendo objeto de interesse da pesquisa científica e tecnológica, refletindo seu potencial de transformação em diversos contextos industriais.

As proteases são amplamente utilizadas na indústria cervejeira para aprimorar o processo produtivo e a qualidade da cerveja, principalmente por catalisarem a hidrólise de proteínas em peptídeos e aminoácidos livres. Essa atividade enzimática tem múltiplas aplicações, como o aumento da concentração de nitrogênio livre disponível (FAN) no mosto, essencial para o crescimento saudável das leveduras e o bom desempenho da fermentação — especialmente em cervejas de alta densidade (*high gravity brewing*), nas quais o uso de adjuntos pode diluir o conteúdo natural de nitrogênio do mosto (PIDDOCKE et al., 2011; LEI & ZHAO et al., 2013).

Durante a etapa de maltagem, as proteases endógenas do malte são ativadas, contribuindo para a clarificação do mosto e o aumento do valor nutricional da cerveja (MATTER, 2023). Na mosturação ou durante a fermentação, a suplementação com proteases comerciais, como as derivadas de *Aspergillus oryzae* (Flavorzyme) ou espécies de *Bacillus* (Neutralse, Protamex), aumenta o nitrogênio assimilável pelas leveduras. Isso resulta em

fermentações mais rápidas e completas, maior rendimento alcoólico e perfis aprimorados de sabor e aroma, devido à maior disponibilidade de precursores para a formação de álcoois superiores e ésteres (PIDDOCKE et al., 2011; LUND et al., 2015).

As proteases também atuam na clarificação da bebida ao degradar proteínas formadoras de turbidez que interagem com polifenóis e causam o fenômeno conhecido como "*chill haze*" (turbidez a frio). Além disso, promovem a estabilidade do sabor por meio do aumento da concentração de peptídeos contendo tióis, que funcionam como antioxidantes (LEI & ZHAO et al., 2013).

Proteases especializadas, como as endopeptidases específicas para prolina, têm sido utilizadas para reduzir o teor de glúten em cervejas com baixo teor ou sem glúten, e para melhorar a estabilidade coloidal, prolongando a vida útil do produto (LUND et al., 2015). No entanto, é fundamental controlar cuidadosamente a distribuição de proteínas na matriz da bebida: uma distribuição excessivamente homogênea pode prejudicar características sensoriais desejadas, como a formação e a estabilidade da espuma, enquanto uma distribuição inadequada pode dificultar processos como a filtração (MATTER, 2023).

Dessa forma, a escolha adequada das enzimas, suas dosagens e o momento de aplicação são ajustados conforme os resultados desejados, o estilo da cerveja e a composição das matérias-primas. Isso torna a suplementação com proteases uma ferramenta versátil e essencial para os cervejeiros modernos que buscam otimizar a eficiência do processo e a qualidade do produto (LUND et al., 2015; MATTER, 2023).

3.1.3 ASPECTOS MERCADOLÓGICOS DA PROTEASE

O mercado de proteases é estimado em \$3,73 bilhões de dólares em 2025, com expectativa de alcançar \$5,02 bilhões de dólares em 2030, um CAGR (Taxa de Crescimento Anual Composta, sigla em inglês) de 6,1% no período. Hoje, as proteases constituem cerca de 60% do mercado de enzimas e 40% do volume de enzimas no mundo (MORDOR INTELLIGENCE, 2024). O mercado é consolidado e concentrado em cinco grandes empresas: *International Flavors & Fragrances Inc*, BASF SE, DSM-Firmenich AG, Novonesis Group e Associated British Foods PLC (MORDOR INTELLIGENCE, 2024).

O maior mercado para proteases é os Estados Unidos, que lideram o consumo devido à sua indústria de alimentos e bebidas altamente desenvolvida e ao crescimento expressivo no uso de enzimas pelo setor farmacêutico. Por outro lado, o mercado com maior potencial de

expansão é o asiático, impulsionado pela rápida industrialização e pelo aumento da demanda por alimentos processados, especialmente em países populosos como China, Índia e Japão, que vêm investindo fortemente em biotecnologia para o desenvolvimento de soluções enzimáticas inovadoras. No Brasil, a extensa base agrícola e pecuária oferece oportunidades promissoras para aplicações industriais de proteases, sobretudo no processamento de alimentos, couro, rações e bebidas. O país conta com empresas relevantes no setor, como a Prozyn®, líder nacional no desenvolvimento e fornecimento de enzimas industriais para a indústria alimentícia, incluindo o setor cervejeiro (MORDOR INTELLIGENCE, 2024; RESEARCH AND MARKETS, 2021; PROZYN, 2024).

Esse mercado tem sido transformado através da necessidade de soluções naturais e *eco-friendly*, com produtores desenvolvendo enzimas não-tóxicas e biodegradáveis, enquanto se mantém com alta eficácia. A capacidade de oferecer soluções que diminuam resíduos e tenham alta produtividade são fatores para sua aplicação em indústrias que variam de biocombustíveis a processamento de couro (MORDOR INTELLIGENCE, 2024).

A indústria de alimentos e bebidas é importante para o crescimento da demanda por proteases, com a ascensão de produtos processados e de conveniência que mantenham a qualidade do produto, particularmente na melhora da vida útil. Dessa forma, a indústria de alimentos e bebidas representou 47% do *market share* de proteases em 2024 (MORDOR INTELLIGENCE, 2024).

Do ponto de vista da oferta, o mercado tem preferido soluções derivadas de origem microbiana, já que oferecem vantagens de eficiência produtiva e efetividade de custos. Isso se deve à necessidade de tempo de cultivo menor e rápida produção. Dessa forma, a protease de origem microbiana já era aproximadamente 45% do *market share* em 2024, com o restante dividido entre origem animal e vegetal (MORDOR INTELLIGENCE, 2024).

3.2 CERVEJA

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais antigas e amplamente consumidas da história da humanidade. Evidências arqueológicas sugerem que a produção de cerveja remonta à antiga Mesopotâmia, com registros detalhados encontrados em tábua de argila sumérias datadas de cerca de 3000 a.C. Esses registros descrevem um processo rudimentar de fabricação de “pão de cerveja”, que envolvia a mistura e o cozimento de farinha de cevada com água, seguida pela fermentação da mistura resultante. A prática se espalhou para os babilônios, que por vezes aromatizavam suas cervejas com ervas como o lúpulo selvagem. Ao longo dos

milênios, os métodos e as receitas da produção de cerveja evoluíram, influenciados por avanços culturais, agrícolas e tecnológicos (IMURE, 2012).

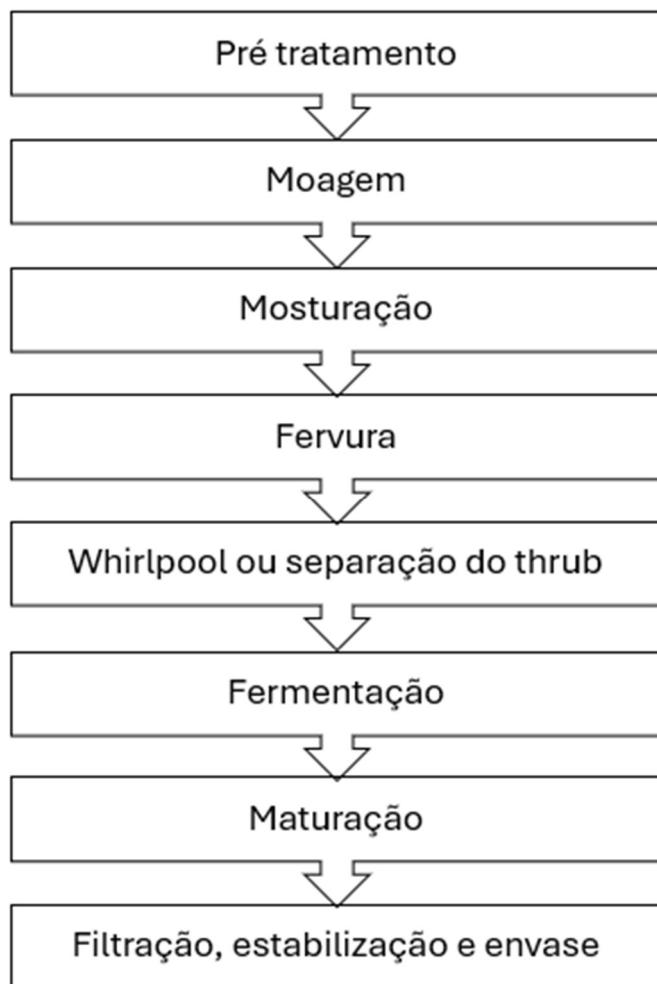
O núcleo do processo de fabricação da cerveja permaneceu consistente: começa com a maltagem dos cereais — principalmente a cevada —, em que os grãos são embebidos em água, deixados para germinar e, em seguida, secos para ativar enzimas responsáveis por converter os amidos em açúcares fermentáveis. Na mosturação, o malte moído é misturado com água em temperaturas controladas, permitindo que as enzimas hidrolisem os carboidratos e proteínas complexas em açúcares simples e aminoácidos necessários ao metabolismo das leveduras. Após a mosturação, o mosto é separado do grão, fervido com lúpulo para sabor e conservação, resfriado e então fermentado com levedura para produzir o álcool e a ampla gama de sabores característicos da cerveja. O produto é maturado, clarificado e envasado (SCHULZ et al., 2018).

A produção moderna de cerveja industrializou esses métodos ancestrais, incorporando conhecimentos científicos de bioquímica, melhoramento genético da cevada e avanços tecnológicos no controle de processos e na garantia da qualidade. Ferramentas como a proteômica e a genômica agora ajudam os cervejeiros a analisarem tanto as matérias-primas quanto os produtos, garantindo consistência e promovendo inovações em sabor e qualidade. Apesar das mudanças e aprimoramentos ao longo do tempo, a cerveja continua enraizada em uma herança milenar que combina tradição, ciência e arte (SCHULZ et al., 2018; IMURE, 2012).

3.2.1 PROCESSO DE FABRICAÇÃO

A produção da cerveja começa com a etapa de maltagem, na qual a cevada ou outros grãos cereais são embebidos em água, germinados e posteriormente secos. Esse processo ativa enzimas essenciais para a hidrólise de amidos e proteínas, influenciando diretamente as características do malte e, por consequência, da cerveja final (KALB et al., 2020; KERR et al., 2019). Em seguida, o malte passa pela moagem, sendo transformado em *grist*, ou seja, em uma farinha grossa que será utilizada na etapa de mosturação. Uma moagem adequada garante uma extração eficiente dos componentes durante a mosturação e uma boa filtração do mosto (SCHULZ et al., 2018). A Figura 1 apresenta um fluxograma esquemático sobre o processo de produção de cerveja.

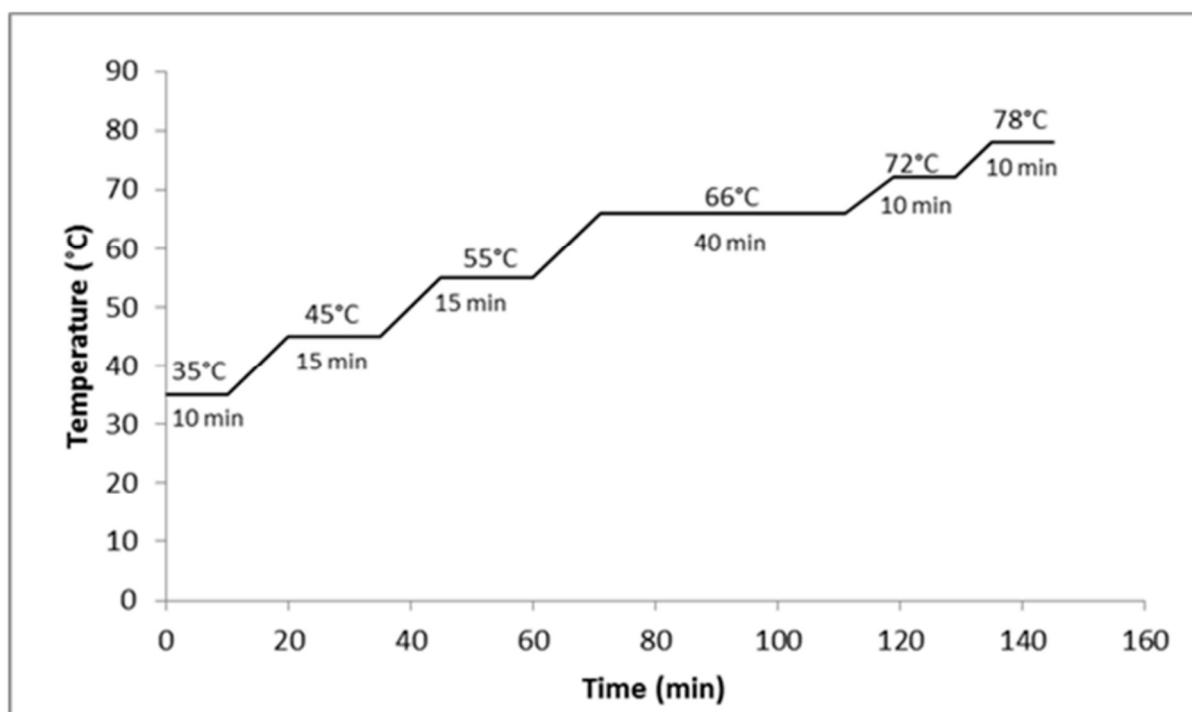
Figura 1 – Fluxograma esquemático das etapas de produção da cerveja, com indicação das etapas em que as proteases podem atuar.



Fontes: elaboração própria com base em: Kalb et al. (2020); Kerr et al. (2019) e Schulz et al. (2018).

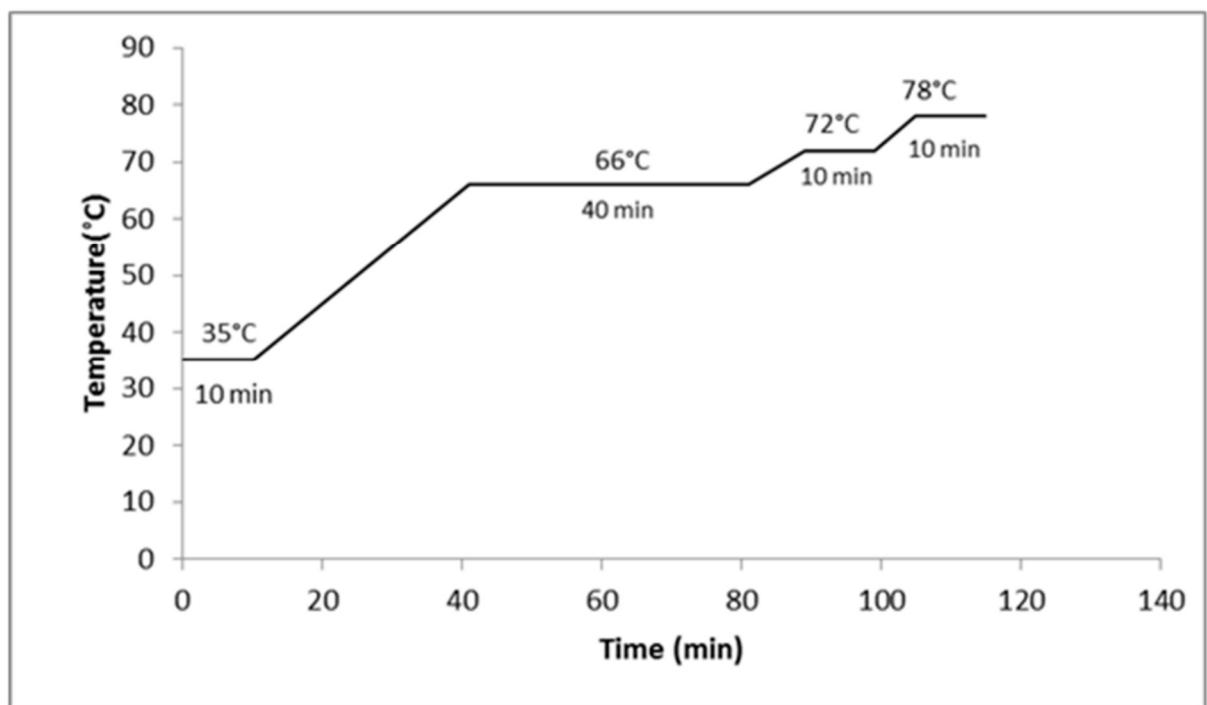
Na mosturação, também chamada de brassagem, o *grist* é misturado com água quente em uma tina de mostura. Nesse momento, enzimas como amilases e proteases convertem os amidos em açúcares fermentáveis e as proteínas em peptídeos e aminoácidos. As rampas de temperatura são escolhidas estrategicamente para otimizar as atividades enzimáticas conforme o perfil desejado para a cerveja ou conforme a composição dos ingredientes, especialmente ao utilizar adjuntos (MATHIAS et al., 2019; LEI & ZHENG et al., 2013; KERR et al., 2019). As rampas de temperatura da brassagem envolvendo ou não etapas proteolíticas são mostradas nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

Figura 2 – Rampas de temperatura para ação enzimática durante o processo de mosturação da produção de cerveja com a etapa proteolítica.



Fontes: retirado da base de dados em: MATHIAS et al. (2019).

Figura 3 – Rampas de temperatura para ação enzimática durante o processo de mosturação da produção de cerveja sem a etapa proteolítica



Fontes: retirado da base de dados em: MATHIAS et al. 2019

Para o perfil de brassagem contendo etapas proteolíticas como na Figura 2, a temperatura é elevada e mantida (repousada) em etapas chave. Cada segmento representa um platô de temperatura controlada (“repouso”) separado por rampas de temperatura (“inclinações”). Esse programa em etapas facilita a atividade enzimática gradual para a degradação de proteínas e amidos durante a mosturação. Comparado ao perfil completo de mosturação, a versão sem a etapa proteolítica elimina os repousos graduais e em etapas na faixa de repouso proteico (45–55 °C), passando quase diretamente do repouso inicial em baixa temperatura para a temperatura de conversão do amido (sacarificação).

Após essa etapa, a mistura é transferida para a tina de clarificação, onde os grãos residuais sólidos são separados do mosto líquido. A lavagem dos grãos, chamada de *sparging*, ajuda a recuperar os açúcares restantes, aumentando o rendimento da extração (SCHULZ et al., 2018).

O mosto é então fervido, geralmente por 60 a 90 minutos, com o objetivo de esterilizar o líquido, inativar enzimas, precipitar proteínas e promover a isomerização dos ácidos do lúpulo (como por exemplo os α e β ácidos), o que confere amargor à bebida. A adição de lúpulo

durante essa etapa também contribui para o sabor e aroma, e diferentes momentos de adição, como no final da fervura ou no *whirlpool* (etapa de centrifugação do mosto quente para separar sólidos), proporcionam perfis aromáticos distintos. (SCHULZ et al., 2018; KERR et al., 2019). Após a fervura, o mosto quente é transferido para o recipiente de *whirlpool*, onde ocorre a separação do *trub* — resíduos de proteínas coaguladas e lúpulo —, resultando em um mosto mais claro, passo fundamental para a estabilidade da cerveja (MATHIAS et al., 2019).

O mosto clarificado é então resfriado rapidamente até a temperatura adequada para a fermentação, o que previne contaminações e favorece a atuação das leveduras. As temperaturas de resfriamento variam conforme o estilo da cerveja, como lagers ou ales (MATHIAS et al., 2019). Com o mosto resfriado, inicia-se a fermentação ao se inocular leveduras, que transformam os açúcares em etanol e CO₂, além de produzirem diversos metabólitos que conferem sabor. Essa etapa é rigorosamente controlada quanto à temperatura, à cepa de levedura e à composição do mosto para alcançar o perfil sensorial desejado (NOGUEIRA et al., 2022; KERR et al., 2019).

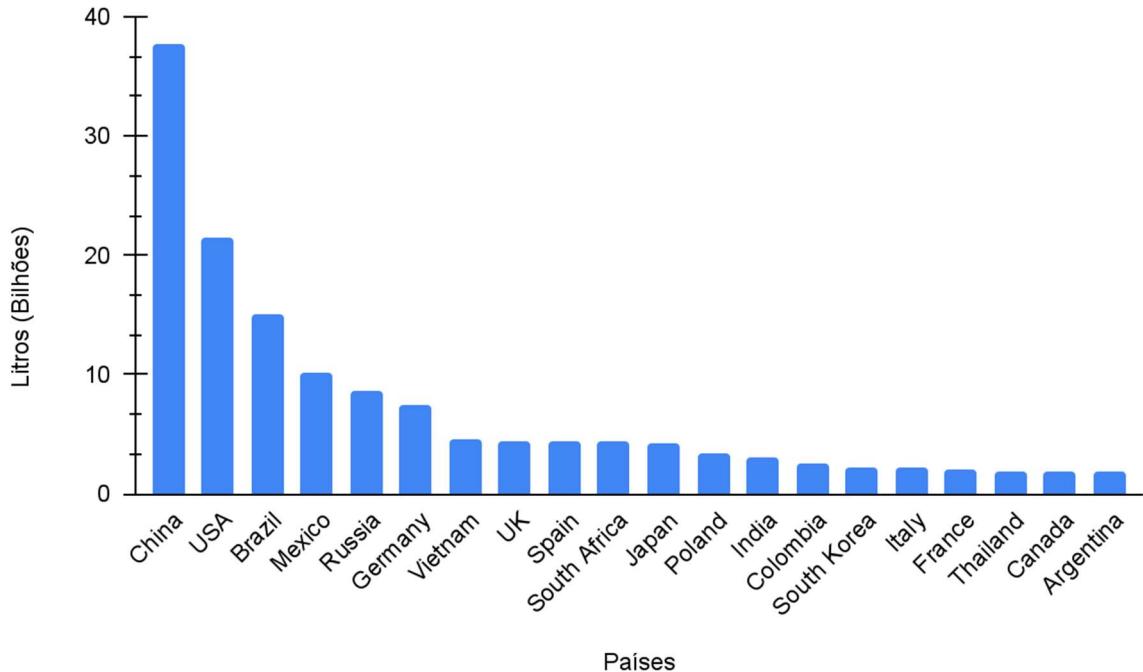
Concluída a fermentação primária, a cerveja verde passa pelo estágio de maturação em temperaturas mais baixas, o que permite o amadurecimento dos sabores e a decantação de compostos responsáveis por turbidez, contribuindo para a estabilidade sensorial e visual do produto (MATHIAS et al., 2019). A maioria das cervejas comerciais é então filtrada para remover leveduras e partículas, podendo também receber enzimas como proteases e glucanases, ou aditivos adsorventes, para aumentar a estabilidade coloidal e prevenir a formação de turbidez, o que melhora a aparência e a vida útil da cerveja (IMURE, 2012).

Por fim, a cerveja é carbonatada e embalada em garrafas, latas ou barris. Em alguns casos, pode passar por pasteurização para garantir a estabilidade microbiológica. A escolha do método de envase considera o estilo da cerveja e a durabilidade desejada do produto (MATHIAS et al., 2019).

3.2.2 CONSUMO MUNDIAL DE CERVEJA

Em relação ao consumo de cerveja no mundo, destaca-se a China como o país que apresenta maior consumo, seguido pelos Estados Unidos e pelo Brasil, conforme Figura 4.

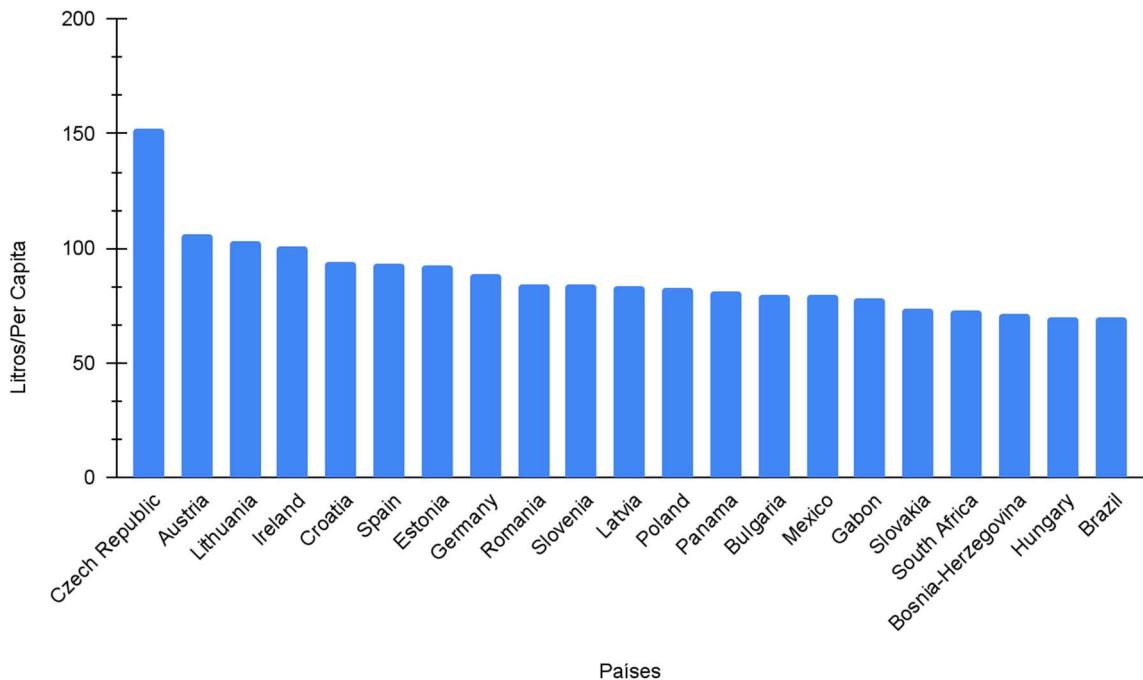
Figura 4 – Consumo de cerveja por país (BL).



Fonte: elaboração própria com base em: Kirin, 2024.

Em relação ao consumo per capita, observa-se uma prevalência de países europeus (em especial do leste europeu) compondo as dez primeiras posições, conforme Figura 5. O Brasil aparece em vigésimo primeiro da lista, o quarto país não europeu com maior consumo per capita.

Figura 5 – Consumo de cerveja por país per capita (em L/capita).

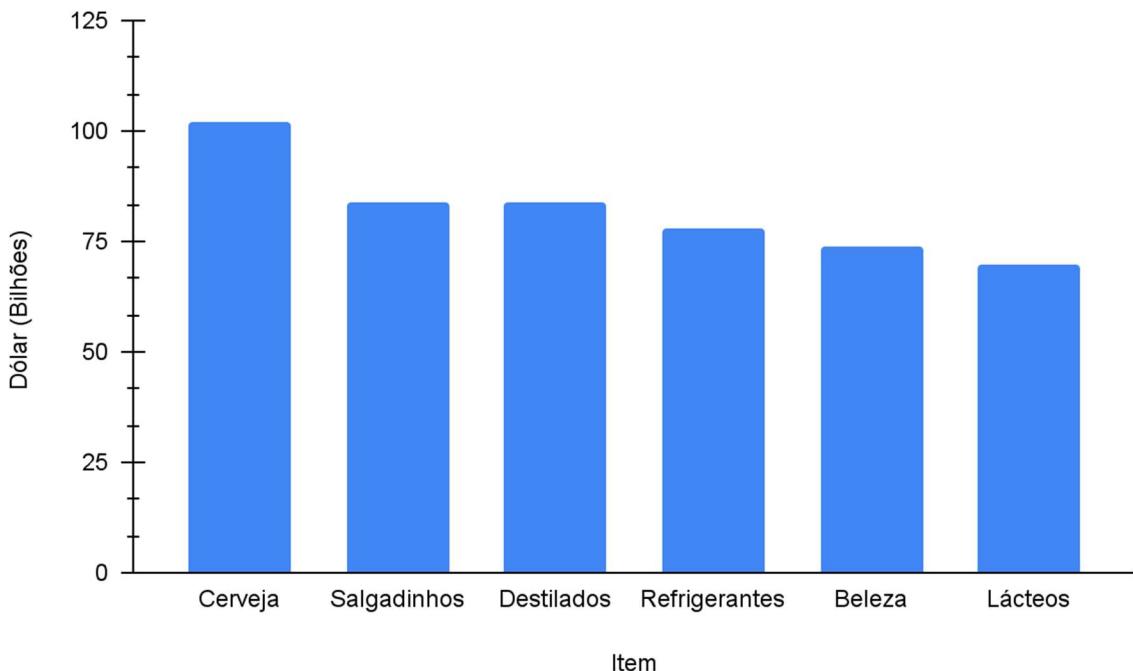


Fonte: elaboração própria com base em: Kirin, 2024.

3.2.3 ASPECTOS MERCADOLÓGICOS DA CERVEJA

A cerveja possui a maior reserva de lucros de produtos comparáveis (bens de consumo embalados), alcançando \$102 Bilhões, conforme Figura 6. Além disso, possuem uma margem EBITDA (Lucros antes de juros, impostos, depreciação e amortização - sigla em inglês) de 29% contra 23% da média de produtos de consumo embalados (AB Inbev, 2025).

Figura 6 – Reserva de lucro por produto de bens embalados.

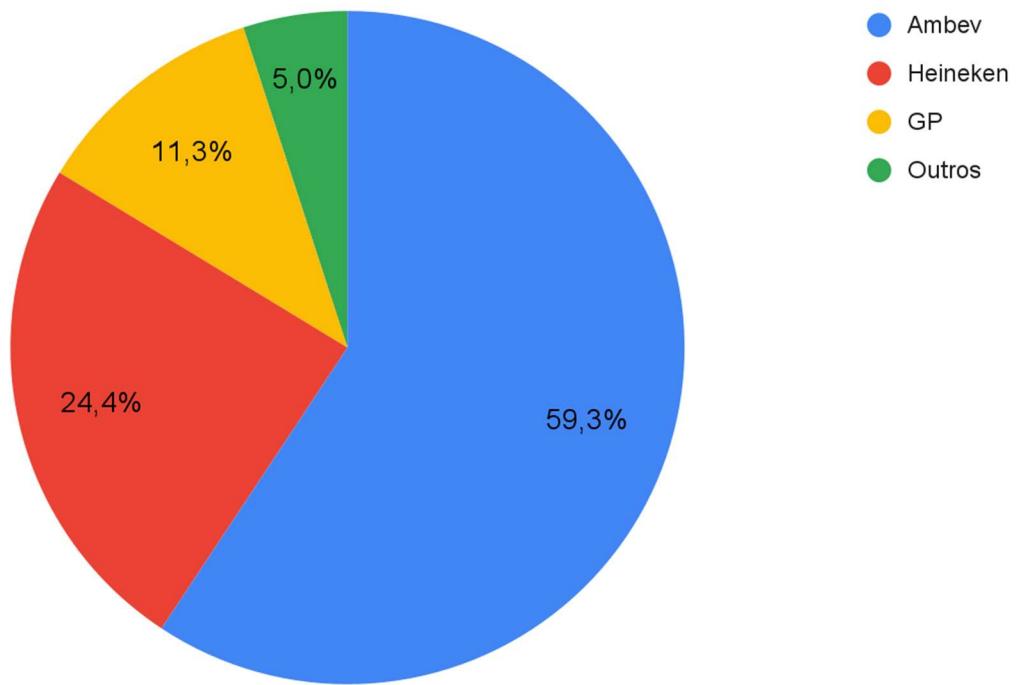


Fonte: elaboração própria com base em: AB Inbev, 2025.

Além disso, agências de mercado esperam que o segmento de cerveja siga crescendo, com expectativas de CAGR (Taxa de Crescimento Anual Composta, sigla em inglês) entre 2024 e 2028 entre 1,0 - 1,7% e um ganho de participação do consumo total de bebidas de 0,5% no mesmo período (AB Inbev, 2025).

No Brasil o *market share* na indústria da cerveja é dominado por três grandes *players*: Ambev, Heineken e o Grupo Petrópolis (Figura 7). A Ambev é uma empresa brasileira formada na fusão entre Antártica e a Brahma na década de 90, hoje a empresa faz parte da AB Inbev e atua em vários países da América Latina e no Canadá, distribuindo rótulos de todo o mundo (Ambev, 2025). A Heinken é uma empresa holandesa que possui mais de 150 anos como negócio familiar, hoje atuam em mais de 190 países, distribuindo mais de 300 rótulos, com foco em produtos premium (Heineken, 2025). O Grupo Petrópolis nasceu em 1994 distribuindo a marca Itaipava até que em 1999 adquirem a Crystal e passam a se chamar oficialmente Grupo Petrópolis (Grupo Petrópolis, 2025).

Figura 7 – Market share da indústria de cerveja



Fonte: elaboração própria com base em: Catalisi, 2024.

A indústria da cerveja passa por algumas transformações recentes, como o aumento do consumo de cervejas sem glúten, expansão do segmento de cervejarias artesanais, cervejas sem álcool e a preferência do consumidor apontando para marcas de maior valor agregado (tendência também chamada de *premiumização*).

O mercado global de cerveja sem glúten vem apresentando um crescimento expressivo, impulsionado principalmente pela maior conscientização sobre saúde e pela crescente prevalência de doenças como a intolerância ao glúten e a doença celíaca. Entre 2025 e 2029, projeta-se um aumento de aproximadamente US\$ 23,8 bilhões, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 19,8%. Os canais de venda *off-trade*, como supermercados e e-commerce, são os mais relevantes, favorecendo o consumo domiciliar. Além disso, a diversificação dos produtos, especialmente no segmento artesanal, tem sido essencial para atrair novos públicos. Grãos alternativos como sorgo, milho, arroz e trigo-sarraceno são amplamente utilizados para atender às restrições alimentares sem comprometer o sabor. O estilo artesanal representa cerca de 45% das vendas globais, seguido por lagers e ales (TECHNAVIO, 2025).

Regionalmente, a América do Norte lidera o consumo global, com cerca de 40% do mercado, seguida pela Europa e pela região da Ásia-Pacífico, que vêm demonstrando

crescimento acelerado. Na América do Sul, mercados como o brasileiro mostram potencial promissor, embora ainda enfrentem desafios logísticos e custos elevados de produção. A competição também se intensifica, com grandes fabricantes e cervejarias artesanais disputando espaço através de inovação e estratégias digitais. A ampliação do comércio eletrônico, o desenvolvimento de rótulos *clean-label* e o investimento em embalagens atrativas são algumas das principais estratégias adotadas para consolidar marcas e fidelizar consumidores. Dessa forma, a cerveja sem glúten não apenas se firma como uma alternativa para públicos com restrições alimentares, mas também como um segmento dinâmico e inovador dentro da indústria global de bebidas (TECHNAVIO, 2025).

A cerveja artesanal, caracterizada pela produção em pequena escala, foco em qualidade, variedade e métodos tradicionais, tem ganhado destaque no mercado global. Segundo relatório da Mintel (2018), o Brasil se consolidou como o segundo país mais inovador do mundo nesse segmento, sendo responsável por 9% dos lançamentos globais de cervejas artesanais em 2017, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Esse avanço reflete uma mudança no comportamento dos consumidores brasileiros, que passaram a rejeitar a homogeneidade das grandes cervejarias e buscaram experiências mais diversificadas e autênticas, o que estimulou o surgimento de microcervejarias e a expansão do mercado premium. Esse fenômeno no Brasil é comparável ao movimento de contracultura cervejeira que ocorreu nos Estados Unidos nas décadas de 1980 e 1990, marcando uma transformação significativa nos padrões de consumo e produção no setor. Enquanto as grandes cervejarias estão investindo em *premiumização*, as microcervejarias independentes enfrentam desafios de distribuição, mas se diferenciam por meio de processos artesanais, ingredientes exóticos e espaços de experiências, como *beer bars* e *tasting rooms* (EUROMONITOR, 2024).

As cervejas sem álcool também são tendência entre consumidores mais preocupados com a priorização de um *lifestyle* mais saudável. Desse modo, a competição nesse mercado tem apontado para a necessidade de sabores de alta qualidade, características únicas e adição de vitaminas (especialmente D e B). Essa tendência é especialmente significativa na América Latina, onde a fração de população que buscava reduzir/eliminar o consumo de álcool saiu de 39% em 2019 para 53% em 2024 (EUROMONITOR, 2024).

Em 2024 o mercado brasileiro de cerveja manteve um crescimento resiliente, impulsionado pelo segmento de *premium lager* que apresentou um aumento de 4% de volume, enquanto segmentos de *mid-priced* e economia apresentaram declínio de volumes. Estes dados

evidenciam a tendência da *premiumization* que as grandes marcas. Desse modo, a Euromonitor (2025) na pesquisa *Beer in Brazil* revela que as principais oportunidades do mercado de cerveja estão relacionadas à estratégia de premiumização, foco em bem-estar e sustentabilidade, bem como investimentos tecnológicos por parte das grandes cervejarias, apesar da incerteza regulatória frente a potenciais mudanças tributárias.

3.3 ANÁLISE SISTEMÁTICA DE ARTIGOS

O crescimento acelerado da produção científica e da quantidade de periódicos e consequentemente o crescimento no número de bases de dados diferentes tem tornado mais difícil e demorado para os pesquisadores identificar os trabalhos mais relevantes para suas investigações. Diante disso, surge a necessidade de uma metodologia sistemática, objetiva e eficiente para seleção e priorização de artigos científicos (PAGANI et al., 2015). Existem diversos métodos possíveis para revisão sistemática da literatura, dentre eles destacam-se o MSCRI (*The Management System of the Central Research Institute*), a *The Cochrane Collaboration* e o *ProKnow-C* (PAGANI et al., 2015).

O MSCRI nasceu no Instituto Central de Pesquisa Química da Academia Húngara de Ciências em 1986, o foco era analisar a produção científica dos pesquisadores da instituição considerando critérios como participação em comitês científicos, prêmios, número de publicações, impacto, etc. Porém, esse método avalia somente a produção científica de indivíduos ou instituições, de modo que não se aplica para selecionar publicações de terceiros para um portfólio temático (PAGANI et al., 2015).

A *Cochrane Collaboration* foi criada por Archie Cochrane em 1993 visando produzir revisões sistemáticas na área da saúde, produzindo decisões mais informadas para profissionais da área. O método consiste primeiro na definição dos objetivos da revisão, então são criados critérios de inclusão e exclusão, depois desse processo eles são identificados e por fim analisados. Desse modo, o método buscava alcançar todos os estudos publicados sobre um tópico específico, de modo que todos os artigos selecionados são lidos e analisados. Apesar de inicialmente aplicado para a área da saúde, o método é adequado para quaisquer ramos do conhecimento, porém não possui um filtro para eliminar artigos irrelevantes, demandando, portanto, grandes equipes e tempo e ainda sim torna-se inviável para temas com grande volume de publicações (PAGANI et al., 2015).

O *ProKnow-C* (*Process of Knowledge Development - Constructivist*) é um método brasileiro de construção de conhecimento separado em 4 etapas. Primeiro há a seleção do portfólio temático via definição de palavras-chave e de base de dados, que são sucedidos pela

busca e teste de aderência do resultado com o tema proposto, então os artigos são classificados com base no número de citações via regra de Pareto, ou seja, são contabilizados os artigos que representem 80% do total de citações. A segunda etapa consiste numa análise bibliométrica, para então fazer uma análise sistêmica para identificar gaps que possam ser próximos passos para pesquisa, por último o conhecimento é usado para propor hipóteses e objetivos. O método possui algumas limitações ao não considerar o fator de impacto dos periódicos, ao excluir artigos mais recentes por menor número de citações e ao incluir etapa de análise sistêmica (PAGANI et al., 2015; CARVALHO et al., 2020).

Os métodos mencionados baseiam-se em análise sistemática com um conjunto de dados diretamente comparáveis, porém trabalhos complexos podem incluir séries de dados não diretamente comparáveis. Desse modo, podem ser utilizados modelos do tipo MCDA (*Multiple Criteria Decision Aiding*) que são métodos matemáticos e analíticos voltados para auxiliar a tomada de decisão em cenários com múltiplos critérios conflitantes. Entre as principais abordagens de MCDA estão a teoria da utilidade, a teoria da superação (ou *outranking*) e as regras de decisão, cada uma adequada a diferentes contextos decisórios. Na seleção de artigos científicos, sua aplicação se mostra pertinente diante da necessidade de conciliar variáveis como fator de impacto, número de citações e ano de publicação, critérios que, isoladamente, não representam a relevância global de uma obra. Pagani et al. (2015) destacam que o uso de MCDA permite integrar esses aspectos em um índice único, o *InOrdinatio*, fundamentando a priorização de publicações de forma objetiva e racional.

O *Methodi Ordinatio* é um método bibliométrico sistemático utilizado para selecionar, classificar e priorizar artigos científicos relevantes em revisões de literatura. Ele é composto por nove etapas organizadas em duas grandes sequências: a investigação preliminar, que inclui a definição da intenção de pesquisa, busca exploratória com palavras-chave, consolidação da estratégia de busca e a execução final da busca em bases de dados; e a filtragem do portfólio, que envolve a eliminação de duplicatas, análise de alinhamento por título, resumo e palavras-chave, cálculo do índice *InOrdinatio* (que combina número de citações, fator de impacto do periódico e idade da publicação, ponderados por uma constante alfa), ranqueamento dos artigos, obtenção dos textos completos e análise sistemática do conteúdo selecionado. Esse método se destaca por seu caráter estruturado e flexível, permitindo priorizar artigos mais recentes ou mais citados conforme os objetivos do pesquisador. Dessa forma, o método permite ao pesquisador avaliar a relevância dos artigos a serem analisados sem precisar da leitura completa de todos os artigos publicados sobre o tema, otimizando o trabalho de análise sistemática (PAGANI et al., 2015; CARVALHO et al., 2020).

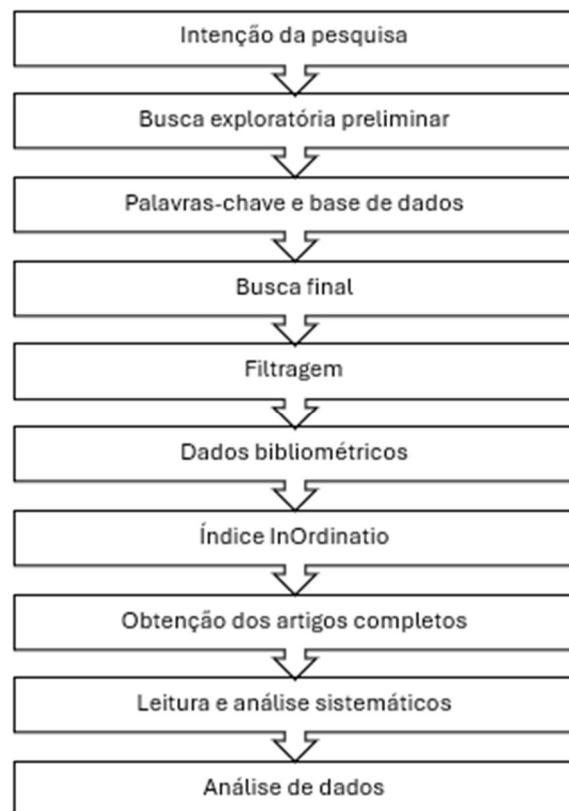
O *Methodi Ordinatio* já foi utilizado em várias áreas do conhecimento, como para revisão sistemática de produção de enzimas utilizando resíduos agroalimentares (PEREIRA et al., 2024), para análise de performance laboral no setor de serviços (SANDAL et al., 2022), para análise de impressão 3D em módulos de construção na engenharia civil (LATORRACA, 2024) e para análise da reciclagem de baterias de íon-lítio (REGATIERI, 2022).

4 METODOLOGIA

4.1 BUSCA SISTEMÁTICA NA LITERATURA

Com o objetivo de identificar e analisar as pesquisas que vêm sendo realizadas em relação ao uso de proteases em processos de produção de cerveja, foi adotada a metodologia *Methodi Ordinatio*, que estrutura a busca e seleção de artigos científicos por meio de nove fases distintas (PAGANI et al., 2015). A seguir, são descritas as etapas adotadas nesta revisão conforme mostra a Figura 8.

Figura 8 – Fluxograma esquemático das etapas do Methodi Ordinatio



Fonte: elaboração própria com base em PAGANI et al., 2015.

4.1.1 DEFINIÇÃO DA INTENÇÃO DE PESQUISA

Na primeira fase da metodologia *Methodi Ordinatio*, definiu-se como objetivo a identificação de pesquisas que investigaram a aplicação de proteases em processos de produção de cerveja.

4.1.2 BUSCA EXPLORATÓRIA PRELIMINAR

A segunda fase consistiu em uma busca exploratória na base de dados SCOPUS, utilizando os termos "protease", "peptidase", "proteinase", além de “brewing” e “beer”, nos campos de título, resumo e palavras-chave. Durante essa etapa, verificou-se que o termo “protease” era frequentemente substituído pelo nome específico da enzima,. Assim, adotou-se uma lista exaustiva de proteases: Quimotripsina, papaína, bromelina, subtilisina, ficina, renina, catepsina e tripsina, além de *protease para solucionar a questão dos prefixos endo e exo.

4.1.3 DEFINIÇÃO DAS PALAVRAS-CHAVE E DAS BASES DE DADOS

Com base na busca preliminar, foi definido um bloco de palavras-chave, combinados com operadores booleanos e aspas, conforme segue:

- Bloco único: [("peptidase" OR "*protease" OR "proteinase" OR "Quimiotrypsine" OR "Papain" OR "Bromelin" OR "Subtilisin" OR "Ficin" OR "Renin" OR "Catepsin" OR "Trypsin") AND ("brewing" OR "beer")];

A base selecionada para a busca foi SCOPUS por ser amplamente reconhecida e relevante na área de biotecnologia e ciências aplicadas.

4.1.4 REALIZAÇÃO DA BUSCA FINAL

A quarta fase compreendeu a execução da busca na base de dados, realizada no dia 29 de setembro de 2024, sem restrições quanto ao idioma ou ao ano de publicação. Foram considerados apenas artigos científicos originais, excluindo-se revisões e capítulos de livros. Os resultados foram organizados no gerenciador de referências *Mendeley*. A busca na SCOPUS resultou em 423 resultados.

4.1.5 PROCEDIMENTOS DE FILTRAGEM

Na quinta fase, foram aplicados procedimentos de triagem de relevância em que foram eliminados artigos que não estivessem relacionados diretamente ao tema, com base na leitura de títulos e resumos. Ao final dessa etapa, os artigos que restaram foram para análise aprofundada.

Foram excluídos artigos que não versavam sobre cerveja e/ou proteases, bem como artigos cuja presença nas buscas fosse restrita somente aos respectivos resumos.

4.1.6 COLETA DE DADOS BIBLIOMÉTRICOS

A sexta fase envolveu a obtenção do número de citações dos artigos, e do fator de impacto dos periódicos, por meio do *Journal Citation Reports* (JCR) 2023. Para os periódicos não indexados no JCR, o fator de impacto considerado foi zero. Esses dados são utilizados para mensurar a relevância e qualidade dos periódicos científicos.

4.1.7 CÁLCULO DO ÍNDICE INORDINATIO

Na sétima fase, os artigos foram ranqueados com base no índice *InOrdinatio*, calculado conforme a seguinte Equação 1:

$$InOrdinatio = N^{\circ} \text{ Citações} + \text{Fator de Impacto} + (10 * \alpha) - (\alpha * \text{Idade do artigo}) \quad (\text{Eq. 1})$$

Para esta revisão, a constante α foi fixada em 1, a fim de atribuir peso às publicações mais antigas, já que se verificou a existência de artigos de alta relevância com idade relativa alta.

4.1.8 OBTENÇÃO DOS ARTIGOS COMPLETOS

Os artigos selecionados foram obtidos integralmente durante a fase de coleta de dados. A obtenção dos textos completos foi essencial para a análise sistemática realizada na etapa seguinte.

4.1.9 TRATAMENTO DE DADOS E LEITURA DOS ARTIGOS

A nona fase consistiu na leitura integral dos artigos ranqueados e sua análise qualitativa com ênfase nos dez melhores ranqueados, com a extração dos principais achados, abordagens metodológicas e tendências em relação à produção de cerveja utilizando proteases.

4.1.10 ANÁLISE DOS DADOS

A catalogação e análise dos dados foram realizadas por meio de planilhas eletrônicas do Microsoft Excel. Os dados foram catalogados e o índice *Inordinatio* foi calculado.

5 RESULTADOS E DISCUSÃO

5.1 PORTFÓLIO SELECIONADO

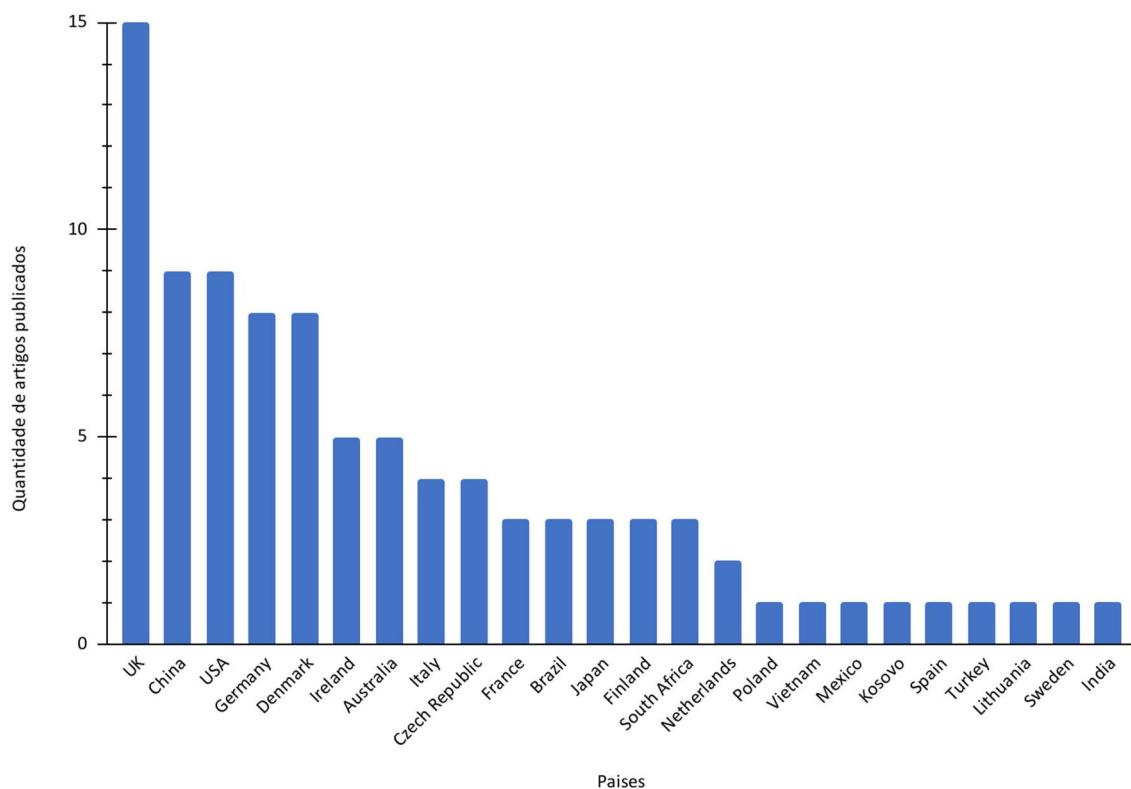
A busca sistemática realizada na base de dados SCOPUS® para identificar estudos relacionados ao uso de proteases em processos de produção de cerveja resultou em 423 artigos. Após a leitura de títulos e resumos, 338 publicações foram excluídas por não atenderem aos critérios de relevância temática, resultando em um conjunto final de 82 artigos que compuseram o corpo da análise bibliométrica e sistemática.

Nesta etapa, os artigos foram organizados e ranqueados por meio do índice *InOrdinatio*, com o intuito de destacar os estudos mais relevantes com base em critérios de impacto científico. A Tabela A (Apêndice A) apresenta todos os artigos selecionados na ordem de classificação do método, com os valores de fator de impacto, citações e índice *InOrdinatio*. Para o cálculo do índice, foi adotado um valor de α igual a zero, de forma a não atribuir peso adicional a publicações mais recentes, dado que a revisão identificou artigos antigos com alta relevância para o tema. Como o número total de artigos diretamente relacionados ao escopo do estudo era limitado, optou-se por considerar toda a população de artigos identificados, sem realizar a amostragem. Assim, o método *Methodi Ordinatio* foi utilizado exclusivamente como ferramenta de ordenação, fornecendo uma base sólida para a análise bibliométrica subsequente.

5.2 PAÍSES

Dentre os países que constavam na afiliação dos autores de pesquisas relacionadas à aplicação de proteases em processos de produção de cerveja, destaca-se o Reino Unido, que contabiliza 15 publicações relacionadas ao tema estudado (Figura 9). Tal país é reconhecido como o oitavo maior consumidor de cerveja no mundo e configura-se como um dos pioneiros na produção científica sobre o assunto. Essa tendência reflete um interesse consolidado e histórico do Reino Unido na área, demonstrando sua relevância no cenário acadêmico internacional.

Figura 9 – País de publicação dos artigos selecionados na base SCOPUS sobre o uso de proteases na produção de cerveja.



Fonte: elaboração própria

Na sequência, encontram-se China e Estados Unidos, cada um com 9 publicações e logo abaixo Alemanha com 8 artigos, que correspondem respectivamente ao primeiro, segundo e sexto maiores mercados consumidores globais de cerveja. O Brasil, por sua vez, aparece com um total de 3 artigos publicados, revelando um campo em crescimento dentro da comunidade acadêmica nacional. Apesar do número ainda modesto em comparação a outras nações, a pesquisa brasileira tem ganhado força no segmento nos últimos anos, com o artigo mais antigo datando de 2019.

Por fim, ressalta-se também a presença de uma variedade expressiva de países europeus no conjunto analisado, evidenciando a importância do continente no contexto global da pesquisa cervejeira. Tal destaque pode ser atribuído ao elevado consumo per capita de cerveja na Europa, que, em comparação com outras regiões do mundo, mantém um posicionamento de liderança tanto no mercado quanto na produção acadêmica relacionada ao tema.

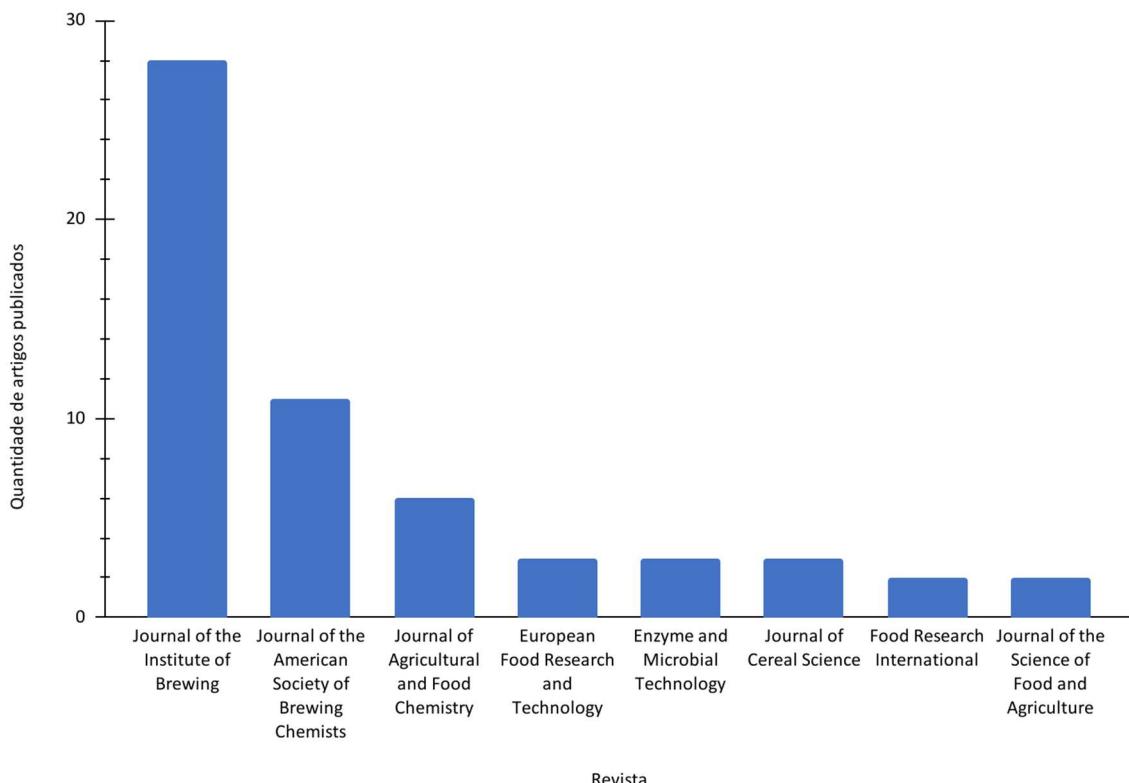
5.3 REVISTAS

Observou-se que as revistas com maior número de publicações são as especializadas em cerveja, como *Journal of the Institute of Brewing* e *Journal of American Society of Brewing Chemists* (Figura 10). Em seguida, observa-se uma predominância de revistas especializadas em alimentos e bebidas, como *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *European Food Research and Technology*, *Food Research International* e *Journal of Science of Food and Agriculture*.

Destaca-se, ainda, a revista *Enzyme and Microbial Technology* focada na publicação de artigos que envolvam o uso de enzimas e microrganismos em aplicações biotecnológicas industriais. Por fim, aparece o *Journal of Cereal Science* focado no tema de ciência dos cereais.

A Figura 10 apresenta as revistas com mais de um artigo publicado na base SCOPUS sobre o uso de proteases em processos de produção de cerveja.

Figura 10 – Revistas científicas associadas à base SCOPUS com mais de um artigo publicado sobre o uso de proteases em processos de produção de cerveja.

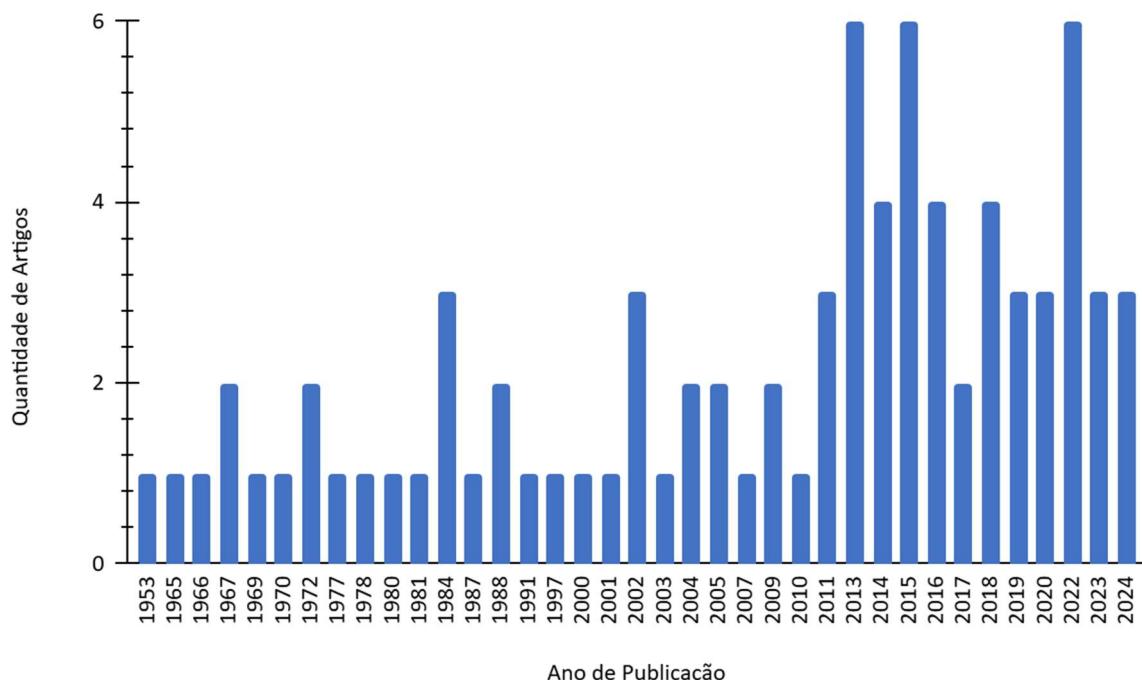


Fonte: elaboração própria

5.4 ANO DE PUBLICAÇÃO

Entre os 82 artigos incluídos estudados, observou-se que o interesse pela utilização de proteases para produção de cerveja começou de maneira mais consistente a partir da segunda metade da década de 1960. Desde então, o tema teve um novo aumento em interesse científico a partir da década de 2010, como podemos observar na Figura 11.

Figura 11 – Ano de publicação dos artigos selecionados na base SCOPUS sobre uso de proteases na produção de cerveja.



Fonte: elaboração própria

O artigo mais antigo da amostra, "*Note on some experimental steeping treatments of malting barley*" (URQUHART, 1953), tem como país de origem o Reino Unido e foi desenvolvido na Tolletnache's Breweries, Ltd., em Ipswich, Suffolk. O estudo aborda os efeitos de diferentes tratamentos químicos na etapa de maceração da cevada maltada, com foco na melhoria da germinação, especialmente em grãos mais resistentes. Foram testados aditivos como ácido nitroso, formaldeído, carbonato de sódio, bromato de potássio e papaína, avaliando-se seu impacto na taxa de germinação e na atividade proteolítica.

Em 1953, já havia um interesse, tanto do ponto de vista nutricional quanto comercial, na manipulação da proteólise durante a malteção. Tais estratégias eram vistas como fundamentais para garantir a modificação adequada da cevada, viabilizar uma germinação eficiente e obter malte de alta qualidade para a produção de cerveja e alimentos. O estudo de Urquhart (1953) demonstra esforços de modulação enzimática do processo cervejeiro, ao

reconhecer o papel crucial das proteases — endógenas e exógenas — na determinação das características finais do malte e da bebida.

5.5 CLASSIFICAÇÃO DOS ARTIGOS SEGUNDO O *METHODI ORDINATIO*

Os artigos selecionados foram classificados segundo o *Methodi Ordinatio* e ranqueados pela pontuação calculada pelo *InOrdinatio*. A Tabela 2 apresenta os 10 artigos mais bem classificados segundo esse ranking.

O artigo com o maior número *InOrdinatio* foi publicado em 2018 na *Food Research International*, uma revista com JCR 2023 de 7,0 o maior da pesquisa realizada, e trata-se, ainda, do artigo com maior número de citações da base de dados (88). O artigo reporta a utilização da prolil endopeptidase (PEP) produzida por *Aspergillus niger* (AN-PEP), para produção de cervejas com baixo teor de glúten. Essa enzima apresenta capacidade de hidrolisar sequências ricas em prolina presentes nas proteínas do glúten, que é altamente imunogênico para celíacos. A escolha da protease se deu por atuar eficientemente em pH ácido (4,5–5,5) e temperaturas moderadas (30–55 °C). A AN-PEP pode ser aplicada diretamente no processo fermentativo da cerveja, reduzindo os níveis de glúten para abaixo de 20 ppm — conforme confirmado por testes ELISA R5 — sem comprometer as propriedades sensoriais do produto final (SCHERF, 2018).

O artigo com o segundo maior valor no índice *InOrdinatio* foi publicado em 2015 na revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, que apresenta um JCR de 5,7 (2023). Além disso, esse artigo possui a segunda maior quantidade de citações entre os analisados (69). No estudo de Picariello et al. (2015) foram investigadas proteínas e peptídeos presentes na *Weissbier*, com foco na atividade limitada das proteases durante o processamento. Embora o processo de malteação e fermentação ative enzimas endógenas capazes de hidrolisar proteínas, como as proteases presentes no trigo e na cevada, muitas proteínas potencialmente imunogênicas permaneceram parcialmente intactas. Além disso, foram identificados inibidores de proteases, como os inibidores de tripsina, que podem reduzir a ação enzimática e favorecer a permanência de fragmentos alergênicos. Os resultados, obtidos por técnicas como LC-MS/MS e ELISA G12, mostraram que a *Weissbier* contém níveis elevados de peptídeos derivados do glúten, sendo, portanto, inadequada para celíacos (PICARIELLO, 2015).

Tabela 2 - Top 10 artigos científicos na base SCOPUS sobre utilização de proteases na indústria da cerveja segundo o método do InOrdinatio

| Ranking | Título do artigo | IF* | Citações** | Idade*** | InOrdinatio | Autores |
|---------|---|------|------------|----------|-------------|---|
| 1 | Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products | 7,00 | 88 | 6 | 99,0 | Scherf K.A.; Wieser H.; Koehler P. |
| 2 | Proteomics, Peptidomics, and Immunogenic Potential of Wheat Beer (Weissbier) | 5,70 | 69 | 9 | 75,7 | Picariello G.; Mamone G.; Cutignano A.; Fontana A.; Zurlo L.; Addeo F.; Ferranti P. |
| 3 | Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast | 5,00 | 54 | 11 | 58,0 | Lei H.; Zheng L.; Wang C.; Zhao H.; Zhao M. |
| 4 | Yeast proteolytic activity during high and low gravity wort fermentations and its effect on head retention | 2,40 | 59 | 24 | 47,4 | Cooper D.J.; Stewart G.G.; Bryce J.H. |
| 5 | Production of gluten-free beer by peptidase treatment | 3,00 | 42 | 8 | 47,0 | Knorr V.; Wieser H.; Koehler P. |
| 6 | The impact of kilning on enzymatic activity of buckwheat malt | 2,40 | 53 | 19 | 46,4 | Nie Phiarais B.P.; Wijngaard H.H.; Arendt E.K. |
| 7 | The role of small wort peptides in brewing fermentations | 2,40 | 47 | 15 | 44,4 | Lekkas C.; Hill A.E.; Taidi B.; Hodgson J.; Stewart G.G. |
| 8 | Characterisation and Assessment of the Role of Barley Malt Endoproteases During Malting and Mashing ¹ | 2,40 | 50 | 22 | 40,4 | Osman A.M.; Coverdale S.M.; Cole N.; Hamilton S.E.; de Jersey J. |
| 9 | The identification of a barley haze active protein that influences beer haze stability: Cloning and characterisation of the barley SE protein as a barley trypsin inhibitor of the chloroform/methanol type | 3,90 | 43 | 17 | 39,9 | Robinson L.H.; Juttner J.; Milligan A.; Lahnstein J.; Eglinton J.K.; Evans D.E. |
| 10 | Posttranslational modifications drive protein stability to control the dynamic beer brewing proteome | 6,10 | 28 | 5 | 39,1 | Kerr E.D.; Caboche C.H.; Schulz B.L. |

Legenda: *Fator de impacto do JCR de 2023; **Refere-se ao número de vezes que o artigo foi citado; ***Ano atual subtraído do ano do artigo.

O artigo com o terceiro maior valor no índice *In Ordinatio* foi publicado em 2013 na revista *International Journal of Food Microbiology*, que apresenta um JCR de 5,0 (2023). Além disso, esse artigo possui a quarta maior quantidade de citações entre os analisados (54). O artigo apresenta a aplicação de proteases comerciais ao mosto cervejeiro, uma estratégia promissora para otimizar a fermentação e a qualidade final da cerveja. Foram utilizadas formulações enzimáticas contendo endopeptidases isoladas ou combinadas com exopeptidases durante a etapa de sacarificação da brassagem. Especificamente, aplicaram-se as enzimas Neutrase® 0.8 L, uma endopeptidase neutra do tipo metaloprotease derivada de *Bacillus amyloliquefaciens*, e Flavorzyme® 1000L, um complexo enzimático composto majoritariamente por exopeptidases, como aminopeptidases e carboxipeptidases, produzidas por *Aspergillus oryzae*. Essa adição enzimática resultou em um aumento significativo da concentração de aminoácidos livres no mosto, com destaque para glutamina, serina, alanina e ácido aspártico, que são rapidamente assimilados pelas leveduras. Como consequência, observou-se uma maior eficiência fermentativa, com taxas elevadas de consumo de açúcares e redução do tempo total de fermentação. Além disso, o tratamento enzimático influenciou positivamente o perfil de compostos voláteis, como ésteres e álcoois superiores, podendo contribuir para a melhoria do aroma da cerveja (LEI, 2013).

O artigo com o quarto maior valor no índice *In Ordinatio* foi publicado em 2000 na revista *Journal of the Institute of Brewing*, que apresenta um JCR de 2,4 (2023). Além disso, esse artigo possui a terceira maior quantidade de citações entre os analisados (59). O artigo foca na fermentação do mosto cervejeiro, especialmente em mostos de alta densidade (20 °Plato), quando a levedura libera quantidades elevadas de proteinase A, uma protease que degrada polipeptídeos hidrofóbicos responsáveis pela estabilidade da espuma. Cooper et al. (2000) demonstraram que essa atividade proteolítica é significativamente maior sob condições de maior estresse celular, como altas concentrações de etanol e osmolaridade, levando à perda acentuada de compostos formadores de espuma. O uso de antiespumante (FERMCAP™) reduziu a formação de espuma durante a fermentação, mas não impediu a queda desses polipeptídeos nem melhorou a retenção de espuma, indicando que a ação da protease é o principal fator envolvido. A pasteurização, por sua vez, inativou as proteases residuais, preservando a espuma durante o armazenamento da cerveja (COOPER, 2000).

O artigo com o quinto maior valor no índice *In Ordinatio* foi publicado em 2016 na revista *European Food Research and Technology*, que apresenta um JCR de 3,0 (2023). Além disso, esse artigo possui a décima primeira maior quantidade de citações entre os analisados

(42). O estudo demonstrou que as proteases endógenas da cevada exercem papel central na dinâmica do proteoma durante a mosturação na produção de cerveja. Ativas principalmente nas etapas iniciais, em temperaturas mais baixas (como o “descanso proteico” a 52 °C), essas enzimas promovem clivagens específicas em diversas proteínas, gerando peptídeos menores que contribuem para o aumento do nitrogênio amino livre (FAN), essencial à fermentação. No entanto, essa proteólise também reduz a estabilidade térmica das proteínas, tornando-as mais propensas à desnaturação, agregação e precipitação em estágios posteriores da mosturação, com temperaturas elevadas. Assim, as proteases modulam diretamente a composição e a estabilidade do proteoma da cerveja ao influenciar quais proteínas permanecem solúveis até o final do processo, o que impacta características como formação de espuma e turbidez (KNORR et al.; 2016).

O artigo com o sexto maior índice *InOrdinatio* foi publicado em 2005 na revista *Journal of the Institute of Brewing*, que apresenta um JCR de 2,4 (2023). Além disso, esse artigo possui a quinta maior quantidade de citações entre os analisados (53). estudos autores investigaram a influência do processo de secagem (*kilning*) sobre a atividade enzimática do malte de trigo-sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), com ênfase nas enzimas relevantes para a produção de cerveja, incluindo as proteases. Após germinar os grãos por quatro dias a 15 °C, os autores submeteram o malte a *kilning* contínuo a 40 °C por 48 horas, coletando amostras periodicamente para análise de enzimas. A atividade proteolítica, medida pela liberação de leucina a partir de hemoglobina, aumentou progressivamente: de 3,7 mg leucina·h⁻¹·g⁻¹ no grão cru para 4,8 mg leucina·h⁻¹·g⁻¹ após germinação e 5,5 mg leucina·h⁻¹·g⁻¹ no malte final. Embora inferior à atividade observada em malte de cevada (9,3 mg), o trigo-sarraceno demonstrou capacidade de gerar quantidades adequadas de FAN para as leveduras, essencial para a fermentação. Os autores concluíram que as proteases, sobretudo as exopeptidases mais resistentes ao calor, permanecem ativas após a secagem e contribuem para a formação de compostos nitrogenados no mosto. Assim, mesmo com menor atividade proteolítica global, o malte de trigo-sarraceno apresenta potencial para uso na produção de cervejas sem glúten, desde que o processo de maltagem seja devidamente otimizado (NIE PHIARAIS, B. P., 2005).

O artigo com o sétimo maior índice *InOrdinatio* foi publicado em 2009 na revista *Journal of the Institute of Brewing*, que apresenta um JCR de 2,4 (2023). Além disso, esse artigo possui a oitava maior quantidade de citações entre os analisados (47). Lekkas et al. (2009) investigaram o comportamento de oligopeptídeos presentes no mosto cervejeiro durante fermentações com leveduras do tipo ale e lager, empregando um método inovador para sua

deteção, isolamento e quantificação. Os resultados mostraram que os níveis de peptídeos no mosto flutuam ao longo da fermentação, o que foi atribuído à ação de proteases extracelulares produzidas pelas próprias leveduras. Essas enzimas degradam proteínas maiores em peptídeos menores quando as fontes preferenciais de nitrogênio (como aminoácidos livres) se esgotam. Constatou-se que, em geral, apenas peptídeos com até três aminoácidos são efetivamente absorvidos, enquanto os demais permanecem na cerveja, podendo influenciar características sensoriais como a estabilidade da espuma e a turbidez coloidal (LEKKAS, 2009).

O artigo com o oitavo maior índice *InOrdinatio* foi publicado em 2002 na revista *Journal of the Institute of Brewing*, que apresenta um JCR de 2,4 (2023). Além disso, esse artigo possui a sétima maior quantidade de citações entre os analisados (50). O estudo reporta a caracterização e a identificação do papel das endoproteases do malte de cevada durante a malteação e a brassagem. Os autores identificaram diversas endoproteases capazes de degradar as principais proteínas de reserva do grão, como hordeína e glutelina, que resistem ao processo de *kilning* e permanecem ativas durante a brassagem, contribuindo com cerca de 25 a 30% do total de nitrogênio livre (FAN) presente no mosto. Foi identificado que a atividade das endoproteases varia conforme o tipo de substrato, apresentando pH e temperatura ótimos distintos: pH 3,5 para hemoglobina, 4,0 para hordeína e 5,0 para glutelina, e temperaturas ótimas de 40 °C a 60 °C, dependendo do substrato. Além disso, a estabilidade térmica das enzimas mostrou-se maior na presença de proteínas nativas da cevada. A atuação dessas proteases é especialmente relevante em formulações com altos teores de adjuntos, que possuem baixo conteúdo de nitrogênio solúvel, podendo comprometer a nutrição da levedura se a atividade proteolítica for insuficiente (OSMAN et al., 2002).

O artigo com o nono maior índice *InOrdinatio* foi publicado em 1965 na revista *Journal of Cereal Science*, que apresenta um JCR de 3,9 (2023). Além disso, esse artigo possui a décima maior quantidade de citações entre os analisados (43). Robinson et al. (2007) identificam e caracterizam uma proteína do tipo inibidor de tripsina do tipo clorofórmio/metanol (BTI-CMe), derivada cevada, como um dos principais fatores responsáveis pela instabilidade coloidal (formação de turbidez) na cerveja. Usando técnicas de eletroforese 2D, digestão com tripsina, HPLC e sequenciamento de aminoácidos, os autores demonstraram que diferentes variedades de cevada expressam variantes genéticas distintas dessa protease — especialmente BTI-CMe1 em variedades SE+ (instáveis) e BTI-CMe3.1 em SE- (mais estáveis). A BTI-CMe, com peso molecular em torno de 13,3 kDa e baixa concentração de prolina (8%), foi relacionada à formação de turbidez, devido a suas interações com polifenóis, sendo que substituições

específicas de aminoácidos, principalmente na região C-terminal, parecem alterar sua capacidade de formar complexos causadores de turbidez. A identificação dessa protease como agente ativo da turbidez oferece caminhos para o melhoramento genético de cevada e controle de qualidade na produção cervejeira (ROBINSON et al., 2007).

O artigo com o décimo maior índice *InOrdinatio* foi publicado em 2019 na revista *Molecular and Cellular Proteomics*, que apresenta um JCR de 6,1 (2023). Além disso, esse artigo possui a décima oitava maior quantidade de citações entre os analisados (28). O estudo aponta que no processo de fermentação cervejeira, as enzimas proteolíticas secretadas pelas leveduras desempenham papel fundamental na degradação de peptídeos de maior peso molecular em oligopeptídeos assimiláveis, garantindo a disponibilidade contínua de fontes nitrogenadas essenciais para o crescimento celular. Estudos demonstram que tanto cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (ale) quanto de *S. pastorianus* (lager) regulam dinamicamente a produção de proteases extracelulares ao longo da fermentação, apresentando picos de atividade protéica correlacionados aos momentos de depleção de aminoácidos livres no mosto e posteriores acumulações de oligopeptídeos (flutuações de concentração observadas em diferentes fases fermentativas). Essa adaptação enzimática permite às células manterem a viabilidade e a eficiência fermentativa mesmo após o esgotamento inicial de nitrogênio de fácil assimilação, contribuindo diretamente para o rendimento e a qualidade final da cerveja (KERR et al., 2019).

A partir da descrição dos 10 artigos de maior importância a partir do método *InOrdinatio*, observa-se a presença de 3 artigos que investigam a produção de cerveja sem glúten (SCHERF, 2018; PICARIELLO, 2015; NIE PHIARAIS, B. P., 2005). Outro tema comum são 2 artigos que investigam como evitar efeitos deletérios de proteases à formação de espuma (ROBINSON, 2007; COOPER, 2000). Além disso, 6 artigos são focados em gerar FAN para melhorar a produtividade da fermentação (LEI, 2013; LEKKAS, 2009; OSMAN et al., 2002; KERR ,2019; KNORR, 2016; NIE PHIARAIS, B. P., 2005), sendo o último referente à presença desses compostos em cervejas sem glúten.

Em termos de proteases utilizadas, 5 artigos utilizam proteases endógenas das matérias primas tradicionais da produção de cerveja (NIE PHIARAIS, B. P., 2005; OSMAN et al., 2002; LEKKAS, 2009; KERR, 2019; KNORR, 2016). Os outros artigos usam prolil-endoprotease (Scherf, 2018), tripsina (PICARIELLO, 2015; ROBINSON, 2007) e proteinase A (COOPER,

2000). Além disso, ainda há um artigo que usa uma mistura de proteases comerciais (LEI, 2013).

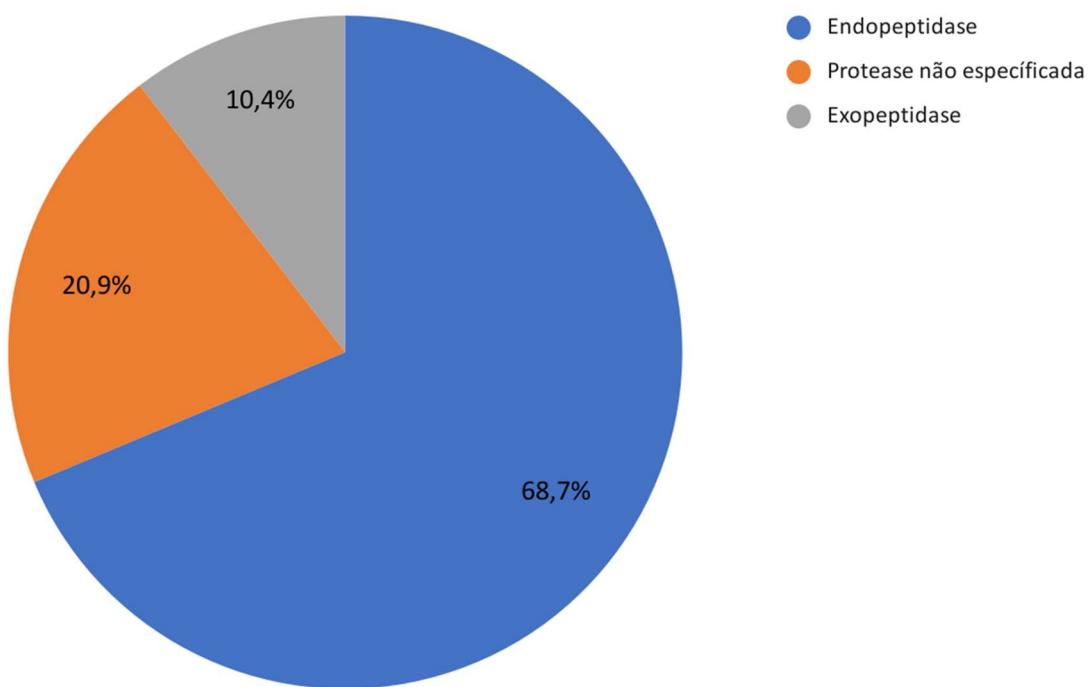
Os demais artigos ranqueados na análise, que não estão entre os dez primeiros colocados segundo o índice InOrdinatio, encontram-se listados no Apêndice A.

5.6 TENDÊNCIAS IDENTIFICADAS NOS ARTIGOS

A análise sistemática dos artigos selecionados permitiu identificar diversas tendências recorrentes na literatura científica sobre o uso de proteases na indústria cervejeira. Essas tendências refletem não apenas os principais focos de aplicação das enzimas ao longo do processo produtivo, mas também os desafios tecnológicos enfrentados, as inovações mais promissoras e os direcionamentos atuais da pesquisa nesse campo. Observou-se que os estudos abordam desde a otimização da fermentação (para a produção da cerveja) e da estabilidade coloidal até o desenvolvimento de cervejas funcionais, como as versões sem glúten. Além disso, os dados revelam padrões quanto às proteases mais estudadas, suas origens, condições de aplicação e mecanismos de ação.

Os artigos selecionados na busca por pesquisas relacionadas ao uso de proteases no processo cervejeiro apresentam uma grande diversidade de proteases testadas para melhorar vários aspectos da cerveja. É possível observar na Figura 12 que as endopeptidases são as mais utilizadas nos artigos selecionados.

Figura 12 –Percentual relativo às proteases classificadas quanto ao local de ação da enzima na cadeia polipeptídica identificadas nos artigos selecionados na base SCOPUS sobre uso na produção de cerveja.



Fonte: elaboração própria

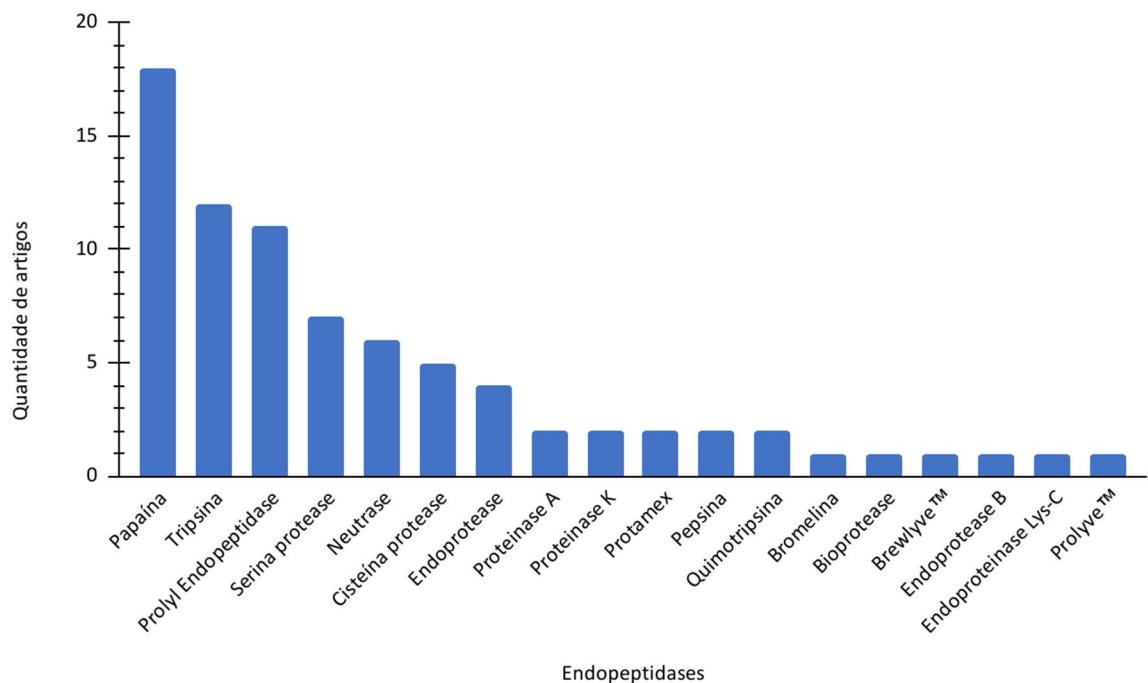
As endopeptidases (como as do tipo papaína e tripsina) atuam fortemente nas fases iniciais da germinação e brassagem, hidrolisando proteínas grandes. Sua atividade cai com o aumento da temperatura ($>65^{\circ}\text{C}$), sendo inativadas acima de 70°C . Já as exopeptidases (como as aminopeptidases e carboxipeptidases) mantêm ou aumentam sua atividade ao longo da brassagem, mesmo em temperaturas e pH mais altos, contribuindo para a liberação de nitrogênio livre (FAN). Essa atuação coordenada é essencial para a qualidade do mosto, fermentação eficiente e características sensoriais da cerveja.

Provavelmente, as endopeptidases são mais utilizadas em relação às exopeptidases na pesquisa cerjeira, pois essas proteases iniciam e conduzem as reações mais relevantes de hidrólise, promovendo melhorias para o processo cerjeiro, como clarificação, estabilidade, nutrição para as leveduras e segurança do produto. As exopeptidases, embora essenciais para a liberação completa de nitrogênio, desempenham um papel complementar e dependem da ação prévia das endopeptidases para gerar seus substratos peptídicos menores. Por isso, raramente oferecem um benefício isolado que as endopeptidases já não proporcionem (LIN, C. L, 2022).

A Figura 13 demonstra as quantidades dos diferentes tipos de endopeptidases utilizadas nos artigos selecionados. Observa-se que a papaína é a enzima mais utilizada nas pesquisas, com cerca de 18 artigos, seguida pela tripsina, com 12 artigos, e pela prolil endopeptidase, com cerca de 11 artigos. Outras enzimas como serina endopeptidase, peptidase e neutrase também são citadas, embora com menor frequência.

Dentro do grupo das endopeptidases, a papaína possui uma longa história de uso na indústria cervejeira, remontando ao início do século XX. Sua eficácia como agente de estabilização contra o frio (*chill-proofing*) foi reconhecida precocemente, tornando-se uma escolha tradicional para cervejeiros que lidam com problemas de turbidez. Essa precedência histórica resultou em um grande acervo de literatura, experiência prática e protocolos otimizados envolvendo a papaína, o que a torna uma escolha natural para pesquisas mais profundadas. Nos artigos selecionados no presente trabalho, observou-se que papaína é mais reportada nos artigos mais antigos da série de dados, iniciada nos anos 80.

Figura 13 – Quantidade de artigos que utilizam as diferentes endopeptidases entre os selecionados na base SCOPUS sobre uso na produção de cerveja.



Fonte: elaboração própria

A papaína é altamente eficaz na prevenção da *chill haze*, uma turbidez que ocorre devido à precipitação de complexos proteína-polifenol em baixas temperaturas (ORMROD et al., 1991). Como discutido em diversos estudos (KENNEDY & PIKE, 1981; FUKAL & KAS,

1984; FUKAL et al., 1981), a papaína hidrolisa proteínas instáveis responsáveis pela formação dessa turbidez, reduzindo sua capacidade de agregação durante o armazenamento refrigerado. Sua ação contribui significativamente para a estabilidade visual da cerveja, o que explica sua ampla aceitação na indústria.

Extraída do látex da mamoeira, a papaína é de fácil acesso e baixo custo em comparação a outras proteases (FUKAL & KAS, 1984; FUKAL et al., 1984). Suas propriedades enzimáticas, como especificidade de substrato, faixas ótimas de pH e temperatura, além de sua susceptibilidade a inibidores, já foram amplamente caracterizadas, o que permite sua aplicação otimizada em diferentes etapas do processo cervejeiro. Ela pode ser adicionada tanto na mosturação quanto após a fermentação, devido à sua ampla faixa de atividade relativa (70% a pH 5,0 e 85% a pH 8,0), promovendo a quebra de proteínas formadoras de turbidez (KENNEDY & PIKE, 1981). Contudo, é importante considerar que a papaína pode degradar proteínas responsáveis pela formação e estabilidade da espuma, exigindo cuidados no controle de sua dosagem e tempo de exposição (KANAUCHI & BAMFORTH, 2024). Ainda assim, por ser amplamente aceita por agências reguladoras como um aditivo seguro (GRAS), seu uso é facilitado em escala industrial. Diversos estudos também abordam estratégias para inativar ou remover a enzima após sua ação, como pasteurização ou adsorção, garantindo que as características sensoriais da cerveja sejam preservadas (FUKAL, L. & KAS, J., 1984). A papaína, portanto, permanece como uma enzima amplamente estudada e frequentemente utilizada como referência em pesquisas comparativas com outras proteases ou técnicas inovadoras como é possível avaliar na Figura 13.

O artigo “The role of active and inactivated papain in beer chillproofing” de Fukal & Kas de 1984 mostra que a enzima, quando adicionada à cerveja, hidrolisa proteínas formadoras de turbidez, aumentando a concentração de aminoácidos livres e melhorando a estabilidade coloidal, reduzindo a formação de *chill haze*. Estudos mostram que tanto a papaína ativa quanto a inativada contribuem para a estabilização da cerveja, embora por mecanismos diferentes. No entanto, doses muito elevadas de papaína podem prejudicar essa estabilidade, aumentando a turbidez. Assim, a papaína é eficaz para prevenir turbidez a frio, mas seu uso deve ser controlado para evitar efeitos adversos (FUKAL, L. & KAS, J., 1984).

Outra enzima que se destaca é a prolil endopeptidase (PEP), que se tornou uma das proteases mais pesquisadas e utilizadas na indústria cervejeira devido à sua ação única e altamente eficaz sobre proteínas ricas em prolina, particularmente as frações do glúten como as hordeínas presentes na cevada e no trigo (NÁJERA-TORRES et al., 2022). A maioria das proteases endógenas do malte ou das leveduras não é eficaz na degradação dessas regiões ricas

em prolina, o que resulta na permanência de peptídeos imunogênicos que contribuem para a formação de turbidez e podem desencadear reações adversas em indivíduos com doença celíaca ou sensibilidade ao glúten (STEPANIAK et al., 2006; KNORR, WIESER & KOEHLER, 2016).

Um dos principais fatores que impulsionam a pesquisa e o uso da PEP é a crescente demanda dos consumidores por cervejas sem ou com baixo teor de glúten. A PEP, especialmente a proveniente de *Aspergillus niger* (AN-PEP), pode hidrolisar peptídeos do glúten a níveis inferiores ao limite de 20 mg/kg estabelecido para produtos considerados “gluten-free”, permitindo a produção de cervejas seguras para celíacos sem comprometer o sabor característico das cervejas tradicionais à base de cevada (BENUCCI et al., 2020; FIEDLER et al., 2019; AKEROYD et al., 2016).

O estudo “Detection of gluten in a pilot-scale barley-based beer produced with and without a prolyl endopeptidase enzyme” de Fiedler 2019 avaliou a eficácia da PEP comercial na redução do glúten em cerveja de cevada em escala piloto, adicionando a enzima durante a brassagem. O tratamento reduziu o teor de glúten de 65 mg/kg para níveis abaixo do limite de 20 mg/kg definido pelo Codex Alimentarius e pela UE, atingindo 15 mg/kg após 10 horas. Apesar dessa redução significativa, peptídeos imunogênicos ainda foram detectados, indicando a persistência de fragmentos potencialmente problemáticos para celíacos. A qualidade sensorial e a estabilidade da espuma da cerveja tratada permaneceram comparáveis à cerveja controle, mostrando que a PEP não comprometeu a qualidade do produto (FIEDLER et al., 2019).

A versatilidade da PEP é outro fator importante para sua popularidade. Essa enzima pode ser aplicada durante a mosturação, fermentação ou até mesmo após a filtração, sendo que suas variantes termoestáveis e tolerantes ao pH permitem integração em uma ampla gama de processos cervejeiros (BENUCCI et al., 2020). A segurança alimentar e a aceitação regulatória da AN-PEP, reconhecida internacionalmente como segura para uso em alimentos, também facilitam sua adoção industrial (AKEROYD et al., 2016).

Pesquisas demonstram ainda que o uso da PEP não compromete características sensoriais importantes, como a estabilidade da espuma e a sensação na boca, o que pode ocorrer com algumas proteases de uso geral (DI GHIONNO et al., 2017). Na verdade, cervejas tratadas com PEP apresentam características de qualidade comparáveis ou até superiores, com efeitos mínimos sobre a retenção da espuma e o sabor, quando comparadas às cervejas sem glúten produzidas com grãos alternativos (KNORR, WIESER & KOEHLER, 2016). Inovações recentes incluem a imobilização enzimática e a produção recombinante da PEP, o que aumenta ainda mais a eficiência do processo e reduz os custos (BENUCCI et al., 2020; COLGRAVE et al., 2017).

Por fim, outro destaque no pódio das proteases mais pesquisadas é a tripsina uma endopeptidase da classe das serino proteases, cuja bioquímica e especificidade de substrato estão bem caracterizadas. Ela atua especificamente clivando ligações peptídicas no lado carboxílico dos resíduos de lisina e arginina. Essa especificidade é especialmente relevante no contexto da cervejaria, uma vez que proteínas da cevada e da levedura, bem como proteínas causadoras de turbidez e inibidores, frequentemente contêm esses resíduos em sua estrutura. Assim, a ação proteolítica da tripsina é previsível e controlável tanto em pesquisas quanto em aplicações industriais (NÁJERA-TORRES et al., 2022; SHEWRY, 1993; OUTTRUP et al., 1987).

Além disso, a tripsina é amplamente utilizada como enzima de referência em estudos de ciência de proteínas, incluindo a proteômica cervejeira e o controle de qualidade do malte. Seu padrão de clivagem está bem documentado, tornando-a o “padrão ouro” para estudos proteômicos e análises do conteúdo de proteínas e peptídeos no malte e na cerveja final (NÁJERA-TORRES et al., 2022). Do ponto de vista prático, a tripsina possui ação relevante sobre frações proteicas envolvidas na formação de turbidez, como hordeínas, proteínas de transferência de lipídios (LTPs) e inibidores de tripsina/α-amilase. Sua adição ao processo cervejeiro pode auxiliar na degradação ou modificação dessas proteínas, reduzindo a formação de turbidez fria ou permanente na cerveja — um dos principais desafios na busca por estabilidade e vida de prateleira prolongada (CARBONERO & GARCÍA-OLMEDO, 1999).

A tripsina também é empregada em combinação com outras proteases, como papaína, quimotripsina ou enzimas microbianas, permitindo avaliações de sinergias ou diferenças nos padrões de hidrólise proteica. Isso favorece a otimização de processos visando a liberação de nitrogênio assimilável (FAN), o controle de turbidez e o ajuste sensorial (OUTTRUP et al., 1987; Scriban & Stienne, 1970). Fora do contexto cervejeiro, a tripsina é amplamente utilizada na preparação de hidrolisados proteicos para estudos nutricionais e de alergenicidade. Seu status GRAS (Generally Recognized As Safe), bem como a disponibilidade a partir de fontes bovinas e microbianas, tornam-na uma enzima padrão confiável na indústria alimentícia. Ainda, sua atividade e a presença de inibidores de tripsina são consideradas marcadores importantes da qualidade do malte e da cevada, oferecendo insights sobre variações entre lotes e auxiliando no controle de qualidade (SHEWRY, 1993). Ensaios enzimáticos baseados na atividade da tripsina são de fácil execução e alta sensibilidade, possibilitando o monitoramento prático e preciso dos eventos proteolíticos desde a matéria-prima até a cerveja final (SCRIBAN & STIENNE, 1970).

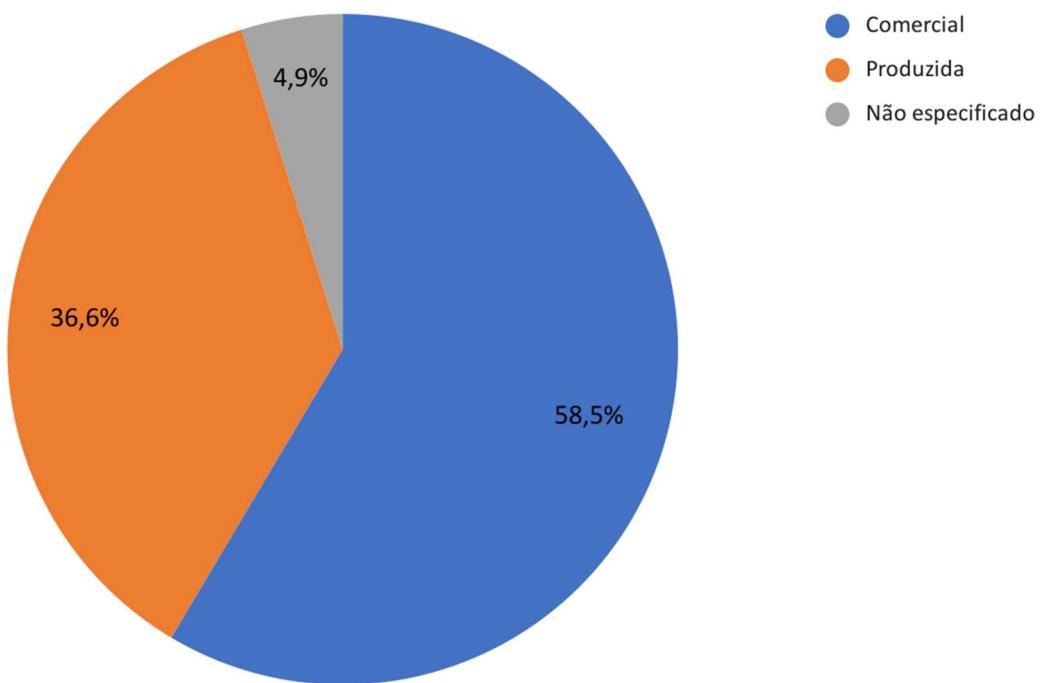
Sobre a tripsina o estudo “Papain, chymotrypsin and related proteins—a comparative study of their beer chill-proofing abilities and characteristics” avaliou o efeito da adição de

enzimas proteolíticas, como tripsina e quimotripsina, na redução da turbidez a frio (*chill-haze*) na cerveja. Embora ambos reduzissem a turbidez, a quimotripsina ativa foi significativamente mais eficaz, demonstrando que a ação proteolítica é o principal fator para prevenir o *chill-haze*, embora formas não ativas também contribuam parcialmente. Assim, a ativação enzimática via tripsina melhora a claridade da cerveja ao degradar proteínas formadoras de turbidez, superando a simples adição de proteínas inativas (KENNEDY, 1980).

Com um histórico regulatório positivo e ampla aceitação para uso em alimentos, a tripsina é empregada há décadas sem apresentar riscos significativos à segurança. Essa aceitação facilita sua utilização tanto em pesquisas quanto em processos industriais nas áreas de biotecnologia e produção de cerveja. Ademais, o uso da tripsina tem contribuído para avanços na caracterização de proteínas formadoras de turbidez na cevada, como aquelas da classe BTI-CMe, e na elucidação de famílias de serpinas e inibidores, influenciando programas de melhoramento genético da cevada e inovações no processo cervejeiro (CARBONERO & GARCÍA-OLMEDO, 1999).

As proteases disponíveis comercialmente são produzidas sob rigorosos protocolos de controle de qualidade, garantindo consistência na atividade enzimática, pureza e estabilidade entre diferentes lotes (LEI et al., 2013; PHAM et al., 2024). Essa padronização é especialmente crítica no contexto cervejeiro, onde pequenas variações nas características da enzima podem gerar resultados imprevisíveis que afetam a fermentação, o sabor, a estabilidade coloidal e a segurança do produto final (NÁJERA-TORRES et al., 2022; LIN et al., 2022). Em muitos casos, os estudos não especificam quais proteases foram utilizadas, sendo recorrente o uso de enzimas endógenas oriundas da cevada ou produzidas por microrganismos naturalmente presentes na cadeia produtiva da cerveja. Além disso, uma parcela significativa da pesquisa industrial tem sido conduzida com misturas enzimáticas comerciais, fornecidas por empresas líderes no setor biotecnológico, como Novozymes®, DSM-Firmenich®, DuPont™ (agora parte da IFF), Amano Enzyme® e Sigma-Aldrich, que desenvolvem soluções específicas para a indústria cervejeira (LEI et al., 2013; PHAM et al., 2024). A Figura 14 mostra que quase 60% das enzimas utilizadas nos estudos relacionados ao uso de proteases no processo cervejeiro são de origem comercial.

Figura 14 – Percentual de artigos que utilizaram os diferentes métodos utilizados para obtenção das proteases utilizadas nos artigos selecionados na base SCOPUS sobre uso na produção de cerveja



Fonte: elaboração própria

Dentre os artigos selecionados em que as proteases foram identificadas como a principal enzima de interesse, observou-se que sete deles abordavam especificamente proteases endógenas. Essas enzimas, naturalmente produzidas pelas leveduras ou pela cevada durante a maltação e a fermentação, desempenham papéis essenciais na hidrólise de proteínas ao longo do processo cervejeiro.

As enzimas adquiridas de fornecedores especializados apresentam elevado grau de pureza e são bem caracterizadas quanto às atividades secundárias, especificidade de substrato e condições operacionais ideais (LIN et al., 2022; LEI et al., 2013; BENUCCI et al., 2020). Em contraste, a produção de enzimas endógenas — especialmente em escala de cervejaria — apresenta riscos associados à contaminação por subprodutos microbianos indesejáveis, geração de off-flavors e variação no conteúdo proteico, o que pode comprometer significativamente a qualidade ou a aceitação comercial da cerveja (PHAM et al., 2024; ALVES et al., 2024).

Outro fator relevante é o cumprimento das normas regulatórias e de segurança alimentar. Os fornecedores de enzimas comerciais seguem padrões internacionais, como GRAS, EFSA e FDA, e disponibilizam documentação completa, incluindo certificados de análise, declarações de alérgenos e rastreabilidade, o que facilita o cumprimento de exigências

legais — especialmente em cadeias globais de fornecimento e em processos de exportação (BENUCCI et al., 2020; AKEROYD et al., 2016). Enzimas produzidas artesanalmente, por outro lado, podem representar riscos desconhecidos relacionados a alergenicidade, toxicidade ou contaminação.

Do ponto de vista econômico e prático, fabricantes de grande escala conseguem diluir custos e oferecer enzimas a preços mais acessíveis, tornando mais viável para cervejarias, especialmente pequenas e médias, adquirir quantidades conforme a demanda do que investir em infraestrutura própria de fermentação, purificação e controle de qualidade (ALVES et al., 2024; LEI et al., 2013). A produção interna rotineira exigiria alto investimento em equipamentos, expertise técnica e validação constante.

Enzimas comerciais também vêm acompanhadas de fichas técnicas que detalham parâmetros como pH e temperatura ótimos, dosagens recomendadas e instruções de manuseio — informações baseadas em P&D e testes em ambiente cervejeiro real (LEI et al., 2013; PHAM et al., 2024; LIN et al., 2022). Isso proporciona maior confiança aos cervejeiros na aplicação das enzimas e na otimização controlada dos processos.

Em se tratando do uso de enzimas comerciais, o artigo “*Effects on beer colloidal stability of full-scale brewing with adjuncts, enzymes, and finings*” de Królak 2023 avaliou o uso de enzimas comerciais na produção industrial de cervejas lager, destacando proteases (como Brewlyve™ NP 900 e Brewers Clarex®) e β-glucanases (Filtrase®). A adição dessas enzimas melhorou significativamente a estabilidade coloidal e aumentou a vida útil física das cervejas, especialmente em formulações com adjuntos de milho ou cevada não maltada, prolongando a durabilidade em até 30%. Além disso, as enzimas permitiram maior flexibilidade no uso de matérias-primas, mantendo ou melhorando a qualidade do produto, com proteases fornecendo nitrogênio livre para a levedura e β-glucanases reduzindo a viscosidade do mosto para facilitar o processo. A suplementação enzimática mostrou-se uma estratégia eficaz para otimizar a eficiência do processo e garantir a consistência da cerveja. (KRÓLAK, 2023).

No âmbito da pesquisa científica, a utilização de enzimas comerciais padronizadas é essencial para a reproduzibilidade de experimentos e comparações entre diferentes laboratórios. O uso de um padrão bem caracterizado e amplamente disponível é crucial para o avanço significativo da ciência (NÁJERA-TORRES et al., 2022; LIN et al., 2022; BENUCCI et al., 2020).

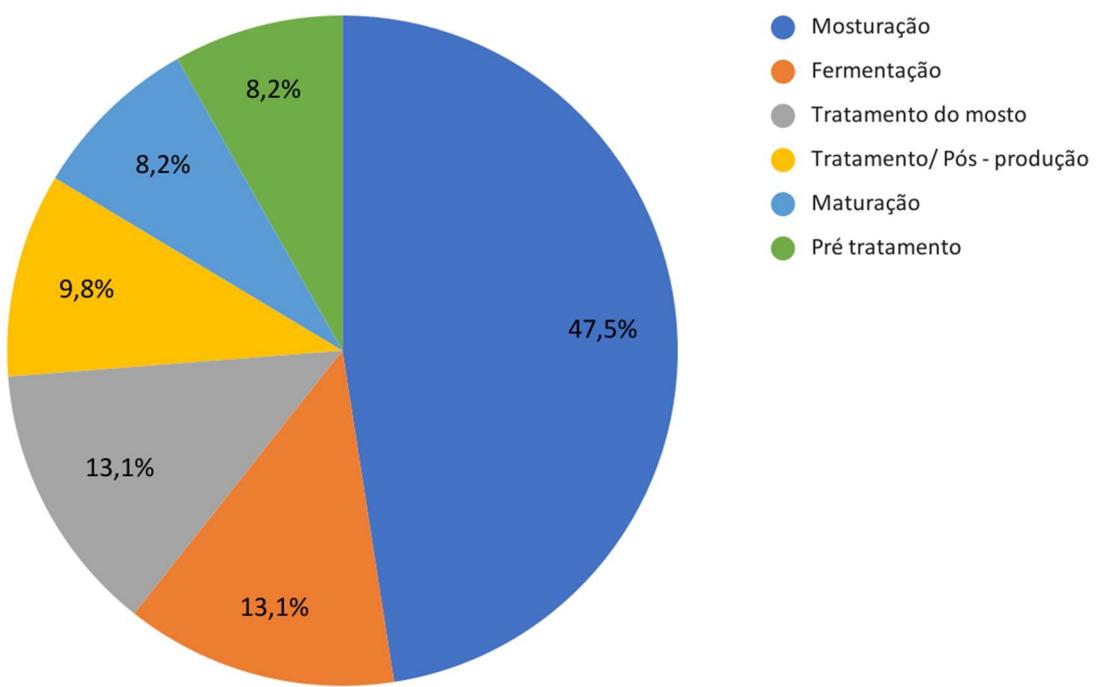
Por fim, adquirir enzimas prontas para uso economiza tempo valioso. A extração, purificação e caracterização de novas enzimas são processos demorados, enquanto as enzimas comerciais aceleram tanto os ciclos de produção cervejeira quanto o cronograma de pesquisas,

permitindo que mestres-cervejeiros e cientistas concentrem esforços na otimização de processos, no desenvolvimento de receitas ou na validação de hipóteses (LEI et al., 2013; PHAM et al., 2024).

A etapa de mosturação (mashing) oferece as condições físicas e químicas ideais para a atividade proteolítica, incluindo temperaturas adequadas — geralmente entre 45 e 55 °C durante o "descanso proteico" e até 72 °C na sacarificação —, pH favorável entre 5,0 e 6,0, além de ampla disponibilidade de substratos, como proteínas do malte de cevada e adjuntos. Esses fatores criam um ambiente propício tanto para as proteases endógenas quanto para as adicionadas exogenamente atuarem com eficiência (JONES; MARINAC, 2001; LEI et al., 2013; NÁJERA-TORRES et al., 2022; LIN et al., 2022). Em etapas posteriores, especialmente após a fervura do mosto, as temperaturas elevadas e o pH mais baixo resultam na desnaturação ou inativação da maioria das proteases (JONES; MARINAC, 2001).

As proteases podem ser aplicadas em diferentes etapas da produção da cerveja, como mostra a Figura 15. Durante a mosturação, as proteases hidrolisam as proteínas de reserva presentes no malte e nos adjuntos, liberando peptídeos solúveis e FAN, nutrientes essenciais para o crescimento das leveduras e para o desempenho fermentativo (LEI et al., 2013; LIN et al., 2022; MURMANN et al., 2015). A disponibilidade adequada de FAN impacta diretamente na taxa de fermentação, rendimento alcoólico e desenvolvimento de aromas. Por outro lado, nas etapas seguintes, como a fermentação, não há essa ligação direta com a nutrição da levedura, tornando a adição de proteases menos eficaz ou até mesmo desnecessária (LIN et al., 2022; PHAM et al., 2024).

Figura 15 – Percentual de artigos que aplicaram as proteases nas diferentes fases do processo de fabricação da cerveja nos estudos selecionados na base SCOPUS.



Fonte: elaboração própria

Além de seu papel nutricional, a ação das proteases na mosturação é crucial para a solubilização de proteínas que influenciam na claridade da cerveja, na estabilidade coloidal e na formação de espuma. Nesse estágio, enzimas são aplicadas para degradar proteínas formadoras de turbidez e peptídeos propensos à agregação, prevenindo problemas como “chill haze” e “gushing” na cerveja final (JONES; MARINAC, 2001; LUND et al., 2014; BENUCCI et al., 2020). A aplicação de proteases após a fervura seria muito menos eficaz, uma vez que grande parte das proteínas já se encontra desnaturada ou agregada.

Sobre o uso de proteases durante a mosturação, o artigo “*Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast*” de Lei et al. (2013) avaliou a adição de proteases comerciais (Neutralse, Flavorzyme e Protamex), compradas de empresas de enzimas como Novozymes® e Sigma - Aldrich®, no início da brassagem do mosto, destacando melhorias significativas no rendimento de extrato e nos níveis de nitrogênio livre (FAN), especialmente com Neutralse e Protamex. Essas enzimas também promoveram aumento na fermentabilidade, na produção de etanol e nos compostos voláteis responsáveis pelo sabor, principalmente em condições de alta gravidade. A melhora no

desempenho fermentativo foi atribuída ao aumento da disponibilidade de aminoácidos livres e à assimilação mais eficiente pela levedura sob condições de estresse, demonstrando que a suplementação com proteases durante a brassagem otimiza tanto a fermentação quanto a qualidade sensorial da cerveja (LEI et al., 2013).

A mosturação é, portanto, a etapa naturalmente compatível com a ação enzimática. Após essa fase, o processo passa a ser mais severo, especialmente durante a fervura, em que o calor elevado causa desnaturação irreversível das proteínas e inativação das enzimas (JONES; MARINAC, 2001; LEI et al., 2013). Já na fermentação, a introdução de proteases pode gerar efeitos imprevisíveis sobre o sabor, a turbidez e a saúde da levedura. Dessa forma justificando a grande maioria de artigos utilizando proteases durante a etapa de mosturação como mostra a Figura 12.

Do ponto de vista sensorial e do controle de qualidade, o uso de proteases em estágios avançados, como fermentação ou acabamento, pode levar à hidrólise excessiva de proteínas positivas para a formação de espuma, comprometendo a textura, o corpo e a retenção de colarinho da cerveja (LUND et al., 2014; BENUCCI et al., 2020). A atuação proteolítica durante a mosturação permite aos cervejeiros modular o equilíbrio entre frações proteicas desejáveis e indesejáveis antes que essas proteínas sejam irreversivelmente modificadas ou removidas, proporcionando melhor controle sobre a qualidade final do produto.

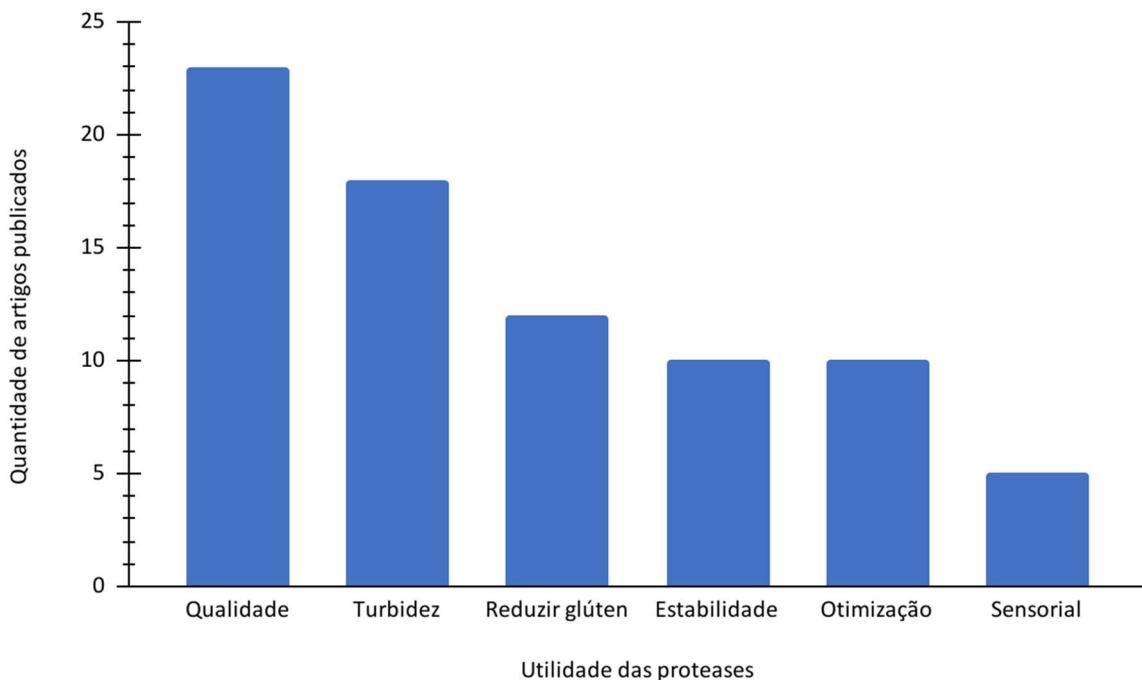
Essa prática é respaldada por décadas de otimização técnica e encontra-se consolidada em protocolos industriais e formulações padronizadas (LEI et al., 2013; PHAM et al., 2024; BENUCCI et al., 2020). Essa padronização também torna a etapa mais propícia à pesquisa de melhorias de processo e ao desenvolvimento tecnológico.

Cervejarias comerciais frequentemente suplementam o mosto com proteases exógenas, sobretudo quando utilizam maltes pouco modificados ou quando adotam técnicas de alta gravidade que diluem o FAN disponível (LEI et al., 2013; PHAM et al., 2024). Essas enzimas são especificamente projetadas para atuar sob as condições da mosturação e são rapidamente inativadas durante a fervura, garantindo a ausência de atividade residual no produto.

A adição de proteases à cerveja melhora a saúde da levedura, acelera a fermentação, aumenta a produção de etanol e aprimora a fermentabilidade do mosto, especialmente em brassagens de alta gravidade. Além disso, reduzem a turbidez da cerveja, degradando proteínas instáveis que causam a formação de haze durante o armazenamento frio, melhorando a clareza e a estabilidade visual do produto final. Elas também possibilitam a produção de cervejas com teor reduzido de glúten, ampliando o mercado para consumidores com intolerância.

Além desses benefícios, as proteases favorecem a formação de compostos aromáticos e de sabor, atuando como precursores para álcoois superiores e ésteres que enriquecem a complexidade sensorial da cerveja. Também permitem maior flexibilidade no uso de ingredientes, compensando a menor proteína de adjuntos como milho e grãos não maltados, o que torna o processo mais eficiente e econômico. Outros efeitos positivos incluem a estabilização da espuma e o aumento do potencial antioxidante da cerveja, contribuindo para sua qualidade e vida útil. Todos os principais efeitos mapeados podem ser observados abaixo na Figura 16.

Figura 16 – Motivação para estudo de proteases na indústria da cerveja por artigos selecionados na base SCOPUS



Fonte: elaboração própria

A prevenção ou controle da turbidez proteica, especialmente o “chill haze” comum em cervejas claras do tipo lager, representa a segunda motivação mais frequente para o uso de proteases. Essas enzimas atuam sobre proteínas propensas à formação de turbidez, como as hordeínas ricas em prolina, durante a mosturação, reduzindo significativamente a possibilidade de turvação visível após o envase (JONES; MARINAC, 2001; LUND et al., 2014; BENUCCI et al., 2020). A claridade é um critério de qualidade crucial para a maioria dos estilos comerciais populares, sendo que a presença de turbidez, quando não intencional (como nas hazy IPAs), é frequentemente percebida pelo consumidor como defeito (JONES; MARINAC, 2001; LUND et al., 2014). Além disso, o controle da turbidez via proteases é especialmente relevante para

cervejas engarrafadas, pasteurizadas ou destinadas à exportação, que exigem maior estabilidade de prateleira (BENUCCI et al., 2020).

Um artigo que trata sobre a turbidez é “A study of the beer chill-proofing behaviour of a water-insoluble papain conjugate of hydrous titanium (IV) oxide” de Kennedy et al. 1980 que investiga métodos para prevenir a formação de turbidez a frio (chill-haze) na cerveja. Os autores descobriram que tanto o óxido de titânio (IV) hidratado quanto os conjugados de papaína insolúveis em água foram eficazes na redução dessa turbidez. O mecanismo atribuído envolve a adsorção e/ou degradação enzimática das proteínas formadoras de turbidez, que de outro modo interagiriam com polifenóis para formar complexos insolúveis em temperaturas baixas (refrigeradas). Além disso, o estudo demonstra que o tratamento com papaína, tanto na forma livre quanto imobilizada, bem como com óxido de titânio (IV) hidratado, pode reduzir significativamente a turbidez a frio, melhorando a estabilidade visual da cerveja durante o armazenamento refrigerado (KENNEDY et al. 1980).

Outra aplicação crescente das proteases está na redução do glúten. Enzimas proteolíticas específicas, como a prolil endopeptidase, vêm sendo empregadas para degradar peptídeos derivados do glúten, possibilitando a produção de cervejas com baixo teor de glúten ou sem glúten, voltadas a consumidores com doença celíaca ou sensibilidade ao glúten. Embora essa aplicação não seja tão amplamente disseminada quanto aquelas voltadas à qualidade ou à claridade, ela é bastante relevante em regiões com alta demanda por produtos sem glúten (BENUCCI et al., 2020; FIEDLER et al., 2019). Como a maioria das proteínas do malte é resistente à proteólise convencional, são necessárias enzimas especializadas, o que posiciona essa aplicação como uma prioridade intermediária, entre os usos mais frequentes e os mais nichados (AKEROYD et al., 2016; STEPANIAK et al., 2006).

A adição de proteases também pode ser útil na otimização dos ciclos de produção, cronogramas de filtração e na mitigação de instabilidades coloidais, problemas de espuma ou dificuldades operacionais durante a filtração. Entre os benefícios operacionais estão a maior eficiência na extração de tióis, a melhoria nos ciclos de filtração e a redução do risco de "gushing", ou seja, formação excessiva de espuma (MURMANN et al., 2015; LEI et al., 2013). Além disso, as proteases podem contribuir para o potencial antioxidante da cerveja, ao aumentar a solubilidade de peptídeos contendo grupos tióis, o que tem implicações positivas na estabilidade do sabor e na longevidade do produto (LUND et al., 2014; MURMANN et al., 2015).

Por fim, embora menos frequente, o uso de proteases com foco direto na modulação sensorial da cerveja também é possível. A liberação de aminoácidos pode influenciar a

formação de compostos voláteis como álcoois superiores e ésteres, afetando indiretamente o aroma e o sabor da bebida. No entanto, esses efeitos sensoriais são geralmente mais sutis, variáveis e difíceis de controlar com precisão, diferentemente de parâmetros como turbidez ou rendimento (LIN et al., 2022; BENUCCI et al., 2020). Além disso, o uso excessivo de proteases pode prejudicar características como corpo, textura e retenção de espuma, além de introduzir sabores indesejados (LUND et al., 2014). Por esses motivos, a aplicação das proteases com objetivo sensorial direto é menos comum que seu uso para aprimorar a fermentação, claridade ou adequação a públicos com restrições alimentares.

Em resumo, a ordem de uso das proteases na produção cervejeira reflete tanto as necessidades fundamentais da fabricação—como garantir uma fermentação eficiente, um produto visualmente atrativo e seguro para consumo—quanto a viabilidade técnica e regulatória para atingir esses objetivos. Assim, os usos mais frequentes seguem a seguinte hierarquia: melhoria da qualidade (nutrição da levedura e desempenho do processo), controle de turbidez (estabilidade coloidal e aparência), redução do glúten (atendimento a nichos específicos), otimização do processo (filtração e estabilidade), e por fim, ajustes sensoriais (sabor, aroma, corpo).

6 CONCLUSÕES

Este trabalho apresentou um mapeamento tecnológico detalhado sobre a produção e aplicação de proteases por leveduras na indústria cervejeira, evidenciando seu papel estratégico em diversas etapas do processo produtivo. As proteases demonstraram ser ferramentas fundamentais para a otimização do desempenho fermentativo, estabilidade sensorial e fisico-química da cerveja, além de viabilizarem inovações como a produção de cervejas com baixo teor de glúten. Através da análise bibliométrica e do método *InOrdinatio*, foi possível identificar tendências, enzimas mais utilizadas e as etapas do processo onde sua aplicação é mais eficaz, com destaque para a mosturação como fase-chave para o uso enzimático.

O estudo também revelou a evolução da pesquisa sobre o tema ao longo das últimas décadas, com destaque para enzimas como papaína, prolil endopeptidase e tripsina, que ocupam papéis centrais tanto em aplicações industriais quanto em análises científicas. A comparação entre enzimas comerciais e a produção endógena evidenciou a importância da padronização, segurança e reproduzibilidade oferecida por fornecedores especializados, aspectos fundamentais para atender às exigências da indústria e das regulamentações internacionais.

A análise dos dez artigos mais relevantes, segundo o método *InOrdinatio* também reforça três principais aplicações das proteases: a produção de cervejas sem glúten, a melhora da fermentação via aumento de FAN e o controle da estabilidade da espuma. Esses temas destacam o papel central das proteases no equilíbrio entre qualidade sensorial e desempenho do processo, além de evidenciar a diversidade de enzimas utilizadas.

Por fim, conclui-se que a aplicação de proteases no setor cervejeiro não apenas responde a demandas por eficiência e qualidade, como também impulsiona a inovação no desenvolvimento de novos produtos, estilos e soluções tecnológicas. Este trabalho contribui, assim, para consolidar o conhecimento sobre a biotecnologia enzimática na produção de cerveja e oferece subsídios valiosos para pesquisadores, cervejeiros e indústrias interessados em explorar o potencial das proteases no contexto da engenharia de bioprocessos.

7 REFERÊNCIAS

- SCHERF, Katharina Anne; WIESER, Herbert; KOEHLER, Peter. Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Research International*, v. 110, p. 62–72, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996916305609>.
- PICARIELLO, Giuseppe; MAMONE, Gianluca; CUTIGNANO, Alessandra; FONTANA, Angelo; ZURLO, Loredana; ADDEO, Francesco; FERRANTI, Pasquale. *Proteomics, peptidomics, and immunogenic potential of wheat beer (Weissbier)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 13, p. 3579–3586, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00631>.
- COOPER, D. J.; STEWART, G. G.; BRYCE, J. H. Yeast proteolytic activity during high and low gravity wort fermentations and its effect on head retention. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 106, n. 4, p. 197–202, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2000.tb00057.x>.
- PHIARAIS, B. P. N.; WIJNGAARD, H. H.; ARENDT, E. K. *The impact of kilning on enzymatic activity of buckwheat malt*. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 111, n. 3, p. 290–298, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00685.x>.
- HEJGAARD, J. Origin of a dominant beer protein immunochemical identity with a β -amylase-associated protein from barley. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 83, n. 2, p. 94–96, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1977.tb06422.x>.
- OSMAN, A. M. et al. Characterisation and assessment of the role of barley malt endoproteases during malting and mashing. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 108, n. 1, p. 62–67, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00125.x>.
- LEKKAS, C. et al. The role of small wort peptides in brewing fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 115, n. 2, p. 134–139, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00358.x>.
- GREENWOOD, C. T.; MACGREGOR, A. W. The isolation of α -amylase from barley and malted barley, and a study of the properties and action-patterns of the enzymes. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 71, n. 5, p. 405–417, 1965. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1965.tb06366.x>.
- ROBINSON, L. H. et al. The identification of a barley haze active protein that influences beer haze stability: Cloning and characterisation of the barley SE protein as a barley trypsin inhibitor of the chloroform/methanol type. *Journal of Cereal Science*, v. 45, n. 3, p. 343–352, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.08.012>.
- JONES, B. L.; MARINAC, L. The effect of mashing on malt endoproteolytic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 4, p. 858–864, 2002. DOI: 10.1021/jf0109672.
- KNORR, V.; WIESER, H.; KOEHLER, P. Production of gluten-free beer by peptidase treatment. *European Food Research and Technology*, v. 242, p. 1129–1140, 2016. DOI: 10.1007/s00217-015-2617-5.
- IIMURE, Takashi; SATO, Kazuhiro. Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. *Food Research International*, Oxford, v. 54, n. 1, p. 1-8, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.028>

- GLATTHAR, J.; HEINISCH, J. J.; SENN, T. Unmalted triticale cultivars as brewing adjuncts: effects of enzyme activities and composition on beer wort quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 85, n. 4, p. 647–654, 2005. DOI: 10.1002/jsfa.1941.
- JONES, B. L.; MARINAC, L. A. Purification, identification, and partial characterization of a barley protein that inhibits green malt endoproteinases. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 55, n. 2, p. 58–64, 1997. DOI: 10.1094/asbcj-55-0058
- KERR, Edward D.; CABOCHE, Christopher H.; SCHULZ, Benjamin L. Posttranslational modifications drive protein stability to control the dynamic beer brewing proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 18, n. 9, p. 1721–1731, 2019. DOI: 10.1074/mcp.RA119.001526
- PIDDOCKE, M. P.; FAZIO, A.; VONGSANGNAK, W.; WONG, M. L.; HELDT-HANSEN, H. P.; WORKMAN, C.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Revealing the beneficial effect of protease supplementation to high gravity beer fermentations using “-omics” techniques. *Microbial Cell Factories*, London, v. 10, p. 27, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-27>
- BENUCCI, Ilaria; CASO, Maria Chiara; BAVARO, Teodora; MASCI, Stefania; KERŠIENĖ, Milda; ESTI, Marco. Prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* immobilized on a food-grade carrier for the production of gluten-reduced beer. *Food Control*, v. 110, 2020, p. 106987. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106987.
- PANDA, R. et al. Effects of a proline endopeptidase on the detection and quantitation of gluten by antibody-based methods during the fermentation of a model sorghum beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 48, p. 10525–10535, 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04205.
- LEI, Hongjie; ZHAO, Haifeng; ZHAO, Mouming. Proteases supplementation to high gravity worts enhances fermentation performance of brewer's yeast. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 77, p. 1-6, Apr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.016>
- TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Screening of lactic-acid bacteria from South African barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. *Folia Microbiologica*, v. 49, n. 4, p. 406–410, 2004. DOI: 10.1007/bf02931601.
- SEVERINI, Carla; AZZOLLINI, Domenico; JOUPPILA, Kirsi; LOPONEN, Jussi; DEROSSE, Antonio; DE PILLI, Teresa. Effect of enzymatic and technological treatments on solubilisation of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*, v. 65, p. 162–166, 2015. DOI: 10.1016/j.jcs.2015.07.006.
- AKEROYD, M. et al. AN-PEP, proline-specific endopeptidase, degrades all known immunostimulatory gluten peptides in beer made from barley malt. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 74, n. 2, p. 91–99, 2016. DOI: 10.1094/ASBCJ-2016-2300-01.
- SHETTY, Radhakrishna et al. Discovery, cloning and characterisation of proline specific prolyl endopeptidase, a gluten degrading thermo-stable enzyme from *Sphaerotilus thermophiles*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 107, p. 57–63, 2017. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2017.08.002
- OLIVEIRA, P. M.; WATERS, D. M.; ARENDT, E. K. The impact of Fusarium culmorum infection on the protein fractions of raw barley and malted grains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 5, p. 2053–2065, 2013. DOI: 10.1007/s00253-013-4696-1.
- FIEDLER, K. L.; PANDA, R.; CROLEY, T. R. Analysis of gluten in a wheat-gluten-incurred sorghum beer brewed in the presence of proline endopeptidase by

- LC/MS/MS. *Analytical Chemistry*, v. 90, n. 3, p. 2111–2118, 2018. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04371.
- MORENO AMADOR, M. de L.; ARÉVALO-RODRÍGUEZ, M.; DURÁN, E. M.; MARTÍNEZ REYES, J. C.; SOUSA MARTÍN, C. A new microbial gluten-degrading prolyl endopeptidase: potential application in celiac disease to reduce gluten immunogenic peptides. *PLOS ONE*, v. 14, n. 6, e0218346, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0218346.
 - JONES, B. L.; BUDDE, A. D. Effect of reducing and oxidizing agents and pH on malt endoproteolytic activities and brewing mashes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 25, p. 7504–7512, 2003. DOI: 10.1021/jf030206u.
 - BERNER, T. S.; JACOBSEN, S.; ARNEBORG, N. The impact of different ale brewer's yeast strains on the proteome of immature beer. *BMC Microbiology*, v. 13, p. 215, 2013. DOI: 10.1186/1471-2180-13-215.
 - KERPES, Roland; KNORR, Verena; PROCOPIO, Susanne; KOEHLER, Peter; BECKER, Thomas. Gluten-specific peptidase activity of barley as affected by germination and its impact on gluten degradation. *Journal of Cereal Science*, v. 68, p. 93–99, 2016. DOI: 10.1016/j.jcs.2016.01.004.
 - KENNEDY, J. F.; PIKE, V. W. Papain, chymotrypsin and related proteins—a comparative study of their beer chill-proofing abilities and characteristics. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 3, n. 1, p. 59–63, 1981. DOI: 10.1016/0141-0229(81)90037-5.
 - MIKOLA, J.; PIETILÄ, K.; ENARI, T.-M. Inactivation of malt peptidases during mashing. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 78, n. 5, p. 384–388, 1972. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1972.tb03465.x.
 - FIEDLER, K. L. et al. Detection of gluten in a pilot-scale barley-based beer produced with and without a prolyl endopeptidase enzyme. *Food Additives & Contaminants: Part A*, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1080/19440049.2019.1616830.
 - LI, X. et al. Characterization of barley serpin Z7 that plays multiple roles in malt and beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 24, p. 5643–5650, 2014. DOI: 10.1021/jf405699z.
 - EVANS, D. E.; FINN, J. E. C.; ROBINSON, L. H.; EGLINTON, J. K.; SHEEHY, M.; STEWART, D. C. The effects of hop- α -acids and proline-specific endoprotease (PSEP) treatments on the foam quality of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 117, n. 3, p. 335–342, 2011. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00477.x.
 - SPECKER, C.; NIJESSEN, L.; VOGEL, R. F. In vitro studies on the main beer protein Z4 of *Hordeum vulgare* concerning heat stability, protease inhibition and gushing. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 120, n. 2, p. 85–92, 2014. DOI: 10.1002/jib.118.
 - DLAMINI, B. C.; BUYS, E. M.; TAYLOR, J. R. Effect of sorghum type and malting on production of free amino nitrogen in conjunction with exogenous protease enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, n. 2, p. 417–422, 2014. DOI: 10.1002/jsfa.6739.
 - STOUPIS, T.; STEWART, G. G.; STAFFORD, R. A. Hydrodynamic shear damage of brewer's yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 61, n. 4, p. 219–225, 2003. DOI: 10.1094/asbcj-61-0219.
 - SENSIDONI, M.; MARCONI, O.; PERRETTI, G.; FREEMAN, G.; FANTOZZI, P. Monitoring of beer filtration using photon correlation spectroscopy (PCS). *Journal of the Institute of Brewing*, v. 117, n. 4, p. 639–646, 2011. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00516.x.
 - VAN, V. M. L.; STREHAIANO, P.; NGUYEN, D. L.; TAILLANDIER, P. Microbial protease or yeast extract—alternative additions for improvement of fermentation

- performance and quality of beer brewed with a high rice content. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 59, n. 1, p. 10–16, 2001. DOI: 10.1094/asbcj-59-0010.
- MONSAN, P.; DUTEURTRE, B.; MOLL, M.; DURAND, G. Use of papain immobilized on spherasil for beer chillproofing. *Journal of Food Science*, v. 43, n. 2, p. 424–427, 1978. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1978.tb02320.x.
 - JIN, F.; TODA, K. Preparation of immobilized papain covalently bound on natural cellulose for treatment of beer. *Biotechnology Letters*, v. 10, n. 3, p. 221–223, 1988. DOI: 10.1007/bf01134834.
 - JIN, Y.; DU, J.; ZHANG, K.; GUO, M. Relationships between the index of protein modification (Kolbach index) and hydrolytic enzyme production in a wheat malt. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 120, n. 3, p. 201–206, 2014. DOI: 10.1002/jib.136.
 - MIKOLA, J.; PIETILÄ, K.; ENARI, T.-M. Activities of various peptidases in barley, green malt and malt. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 78, n. 5, p. 388–391, 1972. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1972.tb03466.x.
 - LUND, M. N.; LAMETSCH, R.; SØRENSEN, M. B. Increased protein-thiol solubilization in sweet wort by addition of proteases during mashing. *Journal of the Institute of Brewing*, 2014. DOI: 10.1002/jib.155.
 - SCHNITZENBAUMER, B.; KARL, C. A.; ARENDT, E. K. A comparison of white Nigerian and red Italian sorghum (*Sorghum bicolor*) as brewing adjuncts based on optimized enzyme additions. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 71, n. 4, p. 248–257, 2013. DOI: 10.1094/asbcj-2013-1011-01.
 - STOUPIS, T.; STEWART, G. G.; STAFFORD, R. A. Mechanical agitation and rheological considerations of ale yeast slurry. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 60, n. 2, p. 58–62, 2002. DOI: 10.1094/ASBCJ-60-0058.
 - DESOBGO, Z. S. C.; NSO, E. J.; TENIN, D.; KAYEM, G. J. Modelling and optimizing of mashing enzymes - effect on yield of filtrate of unmalted sorghum by use of response surface methodology. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 116, n. 1, p. 62–69, 2010. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00399.x.
 - FUKAL, L.; KÁŠ, J.; RAUCH, P. Inactivation of papain proteolytic activity in the presence of ascorbic acid and Cu⁺⁺ ions. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 90, n. 2, p. 73–76, 1984. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1984.tb04240.x.
 - HÜBNER, F.; SCHEHL, B. D.; THIELE, F.; ARENDT, E. K. Investigation of the malting behavior of oats for brewing purposes. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 67, n. 4, p. 235–241, 2009. DOI: 10.1094/asbcj-2009-0929-01.
 - TAYLOR, J. P.; JACOB, F.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Reduction of hordein content in beer by applying prolyl endoprotease to the malting process. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 75, n. 3, p. 262–268, 2017. DOI: 10.1094/ASBCJ-2017-3072-01.
 - NELSON, G.; YOUNG, T. W. The addition of proteases to the fermenter to control chill-haze formation. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 93, n. 2, p. 116–120, 1987. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1987.tb04487.x.
 - SCRIBAN, R.; STIENNE, M. Detection and quantitative determination of papain in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 76, n. 3, p. 243–244, 1970. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1970.tb03289.x.
 - NOGUEIRA, Wesclen Vilar; REMEDI, Rafael Dias; MARIMÓN-SIBAJA, Karen Vanessa; GONÇALVES, Keven David Moreira; CERQUEIRA, Maristela Barnes Rodrigues; GARDA-BUFFON, Jaqueline. Trichothecenes and enzyme activities in the

- mashing step of the brewing process. *Food Research International*, v. 157, p. 111317, 2022. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111317.
- RAUCH, P.; FUKAL, L.; STREJČEK, F.; KÁŠ, J. Radioimmunoassay of papain in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 90, n. 5, p. 303–305, 1984. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1984.tb04279.x.
 - KERPES, R.; GÖLLER, F.; KOLLMANNSSBERGER, H. et al. Aroma profile of a gluten-free barley malt beer crafted to remove gluten using a barley malt extract with high peptidase activity. *European Food Research and Technology*, v. 249, p. 23–32, 2023. DOI: 10.1007/s00217-022-04050-7.
 - PIJNING, Tjaard et al. Structural and time-resolved mechanistic investigations of protein hydrolysis by the acidic proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*. *Protein Science*, v. 33, n. 1, e4856, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.4856>.
 - KÁŠ, J.; FUKAL, L. The role of active and inactivated papain in beer chillproofing. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 90, n. 4, p. 247–249, 1984. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1984.tb04265.x.
 - JONES, M.; PIERCE, J. S. Malt peptidase activity. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 73, n. 4, p. 347–349, 1967. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1967.tb03052.x.
 - LEI, Hongjie; ZHENG, Liye; WANG, Chenxia; ZHAO, Haifeng; ZHAO, Mouming. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast. *International Journal of Food Microbiology*, v. 161, n. 2, p. 76–83, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.024>.
 - LUND, M. N.; PETERSEN, M. A.; ANDERSEN, M. L.; LUNDE, C. Effect of protease treatment during mashing on protein-derived thiol content and flavor stability of beer during storage. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 73, n. 3, p. 287–295, 2015. DOI: 10.1094/asbcj-2015-0602-01.
 - KRÓLAK, Kamil; KOBUS, Katarzyna; KORDIALIK-BOGACKA, Edyta. Effects on beer colloidal stability of full-scale brewing with adjuncts, enzymes, and finings. *European Food Research and Technology*, [S.I.], v. 249, p. 47–53, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04131-7>.
 - SCHULZ, Benjamin L.; PHUNG, Toan K.; BRUSCHI, Michele; JANUSZ, Agnieszka; STEWART, Jeff; MEHAN, John; HEALY, Peter; NOUWENS, Amanda S.; FOX, Glen P.; VICKERS, Claudia E. Process proteomics of beer reveals a dynamic proteome with extensive modifications. *Journal of Proteome Research*, Washington, DC, v. 17, n. 3, 2018. DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00907.
 - MATHIAS, Thiago Rocha dos Santos; MENEZES, Leonardo Moreira; SÉRVULO, Eliana Flávia Camporese. Effect of maize as adjunct and the mashing proteolytic step on the brewer wort composition. *Beverages*, Basel, v. 5, n. 4, p. 1-10, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-5710/5/4/65>.
 - KALB, Valerian; SEEWALD, Torsten; HOFMANN, Thomas; GRANVOGL, Michael. The role of endogenous enzymes during malting of barley and wheat varieties in the mitigation of styrene in wheat beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 68, n. 46, p. 13888-13896, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04837>.
 - OKPARA, Michael O. Microbial enzymes and their applications in food industry: a mini-review. *Advances in Enzyme Research*, v. 10, n. 1, p. 23-47, 2022. DOI:<https://doi.org/10.4236/aer.2022.101002>.
 - JONES, B. L.; MARINAC, L. A. The effect of mashing on malt endoproteolytic activities. *Journal of Cereal Science*, v. 33, n. 2, p. 175–191, 2001.

- NÁJERA-TORRES, E. et al. Proteolytic activities and profiles as useful traits to select barley cultivars for beer production. *Journal of Food Biochemistry*, v. 46, n. 5, e14094, 2022. DOI: 10.1111/jfbc.14094.
- JONES, B. L. Endoproteases of barley and malt. *Journal of Cereal Science*, v. 42, n. 2, p. 139–156, 2005.
- LIN, C. L. et al. Towards lager beer aroma improvement via selective amino acid release by proteases during mashing. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 128, n. 2, p. 165–175, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/jib.682>
- MURMANN, A. N.; LUNDE, C.; LUND, M. N. Selection of protease for increased solubilization of protein-derived thiols during mashing with limited release of free amino acids in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 73, n. 2, p. 104–112, 2015.
- ORMROD, I. H. L.; LALOR, E. F.; SHARPE, F. R. The release of yeast proteolytic enzymes into beer. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 97, n. 6, p. 441–443, 1991. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1991.tb01083.x.
- EVANS, D. E.; HEJGAARD, J. The impact of malt derived proteins on beer foam quality. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 105, n. 3, p. 159–170, 1999.
- PHAM, T. V. et al. Production, purification and characterization of novel protease from *Bacillus amyloliquefaciens* D19 isolated in Vietnam. *Malaysian Journal of Microbiology*, v. 20, n. 1, p. 85–93, 2024.
- ALVES, R. O. et al. Extractive fermentation for process integration of protease production by *Aspergillus tamarii* and purification by PEG-Citrate Aqueous Two-Phase System. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 50, e1904257, 2024. DOI: 10.1080/10826068.2021.1904257
- BERGER, T. S. et al. The impact of different ale brewer's yeast strains on the proteome of immature beer. *Proteome Science*, v. 13, n. 215, 2015. DOI: 10.1186/1471-2180-13-215.
- EVANS, D. E. Malt-derived proteins and their contribution to beer quality. *European Food Research and Technology*, v. 220, p. 737–742, 2005.
- FUKAL, L.; KAS, J. The role of active and inactivated papain in beer chillproofing. *Journal of the Institute of Brewing*, [s.l.], v. 90, n. 4, p. 247-249, July-Aug. 1984.
- CAMARCA, Alessandra; ANDERSON, Robert P.; MAMONE, Gianfranco; FIERRO, Olga; FACCHIANO, Angelo; COSTANTINI, Susan; ZANZI, Delia; SIDNEY, John; AURICCHIO, Salvatore; SETTE, Alessandro. Intestinal T Cell Responses to Gluten Peptides Are Largely Heterogeneous: implications for a peptide-based therapy in celiac disease. *The Journal Of Immunology*, [S.L.], v. 182, n. 7, p. 4158-4166, 19 mar. 2017.
- JONES, M.; PIERCE, J. S. Malt peptidases. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 73, n. 4, p. 349–358, 1967. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1967.tb03053.x.
- TIAN, Wen-hui; SUN, Li-ping; ZHANG, Cui; HU, Shu-min; ZHUANG, Yong-liang; YIN, Hua. Virtual screening of activity evaluation of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides in white beer. *Shipin Kexue / Food Science*, Beijing, v. 43, n. 10, p. 81–87, 2022. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20210607-089.
- COLLIER, B. The determination of papain in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 72, n. 2, p. 204–207, 1966. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1966.tb02955.x.
- SUN, H.; ZHANG, Y.; HAO, J.; WANG, D.; LI, T.; WANG, M.; GUO, Q. A rapid method for testing filtration performance of malt and the optimization of the method. *Fermentation*, v. 9, n. 7, p. 613, 2023. DOI: 10.3390/fermentation9070613.
- FLODROVÁ, D.; BENKOVSKÁ, D.; LAŠTOVIČKOVÁ, M.; BOBÁLOVÁ, J. HPLC bottom-up MS-based proteomics for mapping of specific proteins in several

- European spring barley varieties. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 73, n. 1, p. 71–77, 2015. DOI: 10.1094/asbcj-2015-0107-01.
- KANAUCHI, M.; BAMFORTH, C. The lowering of gushing potential from hydrophobin by the use of proteolytic enzymes. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 130, n. 3, p. 199–206, 2024. DOI: 10.58430/jib.v130i3.53.
 - TSAI, C.-W.; BRIGGS, D. E. Refinements of the casein turbidity method for measuring proteases in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 94, n. 1, p. 9–13, 1988. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1988.tb04546.x.
 - URQUHART, W. B. M. Note on some experimental steeping treatments of malting barley. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 59, p. 56–61, 1953.
 - JONES, M.; PIERCE, J. S. Malt peptidases. 1967.
 - Hartmann, G., Koehler, P., Wieser, H. Rapid degradation of gliadin peptides toxic for coeliac disease patients by proteases from germinated cereals. *J. Cereal Sci.*, 2006.
 - KENNEDY, J. F.; PIKE, V. W.; BARKER, S. A. A study of the beer chill-proofing behaviour of a water-insoluble papain conjugate of hydrous titanium(IV) oxide. *Enzyme and Microbial Technology*, Birmingham, v. 2, n. 2, p. 126-132, 1980. DOI: 10.1016/0141-0229(80)90068-x
 - NAZIR, Atif; WASEEM, Muhammad; ILYAS, Muhammad. *Bibliometric Analysis of Personalized 3D-Printed Concrete-Based Modules for Construction: Leveraging the Ordinatio Method*. *Buildings*, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 802, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/buildings14030802>.
 - COELHO, Leandro dos Santos; CAMPOS, Fernando Carlos de Souza; BIANCHINI, Flávia Gomes. *Systematic Review of Lithium-Ion Battery Recycling Literature Using ProKnow-C and Methodi Ordinatio*. *Energies*, [S.l.], v. 15, n. 4, p. 1485, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/en15041485>.
 - SALAZAR, María Angélica Cárdenas; TOBÓN, Sandra Milena Velásquez; PULIDO, Wilmar Stiven Rincón. *A comprehensive approach to job performance in the service sector*. *Espacios*, [S.l.], v. 40, n. 5, p. 6, 2019.
 - PEREIRA, Adejanildo da S. et al. *From Agri-food Wastes to Enzyme Production: A Systematic Review with Methodi Ordinatio*. *Waste and Biomass Valorization*, [S. l.], 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-024-02565-6>.
 - PAGANI, R. N. et al. *Methodi Ordinatio: a proposed methodology to select and rank relevant scientific papers encompassing the impact factor, number of citation, and year of publication*. *Scientometrics*, v. 105, p. 2109–2135, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11192-015-1744-x>.
 - CARVALHO, Gustavo Dambiski Gomes de et al. *Bibliometrics and systematic reviews: A comparison between the Proknow-C and the Methodi Ordinatio*. *Journal of Informetrics*, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 101043, 2020. DOI: [10.1016/j.joi.2020.101043](https://doi.org/10.1016/j.joi.2020.101043).
 - KIRIN HOLDINGS. *Kirin launches new food & beverage business in Brazil*. Disponível em: https://www.kirinholdings.com/en/newsroom/release/2024/1219_01.html. Acesso em: 7 mai. 2025.
 - ANHEUSER-BUSCH INBEV. *Shareholder structure*. Disponível em: <https://www.ab-inbev.com/investors/share-information/shareholder-structure>. Acesso em: 7 mai. 2025.
 - ANHEUSER-BUSCH INBEV. *Investor Presentation*. Disponível em: <https://cdn.builder.io/o/assets%2F2e5c7fb020194c1a8ee80f743d0b923e%2F5d90427ad24f40d1861f3d49e7997072?alt=media&token=afac9981-7e62-4196-a782-1e6ad6f4c591&apiKey=2e5c7fb020194c1a8ee80f743d0b923e>. Acesso em: 7 mai. 2025.

- MORDOR INTELLIGENCE. *Proteases Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2024 - 2029)*. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/proteases-market>. Acesso em: 7 mai. 2025.
- RESEARCH AND MARKETS. *The Worldwide Industrial Enzymes Industry is Expected to Reach \$17.4 Billion by 2027*. GlobeNewswire, 5 ago. 2021. Disponível em: <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/08/05/2275265/0/en/The-Worldwide-Industrial-Enzymes-Industry-is-Expected-to-Reach-17-4-Billion-by-2027.html>. Acesso em: 7 mai. 2025.
- Cervejarias: como ficou o market share de vendas de cerveja no Brasil em 2023. Catalisi, 2024. Disponível em: <https://catalisi.com.br/como-ficou-o-market-share-de-vendas-de-cerveja-no-brasil-em-2023/>. Acesso em: 4 jul. 2025.
- FIEDLER, Katherine L. et al. Detection of gluten in a pilot-scale barley-based beer produced with and without a prolyl endopeptidase enzyme. *Food Additives & Contaminants: Part A*, [S.l.], v. 36, n. 8, p. 1151-1162, Aug. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1616830>.
- AMBEV S.A. RI – Ambev. Disponível em: <https://ri.ambev.com.br/>. Acesso em: 04 jul. 2025.
- Grupo Petrópolis Ltda. Quem Somos – Grupo Petrópolis. Disponível em: <https://www.grupopetropolis.com.br/quem-somos/index.html>. Acesso em: 04 jul. 2025.
- Heineken N.V. Our Company – The HEINEKEN Company. Disponível em: <https://www.theheinekencompany.com/our-company>. Acesso em: 04 jul. 2025.
- TECHNAVIO. *Gluten-free beer market by distribution channel, product, and geography - forecast and analysis 2025–2029*. Disponível em: <https://www.technavio.com/report/gluten-free-beer-market-industry-analysis>. Acesso em: 4 jul. 2025.
- MINTEL. *Brazil ranked number 2 most innovative craft beer market – Mintel*. Food Navigator-LATAM, 21 set. 2018. Disponível em: <https://www.foodnavigator-latam.com/Article/2018/09/21/Brazil-ranked-number-2-most-innovative-craft-beer-market-Mintel>. Acesso em: 04 jul. 2025.
- EUROMONITOR INTERNATIONAL. *What's Brewing in the Latin American Beer Market?* Insight – Euromonitor, 2024 (Pesquisa Voice of the Consumer: Lifestyles Survey, jan.–fev. 2024). Disponível em: <https://lp.euromonitor.com/article/whats-brewing-in-the-latin-american-beer-market>. Acesso em: 04 jul. 2025.
- EUROMONITOR INTERNATIONAL. *Beer in Brazil*. June 2025. Disponível em: <https://www.euromonitor.com/beer-in-brazil/report>. Acesso em: 04 jul. 2025.
- SOUZA, Paula Monteiro de et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015. DOI: 10.1590/S1517-838246220140359.
- SONG, Peng et al. Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1–25, 2023. DOI: [10.3389/fmicb.2023.1236368](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236368).
- MATTER, Ikhlas Ramadan; AL-OMARI, Aisha W.; AL-HADIDI, Najwa Mohammed. Industrial applications of microbial protease: A review. *Academic Science Journal*, v. 1, n. 3, p. 141–146, 2023. DOI: [10.24237/ASJ.01.03.721CC](https://doi.org/10.24237/ASJ.01.03.721CC).
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. *Anuário da Cerveja 2024: ano de referência 2023*. Brasília: MAPA/SDA, 2024. ISBN 978-85-7991-235-1.
- YU, Xin-he; LI, Ming-hui; SUN, Zhen. Analysis of the Gluten Map in Beers by LC–MS/MS combined with optimized extraction protocol. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, v. 43, n. 2, p. 242–251, 2022. DOI: 10.7538/zpxb.2021.0039

- BALIU, Ylberinë; et al. *Isolation and characterization of natural protease producers of Bacillus spp. from soil samples*. In: UBT International Conference on Food Science and Technology, Pristina, Kosovo, 27 out. 2018. Pristina: UBT Knowledge Center, 2018., ISBN 978-9951-437-69-1. DOI: 10.33107/ubt-ic.2018.175
- PRAGNELL, M. J.; et al. Investigation of transaminase activity during mashing. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 75, n. 6, p. 509–510, 1969. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1969.tb03239.x.

APÊNDICE A – Classificação InOrdinatio

Tabela A - Artigos científicos na base SCOPUS sobre utilização de proteases na indústria cervejeira classificados de acordo com o método *InOrdinatio*

| Ranking | Autores | Impacto | Citações | Idade | InOrdinatio |
|---------|---|---------|----------|-------|-------------|
| 11 | Benucci I.; Caso M.C.; Bavaro T.; Masci S.; Keršienė M.; Esti M. | 7,00 | 27 | 4 | 38,6 |
| 12 | Iimure T.; Sato K. | 5,70 | 32 | 11 | 38,0 |
| 13 | Jones B.L.; Marinac L. | 5,00 | 41 | 22 | 34,7 |
| 14 | Schulz B.L.; Phung T.K.; Bruschi M.; Janusz A.; Stewart J.; Meehan J.; Healy P.; Nouwens A.S.; Fox G.P.; Vickers C.E. | 2,40 | 26 | 6 | 33,8 |
| 15 | Panda R.; Fiedler K.L.; Cho C.Y.; Cheng R.; Stutts W.L.; Jackson L.S.; Garber E.A.E. | 3,00 | 26 | 9 | 32,7 |
| 16 | Shetty R.; Vestergaard M.; Jessen F.; Hägglund P.; Knorr V.; Koehler P.; Prakash H.S.; Hobley T.J. | 2,40 | 26 | 7 | 32,4 |
| 17 | Akeroyd M.; Van Zandycke S.; Den Hartog J.; Mutsaers J.; Edens L.; Van DenBerg M.; Christis C. | 2,40 | 29 | 8 | 32,3 |
| 18 | Severini C.; Azzolini D.; Jouppila K.; Jussi L.; Derossi A.; De Pilli T. | 2,40 | 27 | 9 | 31,9 |
| 19 | Fiedler K.L.; Panda R.; Croley T.R. | 3,90 | 21 | 6 | 31,7 |
| 20 | de Lourdes Moreno Amador M.; Arévalo-Rodríguez M.; Durán E.M.; Reyes J.C.M.; Martín C.S. | 6,10 | 24 | 6 | 30,9 |
| 21 | Lei H.; Zhao H.; Zhao M. | 5,60 | 28 | 11 | 30,7 |

| | | | | | |
|----|---|----|----|------|--|
| | Piddocke M.P.; Fazio A.; Vongsangnak W.; Wong M.L.; Heldt-Hansen H.P.; Workman C.; Nielsen J.; | | | | |
| 22 | Olsson L. 7,00 | 29 | 13 | 30,3 | |
| 23 | Oliveira P.M.; Waters D.M.; Arendt E.K. 5,70 | 25 | 11 | 28,0 | |
| 24 | Glatthar J.; Heinisch J.J.; Senn T. 3,80 | 32 | 19 | 26,3 | |
| 25 | Fiedler K.L.; Cao W.; Zhang L.; Naziemiec M.; Bedford B.; Yin L.; Smith N.; Arbuckle M.; Lopez- Hernandez A.; Jackson L.S. 5,70 | 15 | 5 | 22,3 | |
| 26 | Todorov S.D.; Dicks L.M.T. 3,40 | 28 | 20 | 21,7 | |
| 27 | Berner T.S.; Jacobsen S.; Arneborg N. 1,30 | 18 | 11 | 21,0 | |
| 28 | Kerpes R.; Knorr V.; Procopio S.; Koehler P.; Becker T. 3,90 | 15 | 8 | 20,9 | |
| 29 | Jones B.L.; Marinac L.A. 6,70 | 36 | 27 | 20,3 | |
| 30 | Kalb V.; Seewald T.; Hofmann T.; Granvogl M. 2,90 | 7 | 4 | 18,7 | |
| 31 | Lin C.L.; Petersen M.A.; Mauch A.; Gottlieb A. 3,70 | 8 | 2 | 18,4 | |
| 32 | Alves R.O.; de Oliveira R.L.; da Silva O.S.; Porto A.L.F.; Porto C.S.; Porto T.S. 4,30 | 8 | 2 | 18,0 | |
| 33 | Li X.; Jin Z.; Gao F.; Lu J.; Cai G.; Dong J.; Yu J.; Yang M. 4,00 | 11 | 10 | 16,7 | |
| 34 | Hejgaard J. 3,30 | 51 | 47 | 16,4 | |
| 35 | Jones B.L.; Budde A.D. 2,30 | 21 | 21 | 15,7 | |
| 36 | Pijning T.; Vujičić-Žagar A.; van der Laan J.-M.; de Jong R.M.; Ramirez- Palacios C.; Vente A.; Edens L.; Dijkstra B.W. 3,70 | 1 | 0 | 15,5 | |

| | | | | | |
|----|---|------|----|----|------|
| 37 | Lund M.N.; Petersen M.A.; Andersen M.L. | 4,00 | 13 | 9 | 15,3 |
| 38 | Dlamini B.C.; Buys E.M.; Taylor J.R.N. | 3,90 | 11 | 9 | 15,3 |
| | Vilar Nogueira W.; Dias Remedi R.; Vanessa Marimón-Sibaja K.; David Moreira Gonçalves K.; Barnes Rodrigues Cerqueira | | | | |
| 39 | M.; Gardea-Buffon J. | 1,30 | 3 | 2 | 15,0 |
| 40 | Królak K.; Kobus K.; Kordialik-Bogacka E. | 5,70 | 3 | 1 | 15,0 |
| | Kerpes R.; Göller F.; Kollmannsberger H.; | | | | |
| 41 | Becker T. | 2,40 | 3 | 1 | 15,0 |
| 42 | Specker C.; Niessen L.; Vogel R.F. | 2,00 | 12 | 10 | 14,4 |
| | Nájera-Torres E.; Bernal- Gracida L.A.; González- Solís A.; Schulte-Sasse M.; Castañón-Suárez C.; Juárez- Díaz J.A.; Cruz-Zamora Y.; Vázquez-Santana S.; | | | | |
| 43 | Figueroa M.; Cruz-García F. | 5,70 | 2 | 2 | 13,5 |
| | Evans D.E.; Finn J.E.C.; Robinson L.H.; Eglinton J.K.; Sheehy M.; Stewart | | | | |
| 44 | D.C. | 2,40 | 14 | 13 | 13,4 |
| 45 | Mathias T.R.S.; Menezes L.M.; Sérvulo E.F.C. | 5,70 | 5 | 5 | 13,0 |
| 46 | Tian W.; Sun L.; Zhang C.; Hu S.; Zhuang Y.; Yin H. | 4,50 | 5 | 2 | 13,0 |
| | Kanauchi M.; Bamforth | | | | |
| 47 | C.W. | 1,30 | 0 | 0 | 12,4 |
| 48 | Jin Y.; Du J.; Zhang K.; Guo M. | 3,30 | 10 | 10 | 12,4 |
| | Sun H.; Zhang Y.; Hao J.; Wang D.; Li T.; Wang M.; | | | | |
| 49 | Guo Q. | 4,00 | 0 | 1 | 12,3 |
| 50 | Lund M.N.; Lametsch R.; | 3,00 | 9 | 10 | 11,4 |

| | | | | | |
|----|---|------|----|----|-------|
| | Sørensen M.B. | | | | |
| 51 | Taylor J.P.; Jacob F.; Zannini E.; Arendt E.K. | 3,00 | 4 | 7 | 11,0 |
| 52 | Pham T.V.; Nguyen H.T.D.; Bui T.L.; Nguyen N.A. | 2,40 | 0 | 0 | 10,4 |
| 53 | Sensidoni M.; Marconi O.; Perretti G.; Freeman G.; Fantozzi P. | 3,50 | 11 | 13 | 10,4 |
| 54 | Schnitzenbaumer B.; Karl C.A.; Arendt E.K. | 2,40 | 10 | 11 | 10,3 |
| 55 | Yu X.-H.; Li M.-H.; Sun Z. | 3,00 | 1 | 2 | 9,7 |
| 56 | Hyseni B.; Ferati F.; Rexhepi F.; Morina R.; Baliu Y.; Hyseni S.; Rushiti A.; Hajdini S.; Nikerel E. | 0,00 | 2 | 4 | 8,0 |
| 57 | Ormrod I.H.L.; Lalor E.F.; Sharpe F.R. | 2,40 | 28 | 33 | 7,4 |
| 58 | Desobgo Z.S.C.; Nso E.J.; Tenin D.; Kayem G.J. | 2,40 | 8 | 14 | 6,4 |
| 59 | Stoupis T.; Stewart G.G.; Stafford R.A. | 3,30 | 13 | 20 | 4,3 |
| 60 | Flodrová D.; Benkovská D.; Lašťovičková M.; Bobálová J. | 2,40 | 2 | 9 | 4,3 |
| 61 | Hübner F.; Schehl B.D.; Thiele F.; Arendt E.K. | 4,00 | 7 | 15 | 3,3 |
| 62 | Murmann A.N.; Lunde C.; Lund M.N. | 0,40 | 0 | 8 | 3,3 |
| 63 | Le Van V.M.; Strehaino P.; Nguyen D.L.; Taillandier P. | 2,40 | 12 | 23 | 0,3 |
| 64 | Stoupis T.; Stewart G.G.; Stafford R.A. | 1,30 | 10 | 22 | -0,7 |
| 65 | Greenwood C.T.; MacGregor A.W. | 0,66 | 45 | 59 | -1,6 |
| 66 | Jin F.; Toda K. | 0,00 | 11 | 36 | -13,0 |
| 67 | Kennedy J.F.; Pike V.W. | 2,40 | 14 | 43 | -15,6 |
| 68 | Nelson G.; Young T.W. | 2,40 | 5 | 37 | -19,6 |

| | | | | | |
|----|--|------|----|----|-------|
| 69 | Fukal L.; Káš J.; Rauch P. | 1,30 | 6 | 40 | -21,6 |
| | MONSAN P.; | | | | |
| 70 | DUTEURTRE B.; MOLL M.; DURAND G. | 1,30 | 10 | 46 | -22,8 |
| | Kennedy J.F.; Pike V.W.; | | | | |
| 71 | Barker S.A. | 1,30 | 7 | 44 | -23,6 |
| | Rauch P.; Fukal L.; Strejček F.; Káš J. | 1,30 | 4 | 40 | -23,6 |
| 73 | Tsai C.-W.; Briggs D.E. | 1,30 | 0 | 36 | -23,6 |
| | Mikola J.; Pietilä K.; Enari T.-M. | 1,30 | 15 | 52 | -24,6 |
| 75 | KÁŠ L.F.a.J. | 2,40 | 3 | 40 | -24,6 |
| | Mikola J.; Pietilä K.; Enari T.-M. | 2,00 | 10 | 52 | -29,6 |
| 77 | Scriban R.; Stienne M. | 3,40 | 5 | 54 | -36,6 |
| 78 | Jones M.; Pierce J.S. | 2,40 | 3 | 57 | -41,6 |
| 79 | Jones M.; Pierce J.S. | 2,40 | 3 | 57 | -41,6 |
| | Pragnell M.J.; Jones M.; Pierce J.S. | 3,20 | 0 | 55 | -42,6 |
| 81 | Collier B. | 3,40 | 2 | 58 | -43,6 |
| 82 | Urquhart W.B.M. | 2,40 | 0 | 71 | -58,6 |

