



Influência da temperatura na extração de proteínas do resíduo de cervejaria utilizando diferentes metodologias

Leonardo Bonventre Neto^a, Aurenice Maria Mota da Silva^a, Ana Carla Kawazoe Sato^a, Paula Speranza^a

School of Food Engineering, Unicamp, Campinas, Brazil – 13083-862 – Campinas, SP

Introdução

O BSG caracteriza-se como um abundante subproduto da indústria cervejeira (correspondendo à ~85% dos sub-produtos gerados), no qual é produzido durante o processo de fermentação da cerveja, separando o mosto da parte insolúvel (peptídeos, aminoácidos, carboidratos), sendo esse último, o BSG. Anualmente são produzidas cerca de 30 milhões de toneladas, sendo que, geralmente esse subproduto é destinado para ser utilizado como ração animal, porém, normalmente ele contém cerca de 20% de proteínas, podendo ser considerado uma fonte proteica, com potencial para ser utilizado como um ingrediente pela indústria alimentícia.

Portanto, com o intuito de obter a fração proteica do BSG, este trabalho teve como objetivo obter um concentrado proteico dos resíduos de cervejaria através das extrações alcalina seguida de precipitação no ponto isoelétrico, alcoólica, salina, com assistência do ultrassom e extração enzimática, com a finalidade de compará-las em relação aos seus rendimentos e de encaminhar um possível estudo de suas propriedades tecnológicas para utilização na indústria de alimentos, agregando assim, valor ao subproduto.

Materiais e métodos

O BSG foi seco em estufa à 60°C/20h e triturado em farinha antes de seguir para as extrações.

Para a extração proteica foram utilizadas as seguintes metodologias:

1. Extração alcalina: Mistura da farinha com água 1:20 (m/v), com solubilização em pH 10 e precipitação no pI (determinado anteriormente).
2. Extração salina: Solubilização da farinha com NaCl 0,8M + NaH₂PO₄ 0,05M 1:10 (m/v), diálise em membrana e precipitação no pI.
3. Extração alcoólica: Solubilização da farinha com água 1:20 (m/v) em NaOH + etanol 95% 1:15 (v/v).
4. Ultrassom: Foi utilizada em potência de 350W por 20 min previamente as extrações
5. Extração enzimático-alcalino: Tratamento com 1% e 2% de celulase previamente a extração alcalina.

Composição centesimal

A composição química da farinha integral do BSG é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química (g/100g) da farinha do resíduo de cervejaria (BSG) base seca.

Carboidratos	Fibras totais	Proteínas	Lipídeos	Cinzas
49,36 ± 5,56	19,52 ± 1,49	19,20 ± 0,43	8,52 ± 1,19	3,40 ± 0,82

Os resultados de composição química obtidos encontram-se dentro dos valores relatados na literatura (Jay *et al.*, 2008). De acordo com Lynch *et al.* (2016) sua composição típica para o teor proteico é de 19 a 30%, em base seca. O BSG é um subproduto obtido durante o processo de fermentação da cerveja, no qual há a separação da fração solúvel, contendo majoritariamente carboidratos fermentáveis e não-fermentáveis, proteínas solúveis, que sofrerão ação enzimática para serem transformados no mosto, e a fração insolúvel (BSG), constituído de proteínas e carboidratos insolúveis como a celulose e a hemicelulose (Lynch *et al.*, 2016).

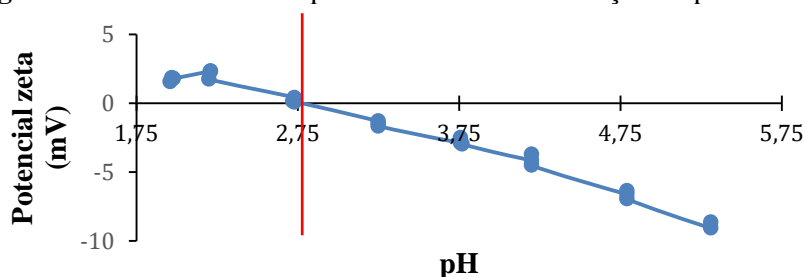


Portanto, o BSG além de ser um abundante subproduto da indústria cervejeira (Ikram *et al.*, 2017) possui um elevado teor de proteínas, apresentando-se como uma potencial fonte desse ingrediente para aplicações na indústria alimentícia.

Ponto isoelétrico das proteínas do BSG.

A curva de titulação do potencial zeta da BSG é apresentada na Figura 1:

Figura 1. Potencial zeta das proteínas do BSG em função do pH.



Observando a Figura 1, é possível verificar que o ponto isoelétrico corresponde ao pH 2,79 (identificado pela linha vertical vermelha) no qual se encontra em acordo com os demais autores, como ARAUZO *et al.* (2019) e VIEIRA *et al.* (2014) que utilizaram pH 3,0 para precipitação total das proteínas. É importante verificar o pI porque nesse valor de pH, a carga líquida efetiva da molécula de proteína se encontra próxima da neutralidade, favorecendo as interações proteína-proteína em detrimento das interações proteína-solvente e, portanto, é relacionada à condição de menor solubilidade das proteínas.

Obtenção dos extratos proteicos de BSG.

O teor de proteína dos extratos obtidos a partir dos diferentes ensaios de extração são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Teor de proteínas (mg/mL) presentes nos extratos proteicos.

	Extração alcalina	Extração salina	Extração alcoólica
25°C	0,45 ± 0,05 ^{Ba}	0,19 ± 0,08 ^{Ab}	0,07 ± 0,03 ^{Bb}
40°C	0,57 ± 0,05 ^{Aa}	0,19 ± 0,01 ^{Ab}	0,17 ± 0,05 ^{Ab}
60°C	0,66 ± 0,09 ^{Aa}	0,15 ± 0,03 ^{Ab}	0,13 ± 0,03 ^{Ab}

Letras maiúsculas iguais na vertical indicam que não há diferença entre temperaturas para um mesmo método ($p > 0,05$).

Letras minúsculas iguais na horizontal indicam que não há diferença entre os métodos à uma mesma temperatura ($p > 0,05$).

Através da Tabela 2, pode-se observar que o aumento da temperatura de 25°C para 40°C aumentou significativamente ($p < 0,05$) o rendimento de extração para as extrações alcalina e alcoólica. No entanto, o rendimento de extração à 60°C mostrou-se estatisticamente igual à extração realizada à 40°C para a solubilização em todos os solventes. Pode-se inferir, através desse resultado que, até a temperatura de 40°C houve atuação efetiva dos solventes alcalino e orgânicos na parede celular da matriz vegetal do BSG, pois de acordo com Wang *et al.* (2015) e Goldstein (1986), esses solventes, respectivamente, promovem a disruptura da parede celular de matrizes vegetais, promovendo uma penetração mais facilitada dos mesmos para que possam solubilizar as proteínas no interior da célula.

Uma explicação para os valores entre 40 e 60°C serem estatisticamente iguais pode residir que, em pH e forças iônicas constantes, a solubilidade da maioria das proteínas geralmente possui um aumento até 40°C, sendo que após isso, provavelmente ocorre um



desdobramento e uma desnaturação parcial das proteínas presentes no BSG, com exposição de grupos hidrofóbicos e maior interação proteína-proteína, levando à coagulação e precipitação. Porém, não se pode concluir o mesmo para a extração salina, pois, provavelmente a solução salina pode não promover um impacto na parede celular a ponto de se obter diferenças significativas, promovendo o processo conhecido como “salt-in”, agindo na fração proteica mais suscetível à solubilização na matriz vegetal. A extração alcalina apresentou o melhor desempenho em relação à extração salina e alcoólica, pois como o pH de solubilização (pH 10) é muito distante do pI da farinha (2,79) isso pode ter acarretado numa solubilização quase total das proteínas presentes na matéria-prima, explicando o resultado elevado do extrato proteico.

Deve-se ainda considerar que a fração de proteínas solúveis em soluções salinas, as “albuminas”, encontram-se em pouca quantidade em relação a fração proteica do BSG. Uma vez que o método salino favorece a solubilização dessa fração específica, os resultados obtidos são baixos.

A menor concentração de proteínas foi observada para a extração alcoólica em relação à salina, pois a diluição inicial no qual a alcoólica foi submetida era maior do que a salina devido às metodologias utilizadas para cada extração (1:10 para a salina e 1:36 para a alcoólica). De acordo com Ikram *et al.* (2017) e Day (2013), as proteínas mais abundantes do BSG são as hordeínas (fração proteica solúvel em álcool). No entanto, a baixa concentração proteica obtida pode ter sido ocasionada pela concentração da solução alcoólica utilizada (95%) ser elevada, não promovendo uma grande solubilização das demais frações. Além disso, a elevada concentração de etanol utilizada pode ter ocasionado uma desnaturação da fração proteica extraída, como aconteceu com (NIKOLAIDIS *et al.*, 2017) e (HERSKOVITS *et al.*, 1970) que está ligado ao mecanismo de desdobramento das proteínas e consequente agregação das mesmas e uma má solubilização, o que dificultaria o processo de extração. Nikolaidis *et al.* (2017) e Herskovits *et al.* (1970) observaram que o aumento da concentração de soluções alcoólicas levou à desnaturação da proteína do soro de leite (whey) e da mioglobina, respectivamente.

Ademais, as proteínas desnaturadas poderiam precipitar, o que afetaria a quantificação por Bradford, que determina proteínas solúveis, acarretando em valores baixos de concentração. A suspensão das atividades presenciais impossibilitou a quantificação das proteínas totais pelo método de Kjeldahl.

O baixo rendimento de extração observado pelos métodos alcoólicos e salino, também podem ser relacionados à alta concentração de carboidratos presentes na BSG. Como é possível observar na tabela 2, quase 50% da composição centesimal está presente na forma de carboidratos, e de acordo com (LYNCH *et al.*, 2016) as porcentagens de celulose e hemicelulose são respectivamente 12-25% e 20-25%. Esses dois polímeros são caracterizados compondo majoritariamente a parede celular de plantas (HOLTZAPPLE, 2003). Apesar da hemicelulose não ser quimicamente similar à celulose, as duas apresentam em comum insolubilidade em água. De acordo com (LINDMAN *et al.*, 2010; NAZ *et al.*, 2016) em valores elevados de pH a celulose se torna solúvel e de acordo com (HUFFMAN, 2003) as hemiceluloses se tornam solúveis também em soluções alcalinas, porém não apresentam solubilidade em meios salinos e alcoólicos. Portanto, devido as características dos dois polímeros e à sua alta concentração na matéria-prima, os métodos de obtenção de proteínas tanto alcoólico quanto salino resultaram em uma baixa recuperação de proteína, uma vez que a solubilização dos polissacarídeos não ocorre, pois o método de extração salina envolve a utilização de uma solução aquosa (presença de água) e a extração alcoólica, não havendo penetração dos solventes na matriz celular e consequente insolubilização da fração protéica.

Objetivando melhorar o processo de extração das proteínas do BSG, foi testado o ultrassom como método auxiliar à utilização dos solventes. Assim, a melhor condição de temperatura para cada um dos solventes avaliados na etapa anterior foi selecionada, e ultrassom foi aplicado a 350W. Segundo Tomšik *et al.* (2016) o fenômeno de cavitação gerado pelo ultrassom pode contribuir na ruptura da parede celular vegetal auxiliando na etapa de solubilização. Os dados obtidos nessa etapa do projeto se encontram na Tabela 4.



Tabela 4. Teor de proteínas (mg/mL) presentes nos extratos proteicos antes e após o pré-tratamento com ultrassom.

	Extração alcalina 60°C	Extração salina 25°C	Extração alcoólica 40°C
350W	0,32 ± 0,00 ^B	0,19 ± 0,02 ^A	0,07 ± 0,01 ^B
S/ ultrassom	0,66 ± 0,06 ^A	0,19 ± 0,08 ^A	0,17 ± 0,05 ^A

Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre os processos ($p > 0,05$).

Observa-se um efeito negativo ($p < 0,05$) do pré-tratamento com ultrassom no rendimento de extração de proteínas apenas para as extrações alcalina e alcoólica. Já para a extração salina, observou-se uma ausência de efeito do ultrassom. Provavelmente o uso do ultrassom levou à uma desnaturação das proteínas na solução e consequente agregação e precipitação das mesmas, pois de acordo com Preece *et al.* (2017), o tratamento com ultrassom com o grão de soja para obtenção de proteínas levou a uma agregação das mesmas ao invés de ocorrer uma disruptura da parede celular como está descrito na literatura, resultando em uma menor concentração de proteínas solubilizadas.

Devido a isso, extração alcalina proporcionou os melhores resultados quando comparada aos outros métodos e, por isso, foi selecionada para os testes com a enzima Celluclast[®] cujo substrato principal é a celulose (um dos carboidratos mais abundantes do BSG). Nesse sentido, acredita-se que poderia haver um efeito positivo do tratamento com enzima no rendimento de extração proteica. Os resultados desses ensaios são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Teor de proteínas presentes nos extratos proteicos obtidos através de extração enzimática-alcalina (1% e 2%) e alcalina (60°C) em mg/mL.

Extração enzimático- alcalina (1%) 60°C	Extração enzimático- alcalina (2%) 60°C	Extração alcalina 60°C
0,45 ± 0,06 ^A	0,42 ± 0,01 ^A	0,43 ± 0,06 ^{A*}

Letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre os métodos ($p > 0,05$).

*A extração alcalina foi feita novamente devido à mudança do reagente de Bradford.

Através dos resultados, é possível observar que não há diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação as proteínas obtidas utilizando o tratamento enzimático. Mesmo o BSG sendo um subproduto obtido a partir da fermentação da cevada, no qual há consumo de carboidratos, utilizar uma enzima que provoca a lise das ligações restantes entre carboidrato-proteína poderia vir a aumentar a quantidade de proteínas obtidas, o que não foi observado através dos resultados obtidos.

Os resultados não diferirem entre si pode estar relacionado com o elevado teor de lignina presente na estrutura do resíduo de cervejaria, de acordo com (LYNCH *et al.*, 2016), sua quantidade varia de 12 a 28%. A lignina em conjunto com a hemicelulose recobre os filamentos de celulose, portanto, uma maior quantidade de lignina dificultaria mais a hidrólise da celulose utilizando carboidrases, o que acarretaria em resultados um pouco mais elevados ou estatisticamente iguais. Ademais, o BSG apresenta uma complexa estrutura macromolecular, o que contribuiria também para os resultados não apresentarem uma maior extração das proteínas (LYNCH *et al.*, 2016). Se concentrações maiores da enzima celluclast tivessem sido utilizadas, provavelmente ocorreria uma maior solubilização da parede celular do BSG. FORSELL *et al.* (2008) observaram um maior rendimento de extração com o aumento da concentração enzimática no meio, relacionada a maior solubilização das frações dos polissacarídeos presentes na parede celular, portanto, se maiores concentrações enzimáticas tivessem sido utilizadas, provavelmente maiores valores de extrato proteico seriam obtidos.



Rendimentos de Extração

Os valores de concentração proteica foram convertidos para rendimento de extração, como segue a tabela 6 abaixo.

Tabela 6. Rendimentos (%) de extração das extrações principais.

	Extração alcalina	Extração salina	Extração alcoólica
25°C	19,28 ± 1,98 ^{Ba}	4,17 ± 1,69 ^{Ab}	5,20 ± 2,19 ^{Bb}
40°C	21,43 ± 5,75 ^{Aa}	4,20 ± 0,19 ^{Ab}	13,20 ± 3,97 ^{Ac}
60°C	28,20 ± 3,80 ^{Aa}	3,21 ± 0,59 ^{Ab}	10,06 ± 2,17 ^{Ac}

Letras maiúsculas iguais na vertical indicam que não há diferença entre temperaturas para um mesmo método ($p > 0,05$).

Letras minúsculas iguais na horizontal indicam que não há diferença entre os métodos à uma mesma temperatura ($p > 0,05$).

Como dito anteriormente, para a metodologia de extração alcoólica, a diluição inicial é feita com a matéria prima diluída em uma razão 1:20 de água (m/v) + 1:15 (v/v) de NaOH e Etanol, contabilizando no total uma diluição de 1:36 (m/v), enquanto a diluição para a extração salina é feita de 1:10 (m/v). Portanto, durante a conversão de concentração para rendimento, a extração alcoólica apresenta um valor maior em relação a extração salina.

Além disso, em relação a fração proteica, as proteínas solúveis em solução salina, as globulinas, compõem cerca de 10 - 20%, enquanto para a extração alcoólica, sua respectiva fração solúvel, as hordeínas, compõem cerca de 35 - 45%. Portanto, os resultados estão condizentes com a composição teórica proteica do BSG.

Em relação aos outros métodos, a extração alcalina apresentou o maior rendimento porque esse resultado pode ser atribuído principalmente à fração “albumina” que é solúvel em água e as “glutelinas” que são solúveis em soluções alcalinas diluídas, e juntas compõem quase 50% da fração proteica do BSG, além disso, como dito anteriormente, como o pH está distante do ponto isoelétrico da farinha, grande parte das proteínas estariam solubilizadas na solução alcalina, resultando em valores maiores de rendimento.

Porém, como é possível observar, através da tabela 6, os resultados para os rendimentos de extração foram baixos para a extração alcalina e alcoólica e muito baixos para a extração salina.

Em relação aos baixos rendimentos de extração, os mesmos podem ter sido ocasionados devido ao manuseio das amostras, pois durante os processos de extração, são realizadas diversas etapas de transferência de amostras para diferentes recipientes, o que pode ocasionar em grandes perdas. Além disso, deve-se levar em consideração a presença de interferentes na amostra, como a celulose e hemicelulose, que interferem muito nas extrações salina e alcoólicas, levando à resultados muito baixos.

Conclusão

A extração alcalina resultou em maior rendimento de extração. Através de uma revisão ampliada da literatura, pudemos atribuir o baixo rendimento de extração à estrutura da parede celular do BSG, que contém grandes quantidades de celulose e hemicelulose. O tratamento com ultrassom resultou em menor rendimento do que sem a sonicação. Acredita-se que a aplicação do ultrassom levou à agregação das proteínas em solução e consequente precipitação das mesmas, reduzindo o teor de proteínas solúveis quantificada. Por fim, o tratamento enzimático anterior à extração alcalina não resultou em diferenças estatísticas significativas. No entanto, acreditamos que a utilização de concentrações enzimáticas maiores, provavelmente resultaria em maiores rendimentos.