

Produção de mosto em escala laboratorial para obtenção de concentrado de proteínas das cerveja

Production of congress mash on a laboratory scale to obtain beer protein concentrates

Samuel Aguillar Tomaz

ORIENTADO POR: Prof. Doutor Júlio César Machado Júnior

COORIENTADO POR: Doutora Carla Sílvia Silva Teixeira

LOCAL DE ESTÁGIO: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto / Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) / Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE)

TRABALHO DE INVESTIGAÇÃO

1º CICLO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO I UNIDADE CURRÍCULAR ESTÁGIOS

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DA UNIVERSIDADE DO PORTO

TC

Porto, 2024



Resumo

Produziu-se um mosto de malte de cevada, cujas proteínas foram extraídas, quantificadas, e caracterizadas por eletroforese SDS-PAGE. A proteína total foi quantificada pelo método clássico de Kjeldahl. Os resultados mostraram que o malte continha $9,2 \pm 0,6$ g de proteínas totais em 100 g de amostra, enquanto o mosto possuía cerca de metade ($4,5 \pm 0,6$ g/ 100 g).

As proteínas do malte e do mosto foram extraídas com diferentes tampões de extração (PBS, Tris-HCL e água) em diferentes condições (60 °C, 2h e 4 °C, *overnight*) e quantificadas através do método UV e BCA. Em média o mosto e o malte apresentaram, respetivamente, 8,8 mg ($\pm 0,6$) e 4,6 mg ($\pm 0,4$) de proteínas solúveis por 100 g de amostra.

Por análise dos geis de SDS-PAGE verificou-se que a qualidade e o perfil das proteínas extraídas do malte e do mosto não são influenciados pelo tampão de extração, contudo, a extração das proteínas do malte é favorecida a 4 °C *overnight*.

Das proteínas identificadas no malte verificou-se a passagem para o mosto proteínas Z, proteínas de transferência lipídica (LTP1 e LTP2) e fragmentos de hordeínas ricas em ligações de dissulfeto.

Palavras-Chave

Palavras-chave: Proteínas do Malte, Proteínas da cevada, Proteínas da cerveja, Proteínas solúveis da cerveja.

Abstract

A barley malt mash was produced, whose proteins were extracted, quantified and characterized by SDS-PAGE electrophoresis. Total protein was quantified using the classic Kjeldahl method. The results showed that the malt contained 9.2 ± 0.6 g of total protein in 100 g of sample, while the wort had around half (4.5 ± 0.6 g/100 g).

The malt and wort proteins were extracted using different extraction buffers (PBS, Tris-HCL and water) under different conditions (60°C, 2h and 4°C, overnight) and quantified using the UV and BCA method. On average, the wort and malt had 8.8 mg (± 0.6) and 4.6 mg (± 0.4) of soluble proteins per 100 g of sample respectively. Analysis of the SDS PAGE graphs showed that the quality and profile of the proteins extracted from malt and wort were not influenced by the extraction buffer; however, the extraction of malt proteins was favoured at 4 °C overnight.

Of the various proteins identified in malt, Z proteins, lipid transfer proteins (LTP1 and LTP2) and hordeins fragments rich in disulphide bonds were found to pass into the wort.

Keywords

Keywords: Malt proteins, Barley proteins, Beer proteins, Soluble beer proteins.

Lista de abreviaturas

BCA - Ensaio de ácido bicinconínico

BJCP - Beer Judge Certification Program (Programa de certificação de juízes de cerveja)

EBC - European Brewery Convention

Eletroforese SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

FCNAUP - Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

FFUP - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

LAQV - Laboratório Associado para a Química Verde

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

REQUIMTE - Rede de Química e Tecnologia

Tris-HCl - 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol e ácido clorídrico

UV-Vis - Ultravioleta Visível

Lista de unidades

kDa - Kilodaltons

°C - Unidade de temperatura em escala Celcius

g - Unidade de medida para gravidade

hr- hora

mg - miligramas

ml - mililitros

nm - nanômetros

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. Metodologia	4
3.1. Preparação de amostras de grão de cevada maltada e mosto liofilizado	4
3.2. Quantificação de proteínas totais	5
3.3. Extração e quantificação de proteínas solúveis pelos testes de UV/VIS e BCA	5
3.4. Método de Eletroforese SDS-PAGE	6
3.4.1. Preparação de Géis	6
3.4.2. Preparação da amostra de eletroforese	6
3.4.3. Aplicação da amostra no Gel	7
3.5. Análise estatística	8
Resultados	8
4.	
4.1. Humidade	8
4.2. Quantificação de proteínas totais	8
4.3. Quantificação de proteínas solúveis	9
4.4. Electroforese SDS	11
5. Discussão	12
6. Conclusões	15
7. Sugestões	16
8. Agradecimentos	18
9. Referências	19

1. Introdução

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo. O seu consumo é milenar e prevê-se que a sua produção atinja 1,9 mil milhões de hectolitros.

Segundo a legislação portuguesa, (Decreto-Lei n.º 2/2022) de 4 de janeiro de 2022, as normas técnicas relativas a definições da composição e características das cervejas descreve que “Cerveja é a bebida obtida através da fermentação alcoólica, mediante leveduras selecionadas do género *Saccharomyces*, que atuam sobre um mosto cervejeiro preparado a partir de uma solução de hidratos de carbono fermentáveis e proteínas solúveis, o mosto cervejeiro possui como ingredientes principais, grãos maltados ou outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, ao qual são adicionadas flores de lúpulo ou seus derivados em água potável” ⁽²⁾.

A quantidade de amido (70 a 85 %), proteínas (9 a 14 %) e gorduras (2 a 3 %) ⁽³⁾, a qualidade da casca, a alta atividade enzimática e o seu tradicional sabor torna a cevada (*Hordeum vulgare L*) o cereal mais utilizado para a produção de grão maltado (malte), este que será um dos principais insumos para produção de cervejas, sendo acrescentado em grandes quantidades (numa média geral, cerca de 25 Kg para cada hectolitro de cerveja) ⁽⁴⁾. Entretanto, é comum a prática de utilização de outros cereais, como trigo, aveia e centeio, entre outros. O malte pode influenciar o dulçor, acidez, aromas, corpo, cor, turvação, viscosidade, espuma da cerveja, dependendo (i) do tipo de cereal, (ii) grau de torrefação, (iii) moagem do grão, (iv) teores de amido, (v) proteínas e (vi) enzimas *α -amylase* e *β -amylase* ⁽⁵⁻⁹⁾.

Algumas classes de proteínas do malte são estáveis ao calor e resistentes ao processo de fabricação das cervejas. Tendo influência no produto, cruciais para a estabilidade da turbidez, formação de espuma e adsorção dos compostos voláteis das cervejas. ⁽¹⁰⁻¹⁵⁾ No geral, as cervejas contêm cerca de 500 mg/L de materiais proteicos com massas moleculares que variam entre 5 e 100 kDa ⁽¹⁶⁾. São comumente estudadas nos grãos maltados, e muitos cervejeiros as seguintes proteínas: proteínas Z e as proteínas de transferência de lipídios (LTPs) ^(10, 12, 16-22). Este estudo teve como objetivo extrair, quantificar e identificar classes de proteínas que possuem caráter hidrofóbico e anfifílico, respectivamente, classes de proteínas Z que são membro do grupo das proteínas serpinas que são inibidores de proteases de serina e a principal albumina da cevada, e também as classes de proteínas de transferência de lipídios (LTPs).

Para a matriz de grãos de cevada maltado, a literatura sugere métodos de extração de proteínas vegetais em pH alcalino ⁽¹⁰⁾. Desta maneira, em pH alcalino e condições salinas, as proteínas adquirem mais facilidade em obter uma carga líquida negativa, aumentando a repulsão dentro e entre as moléculas de proteína ^(10, 23, 24). O PBS (pH 7.5) é normalmente utilizado quando existe a necessidade de solubilizar e desnaturar as proteínas alvo. O Tris-HCL (pH 8.0) possui capacidade de extrair proteínas citoplasmáticas solúveis da matriz vegetal. Portanto, os tampões de extração foram selecionados por serem específicos para a porção de proteínas hidrofóbicas e anfifílicas, nomeadamente as de interesse, albuminas e globulinas ^(25, 26).

A Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS) é o método mais usado para separar misturas complexas de proteínas para posterior identificação e/ou quantificação. O procedimento envolve a utilização

de um detergente aniônico (SDS) que se liga às proteínas conferindo-lhes uma carga negativa proporcional à sua massa molecular. Este passo é seguido de eletroforese através de uma matriz porosa de gel de acrilamida que separa as proteínas com uma excelente resolução apenas com base na sua massa molecular (10, 20, 27-30) .

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este trabalho faz parte de um estudo amplo no qual se pretende avaliar o potencial de ligação das proteínas da cerveja com os compostos voláteis dos lúpulos. Foram previamente realizadas análises *in silico* para avaliar o potencial de acoplamento molecular (*molecular docking*), que demonstraram que alguns compostos, como os sesquiterpenos e monoterpenos possuem um alto grau de interação. Contudo, os estudos *in silico* necessitam de validação através de estudos experimentais. Para tanto, serão necessários testes envolvendo incubação dos compostos voláteis com soluções ricas em proteínas das cervejas. Neste contexto, este estudo teve como objetivo produzir um mosto concentrado de proteínas que possuem caráter hidrofóbico e anfifílico, respectivamente, classes de proteínas Z que são membro do grupo das proteínas serpinas e a principal albumina da cevada, e também as classes de proteínas de transferência de lipídios (LTPs).

2.2. Objetivos específicos

- (i) Produção do mosto cervejeiro rico em açúcares e proteínas, reproduzindo a etapa de mostura (*mashing*) da produção de cervejas;
- (ii) Quantificar proteínas totais de mosto liofilizado pelo método

Kjeldahl; (iii) Extrair e quantificar as proteínas solúveis no mosto liofilizado pelos métodos de UV/Vis e BCA; (iv) Separar e identificar proteínas com massas moleculares entre 7 kDa e 42 kDa, utilizando método de eletroforese SDS-PAGE.

3. Metodologia

3.1. Preparação de amostras de grão de cevada maltada e mosto liofilizado

O malte (Swaen®Pilsen, Países Baixos) foi obtido em loja local de matérias-primas para o fabrico de cervejas.

Avaliou-se a humidade dos grãos de malte moído, cerca de 1g dos grãos de malte moído foi colocado dentro do medidor de humidade (KERN DBS 60-3 Germany) cujo pesa a amostra, e através do aquecimento (100°C), realiza a secagem da amostra, quantificando assim, por diferença de pesos, a humidade em percentual. Os grãos de cevada maltada foram moídos a 3000 RPM durante 5 segundos). A seguir preparou-se o mosto cervejeiro: pesou-se 100 g de grão de malte moído e adicionou-se 360 ml de água desionizada à temperatura de 65 °C, sob agitação manual durante 60 min. Manteve-se a temperatura de 65 °C até total sacarificação verificada utilizando-se do método de teste de iodo 2%, cujo observa-se, se o mosto escurecer é sinal de que ainda há amido a ser convertido, se permanecer claro, a conversão está completa.

Após a sacarificação, o mosto foi filtrado de forma simples utilizando-se de um Funil de Büchner com capacidade de 250 ml, Diâmetro Superior 100 milímetros e diâmetro da Haste 23 milímetros. Após filtração, o mosto foi colocado em

fervura durante 60 minutos. Posteriormente o mosto foi arrefecido e acondicionado em frascos e levado à temperatura de -80 °C para ser liofilizado.

3.2. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Kjeldahl⁽³¹⁾ em duplicado.

3.3. Extração e quantificação de proteínas solúveis pelos testes de UV/VIS e BCA

Pesaram-se 200 mg de mosto liofilizado e 200 mg de grãos de malte de cevada moídos. Adicionou-se 1,5 mL de cada tampão de extração: Tris-HCl 100mM (pH 8,0), PBS 200mM (pH 7,5) e água (pH 7), a cada uma das amostras. Testaram-se duas condições de extração: 4º *overnight* (~17h) e 60 °C durante 2h, ambas em constante agitação a 900 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). As amostras foram centrifugadas a 9,000xg durante 30 min. Recolheu-se o sobrenadante e repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições. Recolheu-se o sobrenadante para análise e descartou-se o pellet ⁽²⁶⁾.

Os teores de proteínas dos extratos foram quantificados por dois métodos: espectrofotometria UV/Vis ^(5, 32, 33) e por utilização do kit de quantificação de proteínas Pierce™ BCA Protein Assay Kit.

Para o método UV adicionaram-se 4 µL de amostra (em duplicado) Placa Lvis, ideal para medições de baixo volume de proteínas e mediu-se a absorvência a 280 nm (SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) ⁽³³⁾). A concentração de proteínas estimada pelo método UV foi levada em consideração para a diluição

das amostras para quantificação com o Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Para realização do teste BCA, as amostras foram diluídas com água ultrapura para uma concentração que ficasse dentro da curva de calibração, ou seja, entre 0 e 2 mg/mL. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços aos quais foram adicionados, em triplicado, 20 µL de amostra ou de padrão juntamente com 200 µL da solução de trabalho do kit de BCA. As microplacas foram incubadas a 30 minutos a 37 °C protegidas da luz. Após o arrefecimento da placa até à temperatura ambiente efetuou-se a medição da absorvência a 562 nm. Calculou-se a concentração de proteína das amostras com base na equação da reta da curva de calibração⁽³⁴⁻³⁶⁾.

3.4. Método de Eletroforese SDS-PAGE

3.4.1. Preparação de Géis

Cada gel é composto por uma porção de gel de empacotamento e uma porção de gel separador preparadas de acordo com o descrito na Tabela Suplementar 1. O gel de empacotamento tem como objetivo empacotar as proteínas que serão posteriormente separadas durante a sua migração ao longo do gel separador. A percentagem de acrilamida adicionada ao gel separador vai definir o diâmetro do poro da malha ^(27, 37). Neste trabalho utilizou-se uma percentagem de 12 % de acrilamida.

3.4.2. Preparação da amostra de eletroforese

Após testes com diferentes concentrações de diluição, os melhores resultados de corrida de eletroforese ocorreram para os extratos que foram diluídos com água ultrapura a 5 mg/mL para amostras de liofilizado de mosto e 2 mg/mL para

amostras de malte. De seguida as amostras (10 µL) foram misturadas com tampão de carregamento Laemmli (10 µL) na proporção de 1:1. Para cada amostra, foram testadas duas condições de análise: condições não desnaturantes (sem nenhum tipo de tratamento adicional) e condições desnaturantes, cujo as ligações de hidrogênio foram rompidas através do calor (95°C /5 min) e as ligações de dissulfeto rompidas com componente químico (50 mM de beta-mercaptoetanol).

(27, 29, 37)

3.4.3. Aplicação da amostra no Gel

Os géis foram inseridos no sistema de de eletroforese (Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), e submersos em tampão 1× Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).^(27, 29) Adicionou-se 3 µL de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standard 10-250 kDa (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA) no primeiro poço de cada gel. Aplicou-se 10 µL de cada amostra nos restantes poços. O equipamento de eletroforese foi ligado a 130 V, até as amostras atingirem o gel de separação (10-15 minutos). Em seguida a voltagem foi aumentada para 160 V e os géis foram monitorizados durante 45 a 55 minutos. No final da corrida, os géis foram retirados da cuba e dos vidros e incubados em solução corante Coomassie Staining Solution (1,25 g de Coomassie G-250, 500 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial, 400 mL de água ultrapura) em agitação constante durante 10 minutos. Após o processo de coloração, a solução corante foi removida e substituída por solução descolorante (50 mL de metanol, 70 mL de ácido acético glacial, 880 mL de água ultrapura), trocada de 2 a 3 vezes. O gel foi mantido na solução descorante, a

cerca de 4 °C de um dia para o outro ⁽²⁷⁾. Por fim, os géis foram fotografados (Gel DocTM EZ Imager, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

3.5. Análise estatística

Com os dados obtidos na quantificação de proteínas foi verificado (i) se havia ou não distribuição da normal pelo teste de Shapiro-Wilk ajustado pelo método de Holm; (ii) a homogeneidade de variância testada pelo teste Levene; e (iii) a comparação das médias por ANOVA seguida de teste Tukey. Testes realizados em R versão 4.2.2 e IBM SPSS Statistics versão 29.0.0.0.

4. Resultados

4.1. Humidade

O teor de humidade dos grãos de malte foi quantificado em 4,72 %.

Foi estipulado 6% como valor crítico de humidade máximo devido a qualidade sensorial ⁽³⁸⁾. Valores de humidade acima de 13% são propícios a risco de contaminação fúngica⁽³⁹⁾.

4.2. Quantificação de proteínas totais

De acordo com os resultados obtidos pelo método de Kjeldahl ⁽³¹⁾, o malte continha $9,2 \pm 0,6$ g de proteínas totais em 100 g de amostra. Por sua vez o mosto possuía cerca de $4,5 \pm 0,6$ g/ 100 g, cerca de 50 % da proteína originalmente presente no malte. Este resultado demonstra uma diminuição significativa ($p < 0.001$) na quantidade de proteínas totais.

4.3. Quantificação de proteínas solúveis

Para avaliação das proteínas solúveis, começou por se utilizar o método de medição por UV de forma a obter um valor de concentração aproximado (Tabela Suplementar 2). Com base nesse valor efetuaram-se as diluições necessárias para que o valor de concentração se encontrasse dentro dos valores da curva de calibração do método de BCA. Os valores de concentração obtidos pelo método de UV, sugerem que as amostras de mosto liofilizado continham mais proteínas solúveis (14,38 - 18,24 mg/ml) do que as amostras de malte (9,84 -11,71 mg/ml) (Tabela suplementar 2). Com base na concentração de proteína estimada pelo método de UV-Vis, utilizou-se um fator de diluição de 30 para que todas as amostras ficassem com concentração de proteínas dentro da curva de calibração do BCA (0-2 mg/ml) (Tabela Suplementar 3). A Figura 1 representa as concentrações de proteínas extraídas nas diferentes condições (Tabela Suplementar 2), sendo possível observar que as amostras de mosto apresentaram maiores quantidades de proteínas solúveis em comparação com as amostras de grãos de malte. Em média o mosto e o malte apresentaram, respetivamente, 8,8 ($\pm 0,6$) e 4,6 ($\pm 0,4$) mg de proteínas solúveis por 100 g de amostra.

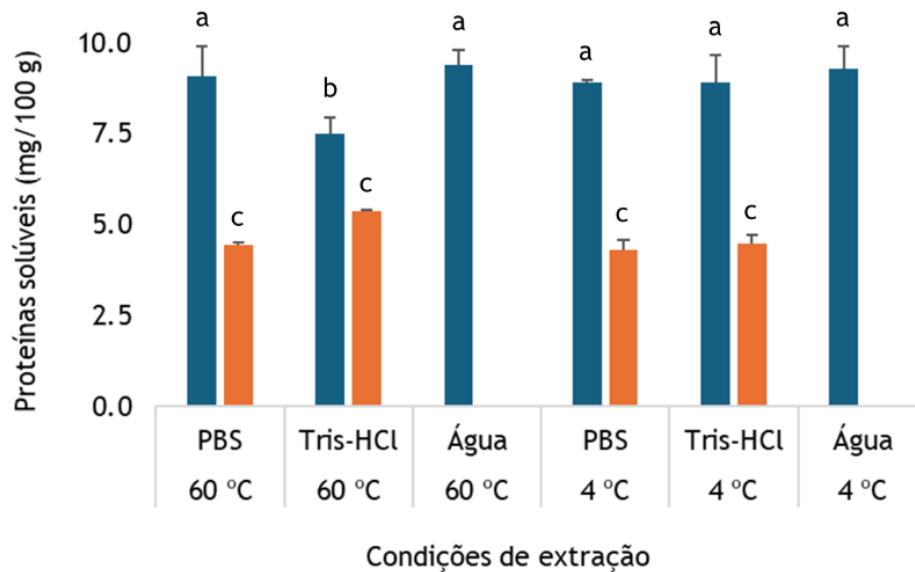


Figura 1: Concentração de proteínas solúveis (mg/100 g) no mosto (azul) e malte (laranja) em diferentes condições de extração. Letras diferentes indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$).

Uma vez que amostras apresentaram homogeneidade de variância, ANOVA de fator único seguida de teste Tukey foi utilizada para comparar as médias da quantificação de proteínas solúveis. O resultado do teste reforçou a diferença significativa que há entre as amostras mosto e cevada, também demonstrando que não houve diferenças significativas quando estes são extraídos por diferentes tratamentos de tampão e temperatura. Com exceção da amostra de mosto extraída com Tris-HCl a 60 °C, que apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) para todas as demais extrações. ANOVA com dois fatores foi realizada para perceber a influência da amostra, tampão e temperatura no processo de extração e quantificação das proteínas solúveis pelo método de BCA. A amostra ($p < 0,001$) e o tipo de tampão ($p = 0,03$) tiveram impacto para diferenciar a concentração de proteínas. Facto devido ao baixo valor na quantidade de proteínas solúveis ($7,5 \pm 0,5$ mg/100 g) nas amostras de mosto extraída com Tris-HCl a 60 °C. A temperatura de extração não demonstrou influência ($p = 0,85$) na quantificação das proteínas.

4.4. Electoforese SDS

De forma a obter a mesma quantidade de proteínas em cada amostra foram feitas diferentes diluições com água ultrapura (Anexo A) para que as amostras atingissem as concentrações de 5 e 2 mg/mL para amostras obtidas de mosto e grãos de malte respectivamente.

A análise geral dos géis de SDS-PAGE (Figura 2A e 2B) mostra que as condições testadas permitiram extrair várias proteínas do malte com pesos moleculares entre os 10 e os 70 kDa com destaque para as bandas com peso molecular de ~60, 45, 42, 35, 30 ou 15, 25, 22, 19 e 5-10 kDa (Figura 2A e 2B, poços 4,5,9,10). No caso do mosto são apenas visíveis três bandas aos 42, 25-30 ou 15 kDa e 5-10 kDa (Figura 2A e 2B, poços 1, 2, 3, 6, 7, 8).

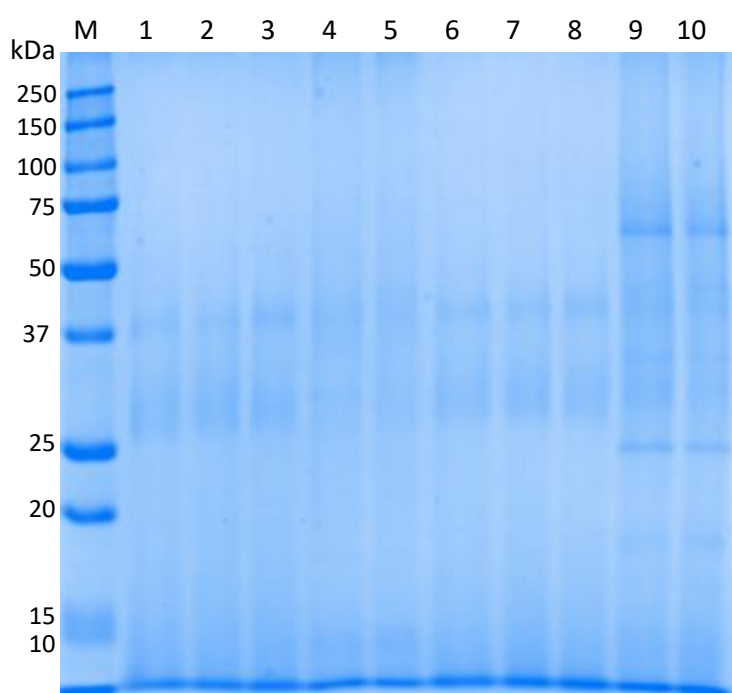
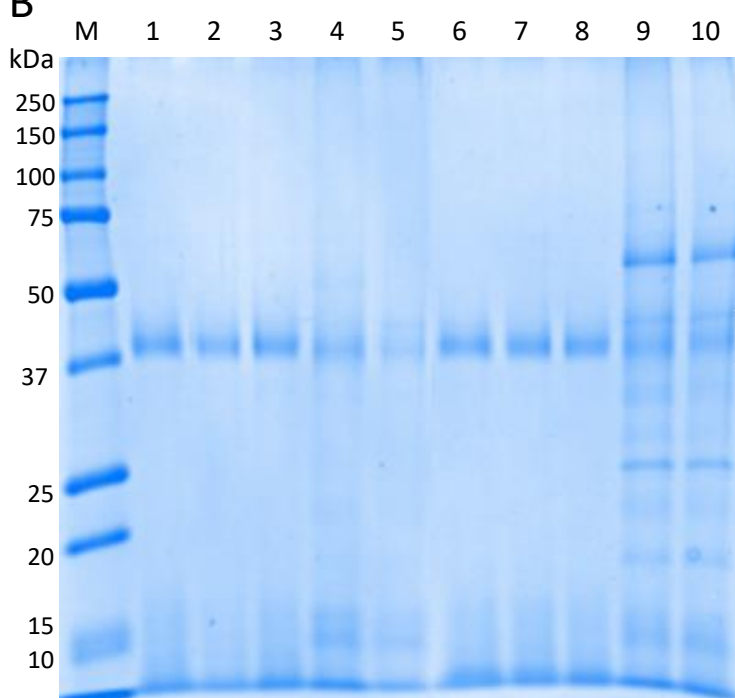
A**B**

Figura 2. Gel de SDS-PAGE e condições A) não desnaturantes, B) desnaturantes. Poço M -marcador molecular; Poço 1-mosto PBS 60 °C; Poço 2-mosto Tris-HCl 60 °C; Poço 3-mosto água 60 °C; Poço 4-malte PBS 60 °C; Poço 5-malte Tris-HCl 60 °C; Poço 6-mosto PBS 4 °C; Poço 7-mosto Tris-HCl 4 °C; Poço 8-mosto água 4 °C; Poço 9-malte PBS 4 °C; Poço 10-malte Tris-HCl 4 °C.

No geral verificou-se que os perfis proteicos do mosto não são afetados pelo tampão de extração, contudo, a extração a 4 °C *overnight* permite obter um perfil proteico mais bem definido e com mais bandas no caso do malte tanto em condições não desnaturantes (Figura 2A, poços 9 e 10) como desnaturantes (Figura 2B, poços 9 e 10). Nestas condições são visíveis três bandas (60 kDa, 30 kDa e 25 kDa) que não são visíveis nas extrações realizadas a 60 °C durante 2 h (Figura 2A, poços 4 e 5).

A comparação entre os géis corridos em condições não desnaturantes (Figura 2A) e os géis corridos em condições desnaturantes (Figura 2B) mostra que em condições desnaturantes foi possível obter um perfil proteico com maior resolução tanto para o malte como para o mosto. A principal diferença no perfil de bandas dos dois géis está na banda a 30 kDa que é visível em condições não desnaturantes no malte e no mosto, mas que em condições desnaturantes desapareceu originando uma nova banda a 15 kDa em ambas as amostras.

5. Discussão

Na literatura estima-se para o grão maltado valores totais de proteínas entre 9,0 a 11,5 g /100 g ⁽⁴⁰⁾. Neste trabalho obteve-se um valor de 9,2 g/100 g.

A literatura sugere que a proteína solúvel extraída dos grãos para o mosto pode variar entre 40% ⁽⁴¹⁾ a 57% ⁽⁵⁾ do valor total de proteínas, dependendo dos métodos de processamento usados durante a maltagem e mosturação. Pelo método de

Kjeldahl os valores totais de proteínas no liofilizado de mosto foram de 4,5g / 100 g de amostra de mosto, o que representa cerca de 50% da proteína total do grão (9,2 g/100 g), o que está de acordo com a literatura.

Em relação à extração destas proteínas solúveis no malte, estima-se que seja possível extrair 7 mg/100 g de malte seco, enquanto para o liofilizado de mosto 7-10 mg/100 ml de liofilizado de mosto ^(9, 41). Os valores de proteínas solúveis obtidos para o malte foram 4,5 mg/100 g de malte seco, valor abaixo da literatura, enquanto para o liofilizado de mosto apresentou para proteínas solúveis 8.8 mg/100 g de amostra de liofilizado de mosto, conforme a literatura. Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, ao apresentar maior quantidade de proteínas solúveis no mosto do que no malte ⁽³²⁾.

Entre as opções de otimização de extração de proteínas, a literatura sugere seguir estratégias que visem melhorar a extração e seletividade das proteínas extraíveis. Sendo assim, é descrito como o mais sustentável, os tratamentos hidrotérmicos controlados. O tratamento hidrotérmico apresentou bons resultados para o processo de otimização de extração de proteínas e por não requerer adição de produtos químicos, é tido como potencial alternativa sustentável ao processo de pré-tratamento químico ou enzimático, de forma não prejudicial à estrutura do grão e qualidade da proteína ⁽⁴²⁾. O pré-tratamento hidrotérmico a 60 °C condicionou uma extração de proteína os valores entre 64 e 66 % de grãos que possuíam valores de proteínas totais iguais a 22,44 g $\pm$ 2,70 por 100 g. ⁽⁴²⁾

A análise dos géis de SDS-PAGE sugere que tanto os tampões Tris-HCl e PBS como a água são adequados para a extração de proteínas de mosto originando perfis

proteicos muito semelhantes. O mesmo se verificou para o malte, no qual o Tris-HCl e o PBS originaram perfis muito semelhantes entre si.

A condições de temperatura (4 °C vs 60 °C) e tempo de extração (*overnight* vs 2h) não afetaram o perfil proteico do mosto, mas o mesmo não se verificou no caso do malte para o qual uma temperatura de extração mais baixa (4 °C), mas com uma incubação mais prolongada (*overnight*, ~17h), se mostrou mais eficiente resultando no aumento do número de bandas.

A análise global do perfil de bandas do mosto mostra a existência de três bandas, duas das quais (42, e 5-10 kDa) não foram afetadas pelas condições de desnaturação. A literatura sugere que a banda a 42 kDa corresponde às proteínas Z ⁽⁴³⁾ e a banda a 5-9 kDa corresponde a proteínas de transferência de lípidos (LTPs) ⁽¹²⁾. A proteína Z é a principal albumina da cevada, com uma massa molecular de 40 kDa e que representa cerca de 5 % da albumina total da cevada. Esta é estável ao calor e resistente à degradação enzimática, o que significa que sobrevive inalterada ao processo de fabrico da cerveja e é uma das principais proteínas ainda presentes na cerveja juntamente com as LTPs. As LTPs são divididas em duas classes, as ns-LTP1 e ns-LTP2, que representam de 5 a 10 % do total de proteínas solúveis de grãos maltados ⁽⁴⁴⁾.

Sugere-se que as β -hordeínas ricas em pontes de dissulfeto foram identificadas nas bandas de 30 kDa nos géis em condições não desnaturantes, posteriormente nos géis com condições desnaturantes fragmentos desnaturados destas B-hordeínas foram originados, possuindo aproximadamente massas molecular de 15 kDa cada.

Não existe na literatura nenhuma proteína identificada no malte ou no mosto com 25-30 kDa, contudo está descrito que durante o processo de maltagem mais de

70 % das proteínas do grão de cevada, principalmente hordeínas B e D e glutelina, são degradadas por endoproteases originando péptidos mais pequenos. É, portanto, possível que esta banda de aproximadamente 25-30 kDa obtida em condições não desnaturantes seja composta por fragmentos de hordeínas ⁽⁴⁵⁾. Nos géis corridos em condições desnaturantes a estrutura terciária e quaternária das proteínas é destruída através da temperatura (95 °C) e da redução das pontes dissulfureto por ação do beta-mercaptoetanol ⁽⁴⁶⁾. Sendo as hordeínas B ricas em enxofre é possível que esta banda a 30 kDa corresponda á um fragmento de uma hordeína B que se desnaturou originado duas cadeias de 15 kDa cada⁽⁴⁷⁾.

É um consenso de que, uma vez que a qualidade das proteínas solúveis, LTPS e Proteínas Z sejam responsáveis pela quantidade de espuma formada e estabilidade da espuma, estima-se que este trabalho possa contribuir com a redução de dependência de aditivos na criação de cervejas mais aromáticas ⁽⁴⁸⁾

6. Conclusões

O mosto apresentou ser melhor alternativa que o malte para a extração de proteínas solúveis, visto que, apesar do malte conter o dobro de proteínas totais, o mosto apresentou quantidades maiores de proteínas solúveis.

Não se verificaram diferenças no perfil proteico dos extratos obtidos com os diferentes tampões de extração testados tanto no malte como no mosto.

As condições de extração não influenciaram o perfil proteico do mosto, mas tiveram uma influência relevante no caso do malte para o qual a temperatura de 4 °C, *overnight* se verificou mais eficiente originado maior número de bandas.

Foi possível identificar no mosto fragmentos de hordeínas ricas em ligações de dissulfeto, Proteínas Z, e as proteínas de transferência lipídica (LTP1 e LTP2).

7. Sugestões

Fazer novos testes com diferentes variedades de grãos de malte, realizar diferentes métodos de produção de mosto cervejeiro. Recomenda-se a utilização de um LC- MS juntamente com um *software* de bancos de dados a fim de identificar as proteínas do malte e do mosto. Também a utilização de equipamento MALDI-TOF- MS com intenção específica identificar as proteínas de malte solúveis em água e soluveis em sais. É provado na literatura que a combinação destes métodos com testes imunológicos pode trazer resultados mais precisos das características do malte.

ANEXO A

Tabela Suplementar 1. Composição dos géis de SDS-PAGE

Reagentes	gel separador (2 géis)	gel de empacotamento (2 a 5 géis)
Poliacrilamida	12%	5%
H ₂ O (mL)	0,888	5.833
Separating gel buffer 4x (mL)	3,000	-
Stacking gel buffer 4x (mL)	-	2.500
Acryl/Bis 37:5:1 solution (mL)	7,920	1.667
SDS 10% (μL)	120	100
TEMED (μL)	12	20
APS 10% (μL)	60	50
Bromophenol blue 10% (μL)	-	20
volume total (mL)	12	10

Protocolo referência para preparo de géis de separação e géis de empacotamento com respectivas % de poliacrilamida

Tabela Suplementar 2. Valores de concentração de proteínas obtidos pelo método de UV/VIS e BCA.

Amostra	Tampão de extração	Condições de extração	Concentração de proteínas (mg/mL) método UV-Vis	Concentração de proteínas (mg/mL) método BCA
Mosto	PBS	60 °C, 2 horas	17,716 ± 0,208	12,079 ± 1,124
Mosto	Tris-HCl	60 °C, 2 horas	14,3835 ± 0,149	9,997 ± 0,603

Mosto	Água	60 °C, 2 horas	17,654 ± 0,051	12,530 ± 0,724
Malte	PBS	60 °C, 2 horas	10,6815 ± 0,080	5,909 ± 0,077
Malte	Tris-HCl	60 °C, 2 horas	11,7095 ± 0,028	7,134 ± 0,067
Mosto	PBS	4°C, overnight	17,506 ± 0,388	11,868 ± 0,077
Mosto	Tris-HCl	4°C, overnight	17,3215 ± 0,261	11,890 ± 1,003
Mosto	Água	4°C, overnight	18,237 ± 0,030	12,380 ± 0,798
Malte	PBS	4°C, overnight	9,835 ± 0,041	5,720 ± 0,357
Malte	Tris-HCl	4°C, overnight	10,195 ± 0,024	5,976 ± 0,292

Tabela de concentrações de proteínas solúveis presentes em amostras de malte e liofilizado de mosto utilizando soluções de extração PBS;Tris-HCL;Água em diferentes temperaturas e tempo de contacto entre amostras e soluções de extração, respectivamente 60°C durante 2 horas e 4°C durante 17 horas

Tabela Suplementar 3. Cálculos para a concentração de proteínas das amostras por BCA, e respetivas diluições das concentrações de proteínas obtidas que para serem utilizadas para aplicação em gel de eletroforese.

Amostra	Concentração de proteínas solúveis (mg/mL)	Volume amostra (uL)	Volume (H2O) (uL)	Concentração final (mg/mL)
Mosto 60 °C	12,08	41,4	58,6	5
Mosto Tris-HCl 60 °C	10,00	50,0	50,0	5
Mosto água 60 °C	12,53	39,9	60,1	5
Malte PBS 60 °C	5,91	33,8	66,2	2
Malte Tris- HCl 60 °C	7,13	28,0	72,0	2
Mosto PBS 4 °C	11,87	42,1	57,9	5
Mosto Tris-HCl 4 °C	11,89	42,1	57,9	5
Mosto água 4 °C	12,38	40,4	59,6	5
Malte PBS 4 °C	5,72	35,0	65,0	2
Malte Tris -HCL 4 °C	5,98	33,5	66,5	2

Tabela de diluição de amostras de malte e liofilizado de mosto (µL) em água ultra pura (µL) para obtenção de concentração final estipulada para aplicações em géis (mg/mL)

Agradecimentos

This research was supported by national funds (FCT) through project Hypoallergen (PTDC/BAA-AGR/4005/2021), strategic funding from FCT/MCTES (UIDB/50006/2020|UIDP/50006/2020).

Referências

1. Statista [webpage]. Statista Research Department; cop. 2024. [atualizado em: 2024 Mar 7; citado em: 2024 Mai 27]. Biens de consommation: Boissons alcoolisées: Production mondiale de bière 1998-2022. Disponível em: <https://fr.statista.com/statistiques/1323646/production-mondiale-biere/>.
2. Presidência do Conselho de Ministros. Decreto-Lei n.º 2/2022, de 4 de janeiro. Diário da República nº 2/2022, Série I; 2(2022-01-04): 10-14. Estabelece as características e regras de produção, denominação legal, comercialização e regras de rotulagem das cervejas.
3. FoodData Central [webpage]. US Department of Agriculture; cop. 2024. [atualizado em: 2018; citado em: 2024 Mai 27]. Barley, hulled. Disponível em: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170283/nutrients>.
4. Palmer JJ. How to brew: everything you need to know to brew great beer every time. Brewers Publications; 2017.
5. Jones BL, Budde AD. How various malt endoproteinase classes affect wort soluble protein levels. Journal of Cereal Science. 2005; 41(1):95-106.
6. Yahya H, Linforth RST, Cook DJ. Flavour generation during commercial barley and malt roasting operations: A time course study. Food Chemistry. 2014; 145:378-87.
7. Celus I, Brijs K, Delcour JA. The effects of malting and mashing on barley protein extractability. Journal of Cereal Science. 2006; 44(2):203-11.

8. Gallone B, Steensels J, Prah T, Soriaga L, Saels V, Herrera-Malaver B, et al. Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*. 2016; 166(6):1397-410.e16.
9. Krstanović V, Habschied K, Lukinac J, Jukić M, Mastanjević K. The Influence of Partial Substitution of Malt with Unmalted Wheat in Grist on Quality Parameters of Lager Beer. *Beverages*. 2020; 6(1)
10. Jaeger A, Zannini E, Sahin AW, Arendt EK. Barley Protein Properties, Extraction and Applications, with a Focus on Brewers' Spent Grain Protein. *Foods*. 2021; 10(6)
11. Kapp GR, Bamforth CW. The foaming properties of proteins isolated from barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2002; 82(11):1276-81.
12. Stanislava G. Barley Grain Non-specific Lipid-Transfer Proteins (ns-LTPs) in Beer Production and Quality. *J I Brewing*. 2007; 113(3):310-24.
13. Jégou S, Douliez J-P, Mollé D, Boivin P, Marion D. Evidence of the Glycation and Denaturation of LTP1 during the Malting and Brewing Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49(10):4942-49.
14. Silva F, Ferreira IMPLVO, Teixeira N. Polipeptídeos e proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja e métodos analíticos utilizados no seu estudo. *Química Nova*. 2006; 29(6):1326-31.
15. Klose C, Thiele F, Arendt EK. Changes in the Protein Profile of Oats and Barley during Brewing and Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2018; 68(2):119-24.
16. Curioni A, Pressi G, Furegon L, Peruffo ADB. Major Proteins of Beer and their Precursors in Barley: Electrophoretic and Immunological Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 43(10):2620-26.
17. Niu C, Han Y, Wang J, Zheng F, Liu C, Li Y, Li Q. Malt derived proteins: Effect of protein Z on beer foam stability. *Food Bioscience*. 2018; 25:21-27.
18. Van Nierop SNE, Evans DE, Axcell BC, Cantrell IC, Rautenbach M. Impact of Different Wort Boiling Temperatures on the Beer Foam Stabilizing Properties of Lipid Transfer Protein 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(10):3120-29.
19. Steiner E, Gastl M, Becker T. Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: a review. *European Food Research and Technology*. 2011; 232(2):191-204.
20. Kerr ED, Caboche CH, Schulz BL. Posttranslational Modifications Drive Protein Stability to Control the Dynamic Beer Brewing Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2019; 18(9):1721-31.
21. Berner T, Jacobsen S, Arneborg N. The impact of different ale brewer's yeast strains on the proteome of immature beer. *BMC Microbiology*. 2013; 13(1)
22. Li X, Yang J, Xie L, Jin Y, Liu J, Xing W. The effect of barley to wheat ratio in malt blends on protein composition and physicochemical characteristics of wort and beer. *Journal of Food Science*. 2022; 88(1):193-203.
23. Liu F, Chen Z, Wang L, Wang R. Effects of protein solubilisation and precipitation pH values on the functional properties of defatted wheat germ protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*. 2013; 48(7):1490-97.
24. Cavonius LR, Albers E, Undeland I. pH-shift processing of *Nannochloropsis oculata* microalgal biomass to obtain a protein-enriched food or feed ingredient. *Algal Research*. 2015; 11:95-102.

25. Branlard G, Bancel E. Protein Extraction from Cereal Seeds. In: Plant Proteomics. 2006. p. 15-26.
26. Bose U, Broadbent JA, Byrne K, Hasan S, Howitt CA, Colgrave ML. Optimisation of protein extraction for in-depth profiling of the cereal grain proteome. *Journal of Proteomics*. 2019; 197:23-33.
27. Weber K, Osborn M. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*. 1969; 244(16):4406-12.
28. Kanerva P, Sontag-Strohm T, Lehtonen P. Determination of Prolamins in Beers by ELISA and SDS-PAGE. *J I Brewing*. 2005; 111(1):61-64.
29. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-85.
30. Trudel J, Grenier J, Asselin A. Detection of enzymes active on various β -1, 3-glucans after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2005; 19(10):1788-92.
31. Kjeldahl J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*. 1883; 22(1):366-82.
32. Osman AM, Coverdale SM, Onley-Watson K, Bell D, Healy P. The Gel Filtration Chromatographic-Profiles of Proteins and Peptides of Wort and Beer: Effects of Processing - Malting, Mashing, Kettle Boiling, Fermentation and Filtering. *J I Brewing*. 2003; 109(1):41-50.
33. Lepkovsky S. The Distribution of Serum and Plasma Proteins in Fish. *Journal of Biological Chemistry*. 1930; 85(2):667-73.
34. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*. 1988; 175(1):231-37.
35. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry*. 1989; 180(1):136-39.
36. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 1985; 150(1):76-85.
37. Martin AH, Nieuwland M, de Jong GAH. Characterization of Heat-Set Gels from RuBisCO in Comparison to Those from Other Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62(44):10783-91.
38. BrewUp [webpage]. The Brewers of Europe; cop. 2023. [atualizado em: 2018 Out 22; citado em: 2024 Mai 27]. *Analytica EBC: 451 - Extract of Malt: Congress Mash*. Disponível em: <https://brewup.eu/ebc-analytica/malt/extract-of-malt-congress-mash/4.5.1>.
39. Atalla MM, Hassanein NM, El-Beih AA, Youssef YAG. Mycotoxin production in wheat grains by different Aspergilli in relation to different relative humidities and storage periods. *Food / Nahrung*. 2003; 47(1):6-10.
40. Paynter B. Grain protein and malting quality in barley. 1996.
41. Barrett J, Kirsop BH. The Relative Contributions to Wort Nitrogen of Nitrogenous Substances Solubilized during Malting and Mashing. *J I Brewing*. 1971; 77(1):39-42.

42. Qin F, Johansen AZ, Mussatto SI. Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. *Industrial Crops and Products*. 2018; 125:443-53.
43. Hejgaard J, Kaersgaard P. Purification and Properties of the Major Antigenic Beer Protein of Barley Origin. *J I Brewing*. 1983; 89(6):402-10.
44. Douliez JP, Michon T, Elmorjani K, Marion D. Mini Review: Structure, Biological and Technological Functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the Major Lipid Binding Proteins from Cereal Kernels. *Journal of Cereal Science*. 2000; 32(1):1-20.
45. Skerritt JH, Janes PW. Disulphide-bonded 'gel protein' aggregates in barley: Quality-related differences in composition and reductive dissociation. *Journal of Cereal Science*. 1992; 16(3):219-35.
46. de Wreede I, Stegemann H. Determination of proteins in the presence of large quantities of sodium-dodecyl-sulphate and mercapto-ethanol by a modified biuret-method. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*. 1981; 308(5):431-33.
47. Gupta M, Abu-Ghannam N, Gallagher E. Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010; 9(3):318-28.
48. Evans DE, Robinson LH, Sheehan MC, Tolhurst RL, Hill A, Skerritt JS, Barr AR. Application of Immunological Methods to Differentiate between Foam-Positive and Haze-Active Proteins Originating from Malt. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2018; 61(2):55-62.

