



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ISABELA PEREIRA DIAS

**METODOLOGIA DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA
APLICADA NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE
ENDOPROTEOLÍTICA DO TRIGO**

Londrina
2017

ISABELA PEREIRA DIAS

**METODOLOGIA DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA
APLICADA NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE
ENDOPROTEOLÍTICA DO TRIGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Adelaide Del Pino Beléia.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Dias, Isabela Pereira.

Metodologia da superfície de resposta aplicada na determinação da atividade endoproteolítica do trigo / Isabela Pereira Dias. - Londrina, 2017.
55 f. : il.

Orientador: Adelaide Del Pino Beléia.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Protease - Tese. 2. Germinação - Tese. 3. Maltagem - Tese. 4. Proteína - Tese.
I. Del Pino Beléia, Adelaide . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

ISABELA PEREIRA DIAS

**METODOLOGIA DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA APLICADA NA
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENDOPROTEOLÍTICA DO TRIGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Adelaide Del Pino
Beléia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Maria Brígida Scholz
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

Prof. Dr. Paulo de Tarso Carvalho
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Londrina, 11 de abril de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu forças e coragem para perseverar e vencer a cada etapa concluída até hoje.

Agradeço a minha orientadora, Professora Dra. Adelaide Del Pino Beléia, PhD., pela sua disponibilidade em dividir comigo seu conhecimento, experiência e sabedoria.

Agradeço a meus pais, Francisco, Zélia, e irmã Camila que são um exemplo para mim e que sempre me incentivaram a buscar novos conhecimentos.

Agradeço ao meu marido, Danilo, pelo apoio, paciência e incentivo demonstrado a cada dia.

Agradeço aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por todas as contribuições.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná), especialmente a pesquisadora Dra. Maria Brígida dos Santos Scholz, pelo fornecimento da amostra de trigo para a elaboração deste estudo.

DIAS, Isabela Pereira. **Metodologia da superfície de resposta aplicada na determinação da atividade endoproteolítica do trigo**. 2017. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O trigo é uma planta herbácea, monocotiledônea, pertencente à família das *Poaceae* e ao gênero *Triticum*. As características físicas, químicas, reológicas e enzimáticas são importante para determinar a qualidade do grão. A atividade proteolítica é estudada principalmente durante a germinação, nas farinhas e também na maltagem de cereais. O objetivo do trabalho foi estudar os parâmetros do método da atividade endoproteolítica do trigo: pH, temperatura e tempo de reação, e selecionar as melhores condições de análise para aplicar em grãos de trigo, comparando os resultados com o malte de cevada e malte de trigo comerciais. E finalmente observar o desenvolvimento da atividade endoproteolítica durante a germinação do grão de trigo. As variáveis testadas foram em um intervalo de pH de 5,5 a 6,5, temperatura de 30°C a 50°C e tempo de incubação de 10 a 30 minutos, utilizando a azocaseína como substrato. O tempo e pH foram as variáveis significativas. Após a análise dos resultados, o método definiu um pH de 6,5, temperatura de 50°C e 30 minutos de incubação. A amostra de trigo apresentou atividade 0,101 (Abs 440 nm), enquanto que o malte de cevada comercial apresentou maior atividade endoproteolítica de 0,128 (Abs 440 nm). O trigo germinado no laboratório e teve o desenvolvimento da atividade endoproteolítica, foi determinada a umidade, nitrogênio total e solúvel as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. A maior atividade endoproteolítica foi encontrada após 5 dias de germinação, 0,131 (Abs 440 nm). Foi observado uma relação entre atividade endoproteolítica e nitrogênio solúvel, uma vez que, durante a germinação, quanto maior a atividade enzimática, maior o teor de nitrogênio solúvel.

Palavras-chave: *Triticum*. Protease. Germinação. Maltagem. Proteína.

DIAS, Isabela Pereira. **Response surface methodology applied to the determination of endoproteolytic activity in wheat.** 2017. 55 p. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Wheat is an herbaceous, monocotyledonous plant, belonging to the family *Poaceae* and to the genus *Triticum*. Physical, chemical, rheological and enzymatic characteristics are important to determine grain quality. The proteolytic activity is studied mainly during germination, in flours and in malted grains. The objective of this work was to study the effects of the parameters of the endoproteolytic activity method on wheat: pH, temperature and reaction time, and to select the best analysis conditions to apply to wheat grains, to compare the results with commercial barley malt and wheat malt. And finally observe the development of the endoproteolytic activity during the germination of the grain of wheat. The variables tested were: pH range of 5.5 to 6.5, temperature of 30°C to 50°C and incubation time of 10 to 30 minutes, using azocasein as the substrate. Time and pH were the significant variables. After analyzing the results, the method defined a pH 6.5, temperature of 50°C and 30 minutes of incubation. The wheat sample had an activity of 101 (Abs 440 nm), whereas commercial barley malt had a higher endoproteolytic activity of 0.128 (Abs 440 nm). Germinated wheat at the laboratory had the development of endoproteolytic activity as well as moisture, total and soluble nitrogen accompanied at 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours. The highest endoproteolytic activity was found after 5 days of germination, 0.131 (Abs 440 nm). A relationship between proteolytic activity and soluble nitrogen was observed, since during germination, the higher the enzymatic activity, the higher the soluble nitrogen.

Keywords: *Triticum*. Protease. Germination. Malting. Protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grão de trigo.	13
Figura 2 - Esquema do processo de maltagem.	17
Figura 3 - Fluxograma do preparo do substrato e extrato enzimático.	29
Figura 4 - Fluxograma da determinação da atividade endoproteolítica.	30
Figura 5 - Acondicionamento do trigo para a germinação.	33
Figura 6 - Superfície de resposta da atividade endoproteolítica (Abs 440 nm) em função da temperatura (°C) x pH de incubação do extrato de trigo, fixando a variável tempo em 30 minutos.	38
Figura 7 - Superfície de resposta da atividade endoproteolítica (Abs 440 nm) em função do tempo (min) x pH de incubação do extrato de trigo, fixando a variável temperatura em 50°C.	39
Figura 8 - Superfície de resposta da atividade endoproteolítica (Abs 440 nm) em função do tempo (min) x temperatura (°C) de incubação do extrato de trigo, fixando a variável pH de 6,5.	40
Figura 9 - Desenvolvimento do grão em intervalos de 24 horas durante a germinação do trigo.	46
Figura 10 - Atividade endoproteolítica do trigo durante a germinação.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de incubação da metodologia da atividade proteolítica utilizada por diferentes autores.....	22
Tabela 2 - Condições dos ensaios do planejamento experimental, variando os parâmetros pH, temperatura e tempo de hidrólise.	31
Tabela 3 - Planejamento fatorial (2^3) com repetição no ponto central.....	31
Tabela 4 - Atividade endoproteolítica do trigo em diferentes tempos de incubação.	34
Tabela 5 - Atividade endoproteolítica do trigo em relação a temperatura de incubação.	35
Tabela 6 - Planejamento fatorial (2^3) com as variáveis codificadas e decodificadas e a resposta média de absorbância (440 nm) da atividade endoproteolítica do trigo... ..	36
Tabela 7 - Estimativa dos efeitos e coeficientes do delineamento 2^3	36
Tabela 8 - Atividade endoproteolítica em diferentes temperaturas de incubação.	41
Tabela 9 - Atividade endoproteolítica em diferentes pH do extrato.....	42
Tabela 10 - Valores de umidade, nitrogênio total, nitrogênio solúvel e atividade endoproteolítica das amostras de trigo e maltes comerciais.	43
Tabela 11 - Atividade endoproteolítica, nitrogênio solúvel e teor de umidade do grão de trigo germinado por 144 horas.	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVO	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	TRIGO	12
3.2	PROTEÍNAS DO TRIGO	14
3.3	GERMINAÇÃO	15
3.4	MALTAGEM	17
3.5	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	20
3.6	CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEASES.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	MATERIAL.....	27
4.2	PREPARO DAS AMOSTRAS	27
4.3	MÉTODOS.....	27
4.3.1	Determinação de Umidade	27
4.3.2	Determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta	28
4.3.3	Determinação de Nitrogênio Solúvel	28
4.3.4	Determinação da Atividade Endoproteolítica.....	29
4.3.5	Testes Preliminares	30
4.3.6	Planejamento Experimental.....	31
4.3.7	Testes Complementares.....	32
4.3.8	Germinação	32
4.3.9	Análise Estatística	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	TESTES PRELIMINARES	34
5.2	RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
5.3	TESTES COMPLEMENTARES.....	41
5.4	COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS DOS MALTES COMERCIAIS E DO GRÃO DE TRIGO	43
5.5	CONTROLE DA GERMINAÇÃO DO GRÃO DE TRIGO.....	45
6	CONCLUSÃO	50

1 INTRODUÇÃO

O trigo é uma conveniente fonte nutritiva e econômica de alimentos, base alimentar para grande parte da população mundial, e em muitos países, o consumo per capita de trigo é maior do que qualquer outro alimento. Os maiores consumidores mundiais são os da União Europeia com 17,6%, a China com 15,9%, a Índia com 12,9%, a Rússia com 5,2% e os Estados Unidos com 5,0% (USDA, 2016). O trigo é fonte de carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais. É consumido principalmente como pão, mas é um ingrediente de base de numerosos produtos alimentares.

A farinha do trigo é destinada a diversos segmentos, sendo que no Brasil a panificação consome 54%, uso doméstico 24%, fabricação de massas 13%, biscoitos 6%, e outros segmentos 3% (DEPEC, 2016). Além de produtos para o consumo humano, a planta e grãos de trigo também são utilizadas na fabricação de rações.

Hoje o trigo ocupa aproximadamente 20% das terras cultivadas no mundo, mais do que qualquer outro tipo de cereal. A maior produção do grão está localizada na União Europeia, chegando a 143 milhões de toneladas ao ano, já o Brasil produz aproximadamente 6 milhões de toneladas ao ano, sendo a região Sul a maior produtora (USDA, 2016). Atualmente, no Brasil, há pesquisas que procuram dar maior importância às propriedades tecnológicas do trigo, numa demonstração clara da necessidade da produção de grãos adequados ao processamento industrial.

Algumas enzimas podem ter importância tecnológica e as propriedades dessas proteínas tem sido estudadas. As proteases em suas diferentes classes (endo ou exoproteases) são enzimas essenciais durante o desenvolvimento, estabilidade e utilização do grão. Em trigos sadios, a atividade das proteases não é expressiva e é de pouca importância. Em níveis elevados, no entanto, o glúten pode ser alterado, afetando a massa e a qualidade do produto final. A atividade proteolítica varia durante a maturação do grão (KRUGER et al., 1991).

Maior atividade proteolítica pode ser desejável, como, por exemplo, durante a maltagem de cereais. Para a produção de malte, a atividade da enzima é potencializada, as endoproteases formam polipeptídeos solúveis que serão hidrolisados pelas exoproteases a aminoácidos simples que serão importantes,

posteriormente, na fabricação da cerveja e/ou na síntese dos vários tecidos da plântula em desenvolvimento.

A metodologia para a determinação global da atividade endoproteolítica que será estudada neste trabalho, é definida pela quantificação do grupamento azo liberado pela hidrólise do substrato cromogênico azocaseína. Há diversos autores que utilizaram metodologias para análise da atividade endoproteolítica em cereais, mas com diferenças nas condições durante a incubação, substratos e tampões.

2 OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi estudar através da metodologia de superfície de resposta os efeitos dos parâmetros do método da atividade endoproteolítica em trigo: pH, tempo de reação e temperatura, e selecionar as melhores condições de análise para aplicar em grãos de trigo, comparar os resultados com o malte de cevada e malte de trigo comerciais. E finalmente observar o desenvolvimento da atividade endoproteolítica durante a germinação do grão de trigo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TRIGO

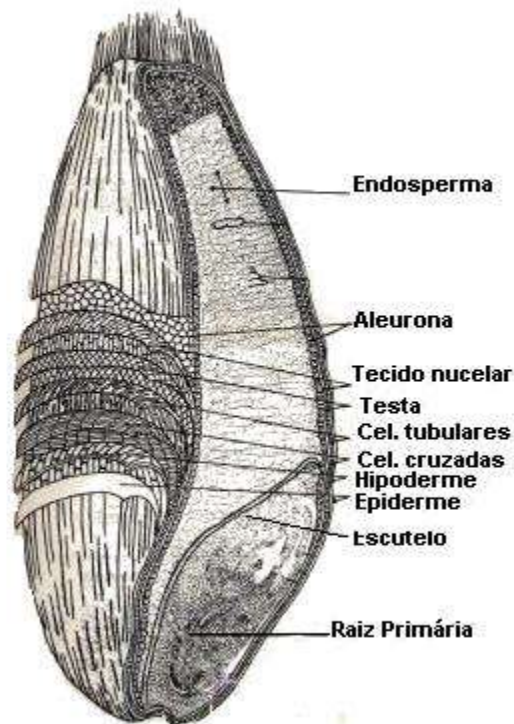
O trigo é uma planta herbácea, monocotiledônea, pertencente à família das *Poaceae* e ao gênero *Triticum*, tendo várias espécies, sendo a de maior interesse a *Triticum aestivum* L. (trigo comum). A produção mundial de trigo chega a mais de 744 milhões de toneladas ao ano, e as principais regiões que se destacam em seu cultivo, atualmente, são a União Europeia, China e Índia (USDA, 2016).

Em relação à composição do grão, o trigo apresenta cerca de 13% de umidade, 70 a 77% de carboidratos, 8 a 19% de proteína, 0,8 a 3% de lipídios, e 1 a 3% de cinzas. Diversos fatores podem interferir na composição como ano de cultivo, condições climáticas, variedade, adubações, local de cultivo, havendo maior diferença de composição entre variedades diferentes plantadas no mesmo local do que diferença de uma mesma variedade plantada em locais diferentes (SHEWRY et al., 2012).

O grão de trigo está proporcionalmente dividido em 3 partes: o endosperma corresponde de 80 a 85%, o pericarpo de 14% a 18% e o embrião de 2% a 3% da massa seca total do grão. Cada parte abrange dois ou mais tecidos anatomicamente diferentes (FILHO, 2008).

Cada parte do grão possui diferentes constituintes, não sendo estes uniformemente distribuídos. O pericarpo é a parte mais externa e recobre toda a semente, possui aproximadamente 6% de proteína, 2% de cinzas, 20% de celulose, e 0,5% de lipídios, sendo o remanescente definido como pentosanas. Esta parte do grão é composta por seis camadas: epiderme, hipoderme, remanescentes da parede celular ou células finas, células intermediárias, células cruzadas e células tubulares (Figura 1). A constituição da semente é feita pelo endosperma e gérmen, os quais são recobertos por três camadas: testa (onde estão os pigmentos que dão cor ao grão), camada hialina e aleurona (Figura 1) (HOSENEY, 1986).

Figura 1- Grão de trigo.



Fonte: POMERANZ, 1987.

O endosperma é composto pelo endosperma amiláceo (70 – 80% do grão) e pela camada de aleurona (HOSENEY, 1986). A camada aleurona, geralmente formada por única camada de células, é a camada externa do endosperma, rica em proteínas, contêm lipídios, enzimas e vitaminas.

As células do aleurona tem paredes grossas, não havendo espaço intercelular entre elas. Essas células contêm proteínas na forma de grânulos de aleurona, mas não apresentam glúten. Abaixo da camada de aleurona estão as células do endosperma, as quais contêm muitos grânulos de amido em uma matriz proteica (FILHO, 2008).

A força de adesão entre o amido e as proteínas do endosperma determinam a dureza do grão. A maior parte destas proteínas são as formadoras do glúten ou proteínas de reserva do trigo. O trigo pode ser classificado com relação ao teor proteico como trigo duro ou forte (quando há forte adesão, a proteína cobre e fica bem aderida à superfície do amido) e trigo macio ou brando (quando há fraca adesão, a união proteína e amido se rompe facilmente durante a moagem) (HOSENEY, 1986).

Segundo a legislação brasileira, o trigo para moagem deve apresentar padrões mínimos para *falling number* (número de queda), força de glúten e estabilidade para classificação como melhorador, pão, doméstico ou básico (BRASIL, 2010).

O embrião ou gérmen representa de 2,5% a 3,5% do grão, é responsável pela parte germinativa, que se desenvolve quando está em condições adequadas. É composto pelo eixo embrionário e pelo revestimento externo, o escutelo. O embrião se une ao endosperma pelo escutelo e contém substâncias nutritivas: 25% de proteínas, 18% de açúcares, 16% de lipídios no eixo embrionário (32% do escutelo são lipídios), 5% de cinzas e contém muitas enzimas (HOSENEY, 1986).

3.2 PROTEÍNAS DO TRIGO

O grão de trigo contém um teor proteico que oscila entre 7 e 18%. As proteínas podem ser classificadas conforme a solubilidade, sendo as albuminas solúveis em água, as globulinas solúveis em solução salina diluída, as prolaminas solúveis em solução alcoólicas a 70-80% e as glutelinas solúveis em soluções ácidas ou alcalinas diluídas (HOSENEY, 1986).

As proteínas do trigo também podem ser classificadas quanto a suas funções, em metabólicas e estruturais ou de reserva. As proteínas metabólicas, albuminas e globulinas, atuam no desenvolvimento do grão e no início da germinação. A principal função é nutricional, especialmente por apresentar composição em aminoácidos bem balanceada. As proteínas estruturais ou de reserva, gliadinas (classe das prolaminas) e gluteninas (classe das glutelinas), são as principais fontes de aminoácidos para o desenvolvimento do embrião durante a germinação. Essas proteínas são as mais importantes do ponto de vista tecnológico, pois desempenham papel fundamental na produção do pão (ŠRAMKOVÁ; GREGOVÁ; ŠTURDÍK, 2009).

A maioria das proteínas fisiologicamente ativas (enzimas) são encontradas nos grupos de albumina ou globulina. Nos cereais, as albuminas e globulinas estão concentradas nas células de aleurona, farelo e gérmen, com concentrações menores no endosperma. A fração de albumina e globulina é de aproximadamente 25% das proteínas totais grãos (BELDEROK et al., 2000). Nutricionalmente, as albuminas e globulinas tem um bom equilíbrio de aminoácido,

com elevados níveis de lisina, triptofano e metionina. As prolaminas e glutelinas são as proteínas de reserva em cereais. Estas proteínas estão essencialmente limitadas ao endosperma de cereais e não são encontradas no pericarpo ou gérmen. As prolaminas de todos os cereais são limitantes em aminoácidos nutricionalmente importantes como lisina, triptofano e metionina. As glutelinas parecem ser mais variável na composição de aminoácidos. No trigo, a composição dos aminoácidos presentes nas glutelinas são semelhantes aos das prolaminas (HOSENEY, 1986).

As gliadinas e gluteninas representam cerca de 80-90% das proteínas totais da farinha de trigo. As altas proporções de prolina, glutamina e outros aminoácidos tais como fenilalanina e glicina, resultam da presença nestas proteínas, de sequências repetidas. As gliadinas e gluteninas são proteínas complexas de elevado peso molecular.

O glúten é uma mistura heterogênea de proteínas (gliadinas e gluteninas), com solubilidade limitada em água. Quando misturadas com água e submetidas a trabalho mecânico, as proteínas de reserva formam o glúten, uma massa viscoelástica capaz de reter o gás carbônico durante a fermentação e ao mesmo tempo permitir a expansão da massa. As proteínas do glúten são capazes de formar ligações dissulfeto dando origem à estruturas oligoméricas, o que ocorre durante a hidratação e mistura da farinha na elaboração de massas (DAMODARAN, 2010).

3.3 GERMINAÇÃO

A germinação é um processo que envolve tanto reações catabólicas, como a hidrólise de substâncias de reservas das sementes, quanto reações anabólicas na produção de novas células e organelas da nova plântula (METIVIER, 1979). A semente do trigo, em estado de quiescência, caracteriza-se pelo baixo nível de atividades metabólicas.

Para uma semente germinar, certas condições devem ser favoráveis: fornecimento adequado de água, temperatura desejável, certa composição de gases na atmosfera, luz (certas sementes) e ausência de inibidores da germinação. As duas primeiras condições são os fatores cruciais (LORENZ, 1980).

A germinação possui três fases: na primeira fase ocorre a absorção de água (embebição), na segunda a ativação e na terceira a germinação visível. A primeira fase inicia-se quando a semente absorve a umidade. Como regra geral, uma semente de trigo deve atingir um teor de umidade de 35% a 45% do peso seco para iniciar a germinação (BOWDEN; FERGUSON, 2008). Nesta reidratação, em que ocorre a embebição de água pelas células do embrião e endosperma, há formação e liberação de enzimas, reativação das organelas celulares e macromoléculas, ativação do metabolismo das substâncias de reserva, geração de energia metabólica através do sistema citocromo, crescimento e divisão celular (MEREDITH; POMERANZ, 1985; POPINIGIS, 1985).

Na segunda fase da ativação o embrião produz e secreta giberelinas naturais para o endosperma. Estes hormônios induzem o desenvolvimento de enzimas hidrolíticas. A camada de aleurona é a sede da síntese de importantes enzimas que participam na degradação das reservas que se encontram no endosperma. Os primeiros dois dias de germinação coincidem com o máximo de transporte de giberelinas do embrião para a aleurona, e por isso a manutenção da umidade é essencial (MEREDITH; POMERANZ, 1985). As enzimas hidrolisam o amido e proteínas armazenadas nas sementes em açúcares e aminoácidos, fornecendo energia para o embrião se desenvolver. Esta fase continua até que há ruptura do revestimento da semente, o primeiro sinal visível de germinação (BOWDEN; FERGUSON, 2008).

O eixo embrionário da semente possui reservas suficientes para as atividades metabólicas das primeiras 24 horas de germinação. Estas reservas perfazem aproximadamente 20% do teor de matéria seca e são constituídas por sacarose, rafinose, lipídios e aminoácidos (POPINIGIS, 1985). À medida que a germinação progride, o peso total da matéria seca da plântula diminui, acusando perda correspondente à energia empregada nas transformações metabólicas e de transporte, somada às perdas de energia ocorridas durante o processo (METIVIER, 1979).

Durante a germinação, ocorre a hidrólise catalisada por proteases. Primeiramente há ação das endoproteases que irão transformar as proteínas em peptídeos e depois a ação das exoproteases hidrolisando os peptídeos em aminoácidos. Os aminoácidos resultantes são transportados para os pontos de

crescimento, onde são utilizados diretamente na formação de novas proteínas, ou são oxidados para liberação de energia (POPINIGIS, 1985).

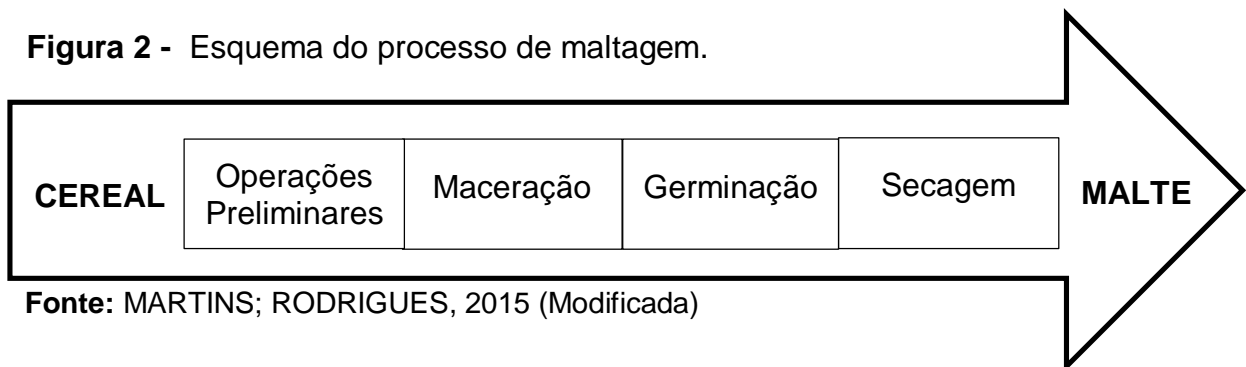
Na fase final, ocorre a germinação visível, o embrião começa a crescer, a radícula emerge, seguido por outras raízes primárias e surge o coleóptilo. As enzimas produzidas na segunda fase, mobilizam açúcares e aminoácidos armazenados para o embrião em crescimento (BOWDEN; FERGUSON, 2008).

3.4 MALTAGEM

Segundo a instrução normativa do MAPA (Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento), malte de cevada ou cevada malteada é o produto resultante da germinação forçada e controlada, sob condições especiais de umidade e temperatura da cevada do gênero *Hordeum spp.*, e posterior secagem (BRASIL, 2013).

O processo de maltagem pode ser descrito de uma forma sucinta, como consistindo na germinação e secagem controlada do grão de algum cereal (Figura 2). No entanto, a maltagem é um processo mais complexo.

Figura 2 - Esquema do processo de maltagem.



Fonte: MARTINS; RODRIGUES, 2015 (Modificada)

A maltagem inicia-se com uma série de operações preliminares, tais como limpeza e classificação. A limpeza tem como finalidade eliminar todo o tipo de material estranho que possa estar misturado com os grãos do cereal. Caso o teor de umidade do cereal após a colheita seja superior a 12% é conveniente uma secagem prévia. A secagem do grão deve ser realizada utilizando ar a temperatura inferior a 50-60°C, para evitar a perda do potencial germinativo do grão.

A etapa de maceração tem por objetivo o aumento do teor de umidade do grão do cereal até cerca de 40-46% (dependendo do cereal utilizado). Durante esta etapa, é necessário que o grão atinja um nível de umidade suficiente para ativar o metabolismo dos tecidos embrionários e aleurona, conduzindo, por sua vez, ao desenvolvimento de enzimas hidrolíticas. O aumento do teor de umidade do grão é crucial, uma vez que possibilitará o início da germinação do embrião e a correspondente produção de ácido giberélico. Permite o transporte e ação do ácido giberélico à camada de aleurona e a hidratação do endosperma até valores que facilitam a modificação enzimática. Simultaneamente, a maceração também permite uma limpeza adicional do grão. A temperatura durante a etapa de maceração deve ser rigorosamente controlada, devendo estar entre 12-20°C. Este processo é realizado em tinas de maceração (MARTINS; RODRIGUES, 2015).

A etapa seguinte no processo de maltagem é a germinação, que tem como objetivo a produção de enzimas. Durante a germinação ocorrem importantes transformações físicas no grão, como o crescimento da radícula e a alteração da textura do grão, que se torna friável. Para além das transformações já descritas, no interior do grão os açúcares do embrião são utilizados para a produção de hormônios vegetais, como o ácido giberélico, que estimula a produção de enzimas pelo embrião e pela camada de aleurona. As enzimas produzidas são transportadas até ao endosperma, onde irão atuar sobre as paredes celulares, os grânulos de amido e a matriz proteica que os envolve (MARTINS; RODRIGUES, 2015).

Entre as enzimas produzidas, é importante destacar as amilases, β -glucanases e as proteases. As amilases atuam sobre o principal constituinte do endosperma, o amido. As α - e β -amilases atuam nas ligações glicosídicas α -(1,4) que ligam os monômeros de D-glucose que compõem o amido. A α -amilase atua ao acaso no interior das moléculas de amilose e amilopectina, produzindo dextrinas, enquanto a β -amilase atua a partir do extremo não redutor das cadeias, libertando moléculas de maltose. As amilases aumentam a concentração de açúcares no malte, que será fonte de energia para as leveduras, responsáveis pela fermentação da cerveja (HOSENEY, 1986).

Além das amilases, existem outras enzimas, como as proteases, que também atuam sobre os componentes do endosperma, neste caso sobre a matriz proteica. As proteases desempenham um papel importante durante a etapa de

germinação, verificando-se um aumento na atividade proteolítica a partir do terceiro dia de germinação. O aumento da atividade proteolítica resulta da ação conjunta de dois tipos de enzimas: as endoproteases que formam polipeptídeos solúveis que serão hidrolisados pelas exoproteases a aminoácidos simples, que são utilizados pelo embrião (WROBEL; JONES, 1992). A ação das proteases durante a maltagem também parece influenciar algumas características da cerveja, tais como a turbidez, que é reduzida devido à ação destas enzimas.

A ação das enzimas já referidas não seria possível sem as β -glucanases, que desempenham um papel fundamental durante o processo de maltagem, e em particular durante a etapa de germinação. Estas enzimas são as responsáveis pela degradação das β -glucanas presentes nas paredes das células do endosperma, que permite o acesso das restantes enzimas, tais como amilases e proteases, aos componentes que se encontram no interior das células do endosperma (IZYDORCZYK; MACGREGOR, 2000; JIN et al., 2004).

A etapa de germinação do malte é realizada em tanques de germinação, a uma temperatura de cerca de 14-20°C e mantendo o grão com um teor de umidade de cerca de 45% (CMBTC, 2012). Os locais onde é realizada a germinação possuem um pavimento perfurado para permitir a circulação de ar através dos grãos. A circulação de ar permite o controle da temperatura e umidade durante a germinação, além de possibilitar a remoção do dióxido de carbono formado devido à respiração do grão e o fornecimento de oxigênio para a realização do mesmo processo. Os equipamentos utilizados também dispõem de dispositivos mecânicos para revolverem periodicamente o grão e, deste modo, contribuirão para a homogeneização do perfil de umidade e temperatura ao longo da germinação.

Após um período de germinação suficiente para se obter a modificação, o "malte verde" é seco para deter a germinação e estabilizar o malte, reduzindo os níveis de umidade para menos de 5%. No processo, os sabores crus indesejáveis são removidos e são introduzidas notas "maltadas" agradáveis. O processo de secagem também é responsável pelo desenvolvimento da cor do malte. A temperatura, no entanto, deve ser cuidadosamente regulada, na fase inicial da secagem deve utilizar o ar a uma temperatura próxima de 50°C, e assim garantir a ação de enzimas que serão cruciais na cervejaria para hidrolisar o amido do malte em açúcares fermentáveis e outro componentes como as proteínas, que também possuem um

papel importante nos extratos de malte (BANFORTH, BARCLAY, 1993). Além disso, a secagem inibe o crescimento de microrganismos, o que, em conjunto com a redução do teor de umidade, permite fornecer um produto estável do ponto de vista da conservação.

3.5 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

As características físicas, químicas, reológicas e enzimáticas determinam a qualidade de grãos e farinhas de cereais, que devem ser conhecidos e estudados, dependendo da designação de uso ou tipo de produto (RASPER, 1991).

Estudando as características enzimáticas no trigo, é evidente que este cereal contém várias enzimas proteolíticas, cada uma com propriedades únicas e específicas. Estas enzimas podem ser classificadas tanto como de natureza endoproteolítica, em que as clivagens das ligações peptídicas ocorrem no interior das cadeias peptídicas, ou exoproteolítica, onde a quebra ocorre a partir da extremidade carboxílica, ou amino-terminal da cadeia peptídica (KRUGER; REED, 1988).

Enzimas endoproteolíticas são consideradas as mais importantes em termos de qualidade. Contrastando com o tipo exo, são sintetizadas na aleurona durante a germinação com o propósito de mobilizar as reservas de armazenamento de forma sincronizada, formando peptídeos e aminoácidos (KRUGER; MACGREGOR; MARCHYLO, 1991).

Diversos autores estudaram a atividade enzimática em vários segmentos de pesquisas, e embora ainda seja muito estudado, há uma dificuldade para a interpretação e comparação dos resultados devido a não padronização das unidades de medida da atividade proteolítica, assim como da diversidade de metodologias empregadas.

Preston e Kruger (1976), definiram uma unidade (U) da atividade proteolítica como a mudança de uma unidade da absorbância (abs) a 440 nm após incubação a 35°C, por 120 minutos em tampão ácido cítrico/fostato dissódico (pH 6,0). No início do desenvolvimento do trigo, enzimas endoproteolíticas foram encontradas principalmente no pericarpo (4,56 U), bem como nas camadas de revestimento da semente e do aleurona (1,36 U). A ocorrência da atividade proteolítica nas camadas exteriores do grão durante os primeiros estágios de desenvolvimento é provavelmente

associada com a hidrólise da proteína nestes tecidos, proporcionando uma fonte de aminoácidos e peptídeos.

A atividade de uma enzima pode ser determinada com base na velocidade de conversão de um reagente adequado (substrato) e está estritamente vinculada com os agentes desnaturantes, isso pelo fato da sua função catalítica depender da conformação na qual a enzima se apresenta (RIEGEL, 2003). A temperatura, por exemplo, é um dos agentes críticos sobre a atividade das enzimas. Quando se eleva a temperatura, a atividade aumenta, todavia, o processo de desnaturação pode ocorrer devido à ação do calor (HALPERN, 1997).

A desnaturação proteica pode ocorrer quando há qualquer mudança em seu ambiente, tal como pH, força iônica, temperatura, entre outros fatores, o qual forçará a molécula a assumir uma nova estrutura de equilíbrio. Quando ocorrem mudanças importantes nas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias, sem clivagem das ligações peptídicas da cadeia principal é considerada que houve “desnaturação”. Ou seja, a desnaturação é um fenômeno no qual o estado inicial bem definido de uma proteína formada sob condições fisiológicas é transformado em uma estrutura final definida sob condições não fisiológicas, usando-se um agente desnaturante. O lado negativo desse fenômeno é a perda de algumas propriedades, como, por exemplo, muitas proteínas biologicamente ativas (enzimas), perdem a sua atividade após essa desnaturação (DAMODARAN, 2010).

O pH é um parâmetro que exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática. O efeito deste fator se dá devido a alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de H^+ (RICARDO; TEIXEIRA, 1993).

O método em estudo é um ensaio "em solução" que utiliza o substrato azocaseína para medir quantitativamente a atividade endoproteolítica global das amostras. A azocaseína é o substrato mais utilizado para a determinação da atividade endoproteolítica, é um derivado da caseína ao qual foi adicionado um grupo sulfanilamida, que tem coloração alaranjada. A digestão de uma solução de azocaseína por enzimas endoproteolíticas resulta na formação de componentes coloridos, solúveis em ácido tricloroacético. A intensidade da cor desenvolvida no sobrenadante, resultante da centrifugação do substrato digerido após a adição do ácido tricloroacético, é função da atividade endoproteolítica da enzima na solução

(SANTOS et al., 2005). A azocaseína é encontrada comercialmente e, quando hidrolisada, a caseína libera o corante azo para o meio e este é detectado por absorvância a 440 nm (SIGMA-ALDRICH, 2015).

A atividade proteolítica vem sendo estudada em diversos trabalhos científicos, os quais há metodologias com diferentes condições na determinação da atividade da protease (Tabela 1).

Tabela 1 - Condições de incubação da metodologia da atividade proteolítica utilizada por diferentes autores.

Referências *	Amostra	Condições de incubação			Tipo de tampão
		Tempo (min)	Temperatura (°C)	pH	
1	Trigo	180	37	5,0-7,5	Fosfato de sódio
2	Malte	30	40	5,0	Acetato de sódio
3	Trigo	180	30	5,0	Acetato de sódio
4	Trigo	30	37	7,5	Fosfato de sódio
5	Malte	30	40	6,0	Citrato de sódio
6	Trigo	60	30	5,4	Acetato de sódio

*(1) FISCHER; FELLER, 1993; (2) OSMAN et al., 2002; (3) DOMINGUEZ; CEJUDO, 1996; (4) RANI et al., 2001; (5) GUERRERO; EDNEY, 2013; (6) BOTTARI et al., 1996.

A atividade endoproteolítica é estudada principalmente durante a germinação e crescimento da planta. Os autores Fischer e Feller (1993), estudaram o padrão das proteínas e da atividade das hidrolases em brotos de trigo de inverno cultivado no campo. Os níveis de todas as enzimas estudadas foram bem conservadas durante todo o inverno, mesmo durante fases de baixas temperaturas. A principal atividade endoproteolítica em pH 5,0 permaneceu relativamente constante durante o inverno (aproximadamente 130 μg endopeptidases broto⁻¹.h⁻¹). A manutenção das enzimas é importante durante o período de baixa atividade metabólica pois permite um reinício rápido de crescimento na primavera.

Osman et al. (2002) caracterizaram as endoproteases do malte de cevada e avaliaram a sua contribuição para a qualidade do malte e da cerveja. Para a análise das endoproteases, um dos substratos utilizados foi a azocaseína, em tampão acetato de sódio pH 5,0, a 40°C por 30 minutos de incubação. As atividades foram detectadas no primeiro dia de germinação e aumentaram à medida que a germinação progrediu. Os autores observaram que as endoproteases no malte de cevada são complexas, diversas e expressas em múltiplas formas durante a

germinação da cevada. As endoproteases do malte foram ativas durante a maceração e contribuíram para proteínas solúveis e nitrogênio amino livre do mosto.

Dominguez e Cejuto (1996) analisaram as endoproteases que aparecem durante o desenvolvimento dos grãos de trigo. Os extratos, preparados a partir de grãos em diferentes fases de desenvolvimento, mostraram mudanças na atividade endoproteolítica, onde uma unidade (U) de atividade foi considerada a hidrólise de 1 µg de azocaseína/min. Foi observado que o máximo de atividade ocorreu próximo a 15 dias após a floração (aproximadamente 1,2 U), este período coincide com o aumento do comprimento dos grãos. Quando o grão já está maduro, a atividade diminui para 0,8 U.

A atividade da protease também pode ser analisada para identificar a qualidade da farinha. Rani et al. (2001), estudaram a distribuição das enzimas na farinha obtida a partir de moinhos de quebra e redução e provenientes das diferentes peneiras. As farinhas estudadas foram, B1-B5: farinha de quebra e C1-C6: farinha de redução. A atividade da protease determinada por Rani et al. (2001), foi mais elevada nos produtos de redução do que nos de quebra. Entre os produtos de redução, C4 tinha a atividade elevada (aproximadamente 50 U/g), cerca de 2,5 vezes maior do que no trigo (19 U/g). O C2 teve a segunda maior atividade, aproximadamente 35 U/g. Os produtos de C1 e C3 tinham quase a mesma atividade proteolítica de 20 a 25 U/g, respectivamente. Os produtos de redução final (C5 e C6) continham níveis relativamente baixos de protease (de 10 a 15 U/g). Entre os produtos de quebra a maior atividade foi encontrada em B2 de aproximadamente 3 U/g e a menor em B4 de 1 U/g. Estes resultados foram explicados devido aos produtos de redução apresentarem maior porção de gérmen e da camada de aleurona, que são ricos em proteases.

Guerrero e Edney (2013), determinaram a atividade endoproteolítica de cevada maltada, utilizando um método colorimétrico rápido, com dois substratos diferentes: azogelatina e azocaseína. Os melhores resultados reportados foram em pH 6,0 (pH do mosto), durante 30 min de reação e utilizando o substrato azocaseína.

Bottari et al. (1996), estudaram a principal proteinase que hidrolisa a gliadina durante a germinação do trigo em condições de incubação de 60 min, 30°C em tampão acetato de sódio pH 5,4. A proteinase cisteína representou a maior parte da atividade enzimática das sementes de trigo em germinação e foi capaz de clivar a

gliadina em pequenos peptídeos, que parecem desempenhar um papel chave na degradação inicial das proteínas de armazenamento presente no endosperma amiláceo.

3.6 CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEASES

As proteases são essenciais para modificação intencional das proteínas dos alimentos. Do ponto de vista nutricional, a hidrólise de proteínas, antes do consumo, favorece a digestão e absorção pelo organismo. A ação das proteases sobre as proteínas de um alimento pode ter como consequência a formação de compostos responsáveis por aroma e textura específicos, a alteração da funcionalidade das proteínas e a formação de peptídeos que apresentam atividade biológica (SANTOS; KOBLITZ, 2010).

As proteases são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases. Catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e podem ainda apresentar atividade sobre ligações éster e amida. São também descritas como peptidases e proteinases. A principal função biológica é a hidrólise de proteínas que ocorre nos processos de digestão e também de ativação de enzimas. Todas as proteases apresentam um certo grau de especificidade de substrato, em geral relacionado aos aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada e aos seus adjacentes. A posição da ligação na cadeia polipeptídica e o tamanho da cadeia também podem influenciar a atividade das proteases (SANTOS; KOBLITZ, 2010).

As proteases são classificadas basicamente de acordo com dois critérios: seu modo de ação e a natureza química do seu sítio catalítico. De acordo com o modo de ação, as proteases são divididas em dois grandes grupos: exopeptidases, que atuam nas extremidade da cadeia polipeptídica e endopeptidases, que agem nas ligações no interior da cadeia proteica (SANTOS; KOBLITZ, 2010).

As exopeptidases dividem-se em aminopeptidases que são as proteases que agem nas extremidades N-terminal da cadeia polipeptídica, liberam aminoácidos livres, dipeptídios ou tripeptídios e geralmente são metalo-proteases. E a outra é conhecida como carboxipeptidases que são as proteases que agem na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica, liberam aminoácidos livres ou

dipeptídios. Podem ser serina-proteases, metalo-proteases ou cisteína-proteases (WHITAKER, 1972).

As endopeptidases são normalmente classificadas pela natureza química de seu sítio ativo e por seu mecanismo de ação em quatro grupos distintos. As serina-proteases que são caracterizadas pela presença do aminoácido serina no sítio ativo (WHITAKER, 1972). Estas enzimas são ativas em pH neutro e alcalino e o principal grupo desse tipo de proteases é a tripsina, quimotripsina e subtilisina, que apresentam baixa especificidade de substrato.

As cisteína-proteases ou proteases sulfidrílicas, apresentam em seu sítio ativo cisteína conjugada com histidina. São normalmente, mais ativas em meios de pH neutro, podendo apresentar atividade em valores de pH ácidos. São ativadas na presença de agentes redutores e inativadas por agentes oxidantes e substâncias e reagem com grupo sulfidril. As proteases vegetais, como papaína, bromelina e ficina, são as principais cisteína-proteases (WHITAKER, 1972).

As proteases aspárticas ou ácidas, contêm ácidos aspártico em seu sítio ativo. Em geral, apresentam maior atividade em valores de pH ácido e tem maior afinidade por ligações que envolvem aminoácidos apolares e aromáticos. Entre as principais proteases ácidas estão a pepsina e renina, assim como diversas proteases microbianas, sobretudo fúngicas (WHITAKER, 1972).

As metalo-proteases são enzimas dependentes de íons metálicos divalentes para sua atividade. Podem ser neutras ou alcalinas e a principal representante dessa classe é a termolisina, uma protease comercial de alta termorresistência, produzida por *Geobacillus stearothermophilus* (WHITAKER, 1972).

A atividade proteolítica pode ser determinada em uma grande variedade de substratos: substrato natural (leite), substratos purificados (caseína, albumina, hemoglobina) ou sintéticos (arginina p-nitroanilina, azocaseína). No primeiro caso, avalia-se a atividade pela medida do tempo entre a adição da enzima ao leite e a precipitação do coágulo (SANTOS; KOBLITZ, 2010).

A maior parte das metodologias propostas utiliza caseína como substrato e mede a formação de produtos de hidrólise (aminoácidos livres, como tirosina e peptídeos solúveis em solução de ácido tricloroacético) por espectrofotometria ou por uso de reações colorimétricas, específicas para aminoácidos e peptídeos (SANTOS; KOBLITZ, 2010).

No caso de substratos sintéticos, em geral o produto de hidrólise é facilmente mensurável pela alteração do pH do meio reacional ou pela alteração de cor que é quantificada por espectrofotometria. É importante notar que cada protease apresenta maior ou menor atividade, de acordo com o substrato utilizado e com a temperatura e o pH do ensaio, só sendo comparáveis resultados que levem em consideração todos esses fatores, além do tempo de reação e da agitação do meio reacional (SANTOS; KOBLITZ, 2010).

A temperatura ótima para a atividade de uma enzima resulta dos efeitos líquidos de temperatura sobre ativação e inativação. Enquanto a ótima é aquela em que a velocidade de reação da enzima é maior, essa condição tem uma duração limitada e, com o tempo, a desnaturação progressiva logo predomina e muito da atividade original é perdida (PARKIN, 2010).

Enquanto cada enzima exibe um comportamento único, algumas observações gerais são feitas em relação à estabilidade térmica. Ligantes como os substratos aumentam a estabilidade por ajudar a reter a estrutura nativa no e ao redor do sítio ativo. Outros fatores de composição no meio também podem aumentar ou diminuir a estabilidade térmica. Algumas tendências gerais dessa estabilidade são o fato que ela aumenta com a diminuição do tamanho da proteína, apresenta menor número de cadeias peptídicas, aumento do número de pontes dissulfeto e salinas e níveis elevados de proteínas solúveis (PARKIN, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A amostra de grão de trigo da cultivar 'IPR Catuara TM', safra 2014 foi disponibilizada pelo IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná). Originada do cruzamento entre a linhagem LD 975 e a cultivar IPR 85, foi desenvolvida pelo IAPAR, em parceria com a Fundação Meridional de Apoio à Pesquisa Agropecuária, apresenta excelente qualidade tecnológica, precocidade e ampla adaptação (IAPAR, 2012). As amostras do malte de trigo branco, marca Château produzido na Bélgica, safra 2015 e o malte de cevada, marca Château Pilsen 2RS, produzido na Bélgica, safra 2015 foram obtidos no comércio da cidade de Londrina- Pr. Os maltes comerciais foram utilizados para comparação dos dados obtidos nas análises do trigo.

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de trigo, malte de trigo e de cevada foram moídas em moinhos IKA, modelo A11 basic, e peneiradas em tamis de 20 mesh, obtendo assim as farinhas de trigo integral e de malte que foram armazenadas em recipiente fechado até o momento das análises.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Determinação de Umidade

A umidade foi determinada pela perda de massa em estufa (Nevoni, NV1.5, Brasil), segundo a metodologia proposta pela AOAC (1995), a 105°C até peso constante, em triplicada.

4.3.2 Determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta

O nitrogênio total foi determinado segundo o método 46-12, empregando o fator de N x 5,7 para o trigo e N x 6,25 para a cevada na conversão de nitrogênio em proteína (AACC, 2000). As análises foram realizadas em triplicada.

4.3.3 Determinação de Nitrogênio Solúvel

O nitrogênio solúvel foi determinado segundo o método de Bradford (1976). Este método é baseado na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante G-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do mesmo para a forma aniônica, que absorve fortemente radiação em 595 nm.

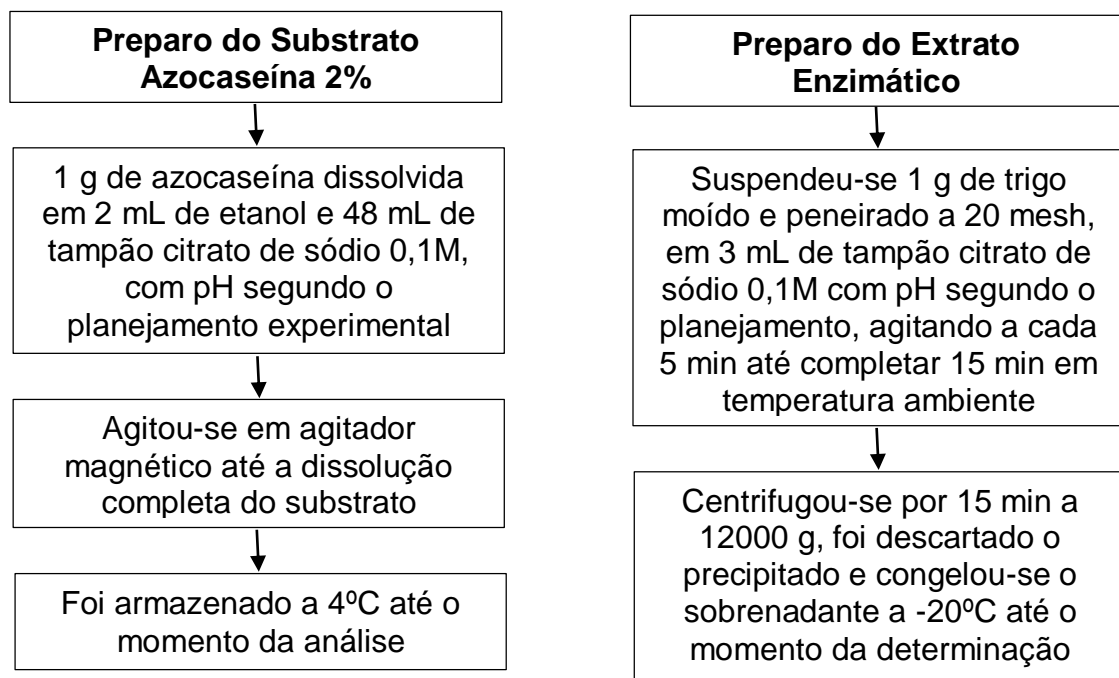
Para a preparação do reagente de Bradford, foram pesados 50 mg de Coomassie Brilliant Blue G250 em papel manteiga e transferido para um balão de 500 mL, adicionou-se 25 mL de etanol 95% (°GL, v/v) e foi colocado em banho ultrassônico por 20 minutos para dissolução. Foram adicionados 50 mL de ácido fosfórico P.A concentrado a 85% (m/m) e deixado por mais 10 minutos no banho ultrassônico. Após a dissolução completa, o balão foi avolumado com água destilada, a solução foi filtrada e refrigerada até o momento da análise. Para a curva analítica, foram preparados 10 mL de uma solução de albumina (BSA) a 1000 µg/mL e, a partir desta solução, foram feitas diluições seriadas em água destilada para construção da curva analítica (200, 300, 400, 600, 800, 900, 1000 µg/mL). A cada solução foram adicionados 5 mL do reagente Bradford concentrado e feita a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

Para a análise das amostras, foi pipetado 0,1 mL da amostra diluída e filtrada em filtro de nylon 0,45 µm (MILLIPORE) e adicionados 5 mL do reativo Bradford, após a solução ser agitada e aguardar 5 min para a reação, foi feita a leitura em espectrofotômetro (595 nm).

4.3.4 Determinação da Atividade Endoproteolítica

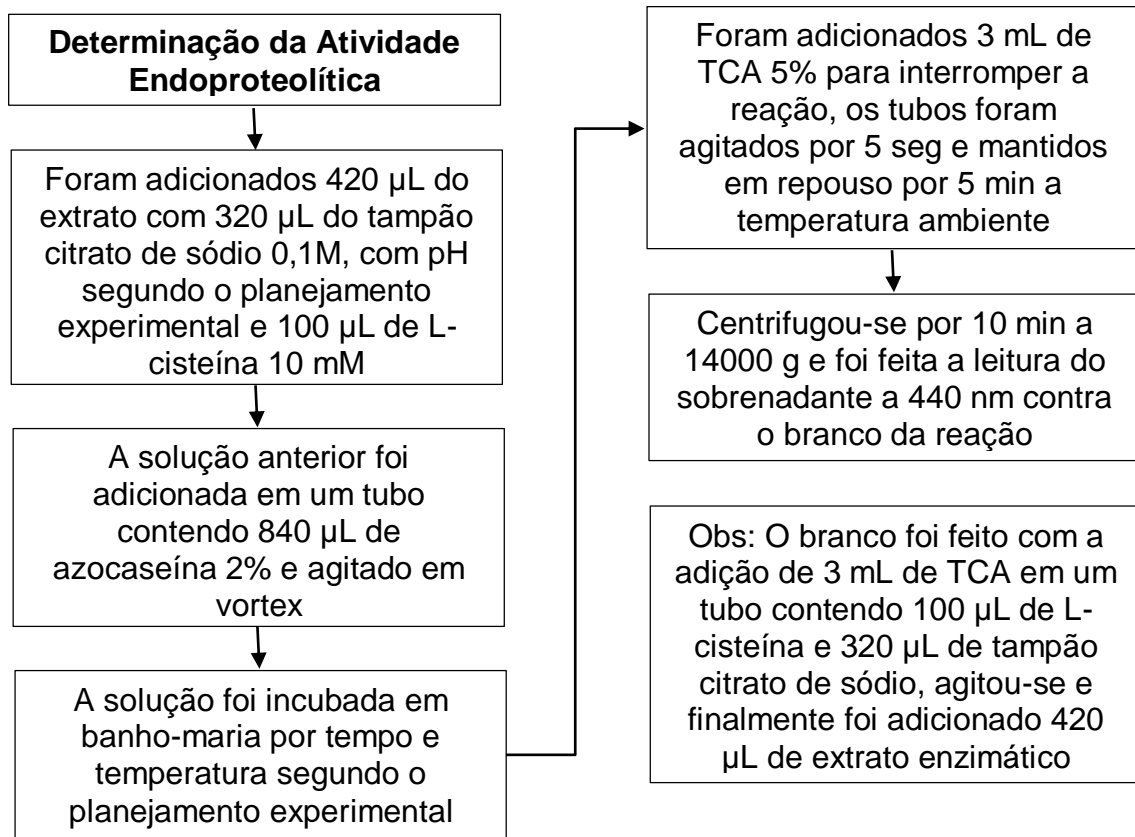
A atividade endoproteolítica do trigo foi determinada inicialmente com o preparo do substrato (azocaseína 2%), seguido do extrato enzimático e feita a leitura em espectrofotômetro em absorbância a 440 nm. Esta metodologia é a mesma aplicada por Guerrero e Edney (2013), mas variando o pH, tempo e temperatura de incubação.

Figura 3 - Fluxograma do preparo do substrato e extrato enzimático.



Fonte: O autor.

Figura 4 - Fluxograma da determinação da atividade endoproteolítica.



Fonte: O autor.

4.3.5 Testes Preliminares

A metodologia da atividade endoproteolítica (GUERRERO; EDNEY, 2013) foi aplicada para o trigo em diferentes tempos de incubação. O método relaciona a intensidade da cor laranja formada pela hidrólise do substrato de azocaseína com a atividade enzimática. A metodologia reporta resultados pela leitura direta das absorbâncias após as condições pré-determinadas, 40°C, pH 6,0 e com o extrato de trigo/tampão 1:3 (m/v). Para a definição das variáveis do planejamento experimental, foram testados os tempos de 10, 20, 30 e 40 minutos de incubação. E para definir qual a melhor temperatura para a detecção da atividade endoproteolítica sem que ocorresse a inativação da enzima, fez-se outro teste no qual foi medida a atividade endoproteolítica do trigo em duas temperaturas de incubação, 40°C e 50°C, em pH 6,0 por 30 minutos e com o extrato de trigo/tampão 1:3 (m/v).

4.3.6 Planejamento Experimental

O estudo da atividade enzimática no trigo foi realizado utilizando um desenho fatorial 2^3 , com o total de 10 ensaios (Tabela 3). A atividade endoproteolítica foi reportada em absorbância (Abs) a 440 nm, e obtida aplicando a metodologia com as seguintes variáveis independentes: pH (5,5, 6,0 e 6,5), temperatura (30, 40 e 50°C) e tempo (10, 20 e 30 min) de incubação dos extratos da cultivar de trigo 'IPR CATUARA TM', safra 2014 (Tabela 2). A variável dependente – atividade endoproteolítica em abs a 440 nm – foi avaliada utilizando a metodologia segundo Guerrero e Edney (2013), com algumas modificações (Figura 3 e 4) e as leituras foram feitas em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra S22, Inglaterra).

Tabela 2 - Condições dos ensaios do planejamento experimental, variando os parâmetros pH, temperatura e tempo de hidrólise.

Variáveis independentes	Faixas		
	-1	0	1
pH	5,5	6,0	6,5
Temperatura (°C)	30	40	50
Tempo (min)	10	20	30

As variáveis independentes mostradas na Tabela 2, foram definidas a partir de análise estatística obtida dos resultados de testes preliminares (item 5.1).

Tabela 3 - Planejamento fatorial (2^3) com repetição no ponto central.

pH (X_1)	Temperatura (X_2)	Tempo (X_3)
-1	-1	-1
1	-1	-1
-1	1	-1
1	1	-1
-1	-1	1
1	-1	1
-1	1	1
1	1	1
0	0	0
0	0	0

A codificação utilizada foi calculada utilizando as equações:

$$X1 = \frac{\text{pH}-6,0}{0,5} \quad X2 = \frac{\text{Temperatura}-40}{10} \quad X3 = \frac{\text{Tempo}-20}{10}$$

Onde x = variável codificada (adimensional)

Os experimentos obedeceram a um delineamento inteiramente casualizado, usando a azocaseína como substrato. Os extratos foram realizados em duplicata e as leituras em triplicata. Foram elaboradas superfícies de respostas com as variáveis estudadas através do programa software Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).

4.3.7 Testes Complementares

Para melhor avaliar o método da atividade endoproteolítica, foram necessários testes complementares. Foi analisada a atividade endoproteolítica em outros tipos de grãos (malte de trigo e malte de cevada comerciais) para comparação do resultado obtido na amostra de trigo. Inicialmente foram testadas temperaturas de 50 e 55°C, fixando as condições de pH 6,5 e 30 minutos de incubação. Finalmente foram testados pH de 6,5 e 7,5, fixando as condições de 30 minutos e 50°C de incubação. Ambos os testes seguiram a metodologia apresentada no item 4.3.4.

4.3.8 Germinação

Após estudar quais eram as melhores condições de incubação para a detecção da atividade endoproteolítica, fez-se a germinação dos grãos de trigo. Primeiramente os grãos de trigo foram higienizados em uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v), seguindo de lavagem com excesso de água. A germinação foi feita em duplicata, e iniciada com a maceração por 24 horas, onde 50 g de grãos de trigo foram embebidos em 100 mL de água destilada, após este período, foi retirado o excesso de água para impedir a contaminação do material.

O trigo foi colocado em recipientes de vidro devidamente higienizados e tampados com gaze para permitir a entrada de oxigênio (Figura 5). O grão foi germinado na germinadora de sementes J. Prolab, modelo Mangelsdort, com temperatura controlada (24°C) por 144 horas, a cada 24 horas de germinação foi retirada uma alíquota e armazenada congelada (-20°C). Para a realização das análises da atividade endoproteolítica e nitrogênio solúvel segundo o método de Bradford, as amostras foram liofilizadas em um liofilizador, marca Christ Alpha 1-2 LD e moídas após a retirada do coleóptilo e radículas.

Figura 5 - Acondicionamento do trigo para a germinação.



Fonte: O autor.

4.3.9 Análise Estatística

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos na forma de média e desvio-padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando identificada diferença significativa, o teste de Tukey e/ou o teste t de Student a 5% de probabilidade foi utilizado para comparação entre as médias. Foi utilizado o software Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTES PRELIMINARES

Os valores da atividade endoproteolítica, quando variou o tempo de incubação, foram crescentes até os 30 minutos (Tabela 4). A maior média da atividade de 0,077 (30 minutos) que não diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) do valor obtido em 40 minutos, ou seja, a atividade da enzima se mostrou estável após 30 minutos de incubação nas condições de ensaio pré-determinadas.

Tabela 4 - Atividade endoproteolítica do trigo em diferentes tempos de incubação.

Tempo (min)	Atividade Endoproteolítica (440 nm)
10	0,057±0,007 ^c
20	0,064±0,006 ^{bc}
30	0,077±0,007 ^a
40	0,069±0,007 ^{ab}

Média±Desvio Padrão. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Guerrero e Edney (2013) estudaram o método para determinação da atividade endoproteolítica e testaram em diferentes maltes de cevada, obtiveram melhor resultado para tempo de extração 25 minutos, tempo de reação de 30 minutos e o pH do extrato de 6,0. A relação entre a atividade endoproteolítica e o tempo de reação foi linear e positiva. As atividades de endoproteases determinadas nas três variedades de malte de cevada com diferentes perfis de qualidade geraram equações diferentes de relação entre tempo de incubação e a resposta em absorbância, aos 60 minutos de incubação os resultados da atividade endoproteolítica em absorbância a 440 nm variaram entre 0,25, para a cevada de menor qualidade e 0,90 para a cevada de melhor qualidade (GUERRERO; EDNEY, 2013).

Outra variável estudada foi a temperatura, foi considerada uma variável importante, pois quando foi elevada em 10°C, a atividade endoproteolítica aumentou em 36%, passando de 0,077 (Abs 440 nm) a 40°C para 0,105 (Abs 440 nm) a 50°C. A temperatura ótima para a atividade de uma enzima resulta dos efeitos líquidos da temperatura sobre a ativação e inativação. A ótima é aquela em que a velocidade de reação da enzima é maior, essa condição tem uma duração limitada, com o tempo, a

desnaturação progressiva logo predomina e parte da atividade original é perdida (DAMODARAN, 2010).

Tabela 5 - Atividade endoproteolítica do trigo em relação a temperatura de incubação.

Temperatura (°C)	Atividade Endoproteolítica (Abs 440 nm)
40	0,077±0,007 ^b
50	0,105±0,013 ^a

Média±Desvio Padrão. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Enquanto cada enzima exibe comportamento único, algumas observações gerais podem ser feitas em relação à estabilidade térmica. Ligantes (substratos ou mesmo inibidores) aumentam a estabilidade por ajudar a reter a estrutura nativa no e ao redor do sítio ativo (DAMODARAN, 2010).

Osman et al. (2002) estudaram a termoestabilidade das endoproteases do malte de cevada medida com diferentes substratos, após aquecimento por 50 minutos a 65°C. Quando a atividade residual da endoprotease foi medida com o substrato azocaseína (leitura da absorbância a 330 nm), cerca de 60% da atividade foi perdida nos primeiros 10 minutos, seguida por uma perda gradual e mais lenta. As atividades para hemoglobina, hordeínas e glutelinas seguiram um padrão comum de declínio lento de cerca de 35% das atividades originais em 20 minutos. O efeito da duração do aquecimento sobre a capacidade das endoproteases de atacar os três substratos diferiu. A capacidade de hidrolisar hordeínas diminuiu rapidamente e foi completa em mais 20 minutos. Em contraste, o declínio na atividade com glutelinas foi muito lento. Hordeínas e glutelinas são os principais componentes das proteínas de armazenamento de grãos de cevada. Segundo os autores, estes resultados experimentais indicam que ambas as proteínas seriam hidrolisadas por endoproteases de malte durante a maceração. As temperaturas ótimas das reações também variaram com o substrato, 40°C com hordeína e 50°C com glutelina. Os diferentes substratos de proteína proporcionam diferentes graus de proteção contra o calor para as endoproteases do malte (OSMAN et al., 2002).

5.2 RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os valores de cada nível das variáveis independentes foram escolhidos a partir dos experimentos preliminares. Fez-se a matriz do planejamento 2^3 com a resposta da atividade endoproteolítica em absorbância (440 nm) (Tabela 6).

Tabela 6 - Planejamento fatorial (2^3) com as variáveis codificadas e decodificadas e a resposta média de absorbância (440 nm) da atividade endoproteolítica do trigo.

Ensaio	Codificadas			Não codificadas			Atividade Endoproteolítica (Abs 440 nm)
	X ₁	X ₂	X ₃	pH	T (°C)	Tempo (min)	
1	-1	-1	-1	5,5	30	10	0,047
2	1	-1	-1	6,5	30	10	0,107
3	-1	1	-1	5,5	50	10	0,058
4	1	1	-1	6,5	50	10	0,091
5	-1	-1	1	5,5	30	30	0,048
6	1	-1	1	6,5	30	30	0,129
7	-1	1	1	5,5	50	30	0,083
8	1	1	1	6,5	50	30	0,152
9	0	0	0	6,0	40	20	0,082
10	0	0	0	6,0	40	20	0,080

Foram destacadas as variáveis não significativas ($p \leq 0,05$), tabelados valores da estimativa dos efeitos, erro padrão e coeficientes para cada variável do delineamento 2^3 , necessários para verificar as melhores condições para a análise da atividade endoproteolítica no trigo (Tabela 7).

Tabela 7 - Estimativa dos efeitos e coeficientes do delineamento 2^3 .

Fator	Efeito	Erro Padrão	p	Coeficiente
Média	0,087	0,002	0,001	0,088
pH (1)	0,06	0,005	0,007	0,03
Temperatura (2)	0,013	0,005	0,131	0,007
Tempo (3)	0,027	0,005	0,036	0,014
1*2	-0,009	0,005	0,209	-0,005
1*3	0,014	0,005	0,116	0,007
2*3	0,015	0,005	0,098	0,008
1*2*3	0,003	0,005	0,555	0,002

Coeficiente de correlação $R^2 = 0,989$

Abaixo são apresentadas as equações referente ao planejamento (Eq. [1]) e como a interação entre as variáveis não foram significativas ($p \leq 0,05$), seus

efeitos foram eliminados, a variável temperatura mesmo não sendo significativa, foi mantida na equação para melhor ajuste do modelo (Eq. [2]):

$$Y=0,088 + 0,030 (\text{pH}) + 0,007 (\text{Temperatura}) + 0,014 (\text{Tempo}) - 0,005 (\text{pH.Temperatura}) + 0,007 (\text{pH.Tempo}) + 0,008 (\text{Temperatura.Tempo}) + 0,002 (\text{pH.Temperatura.Tempo}) \quad R^2=0,98$$

Eq.[1]

$$Y=0,088 + 0,030 (\text{pH}) + 0,007 (\text{Temperatura}) + 0,014 (\text{Tempo}) \quad R^2=0,88$$

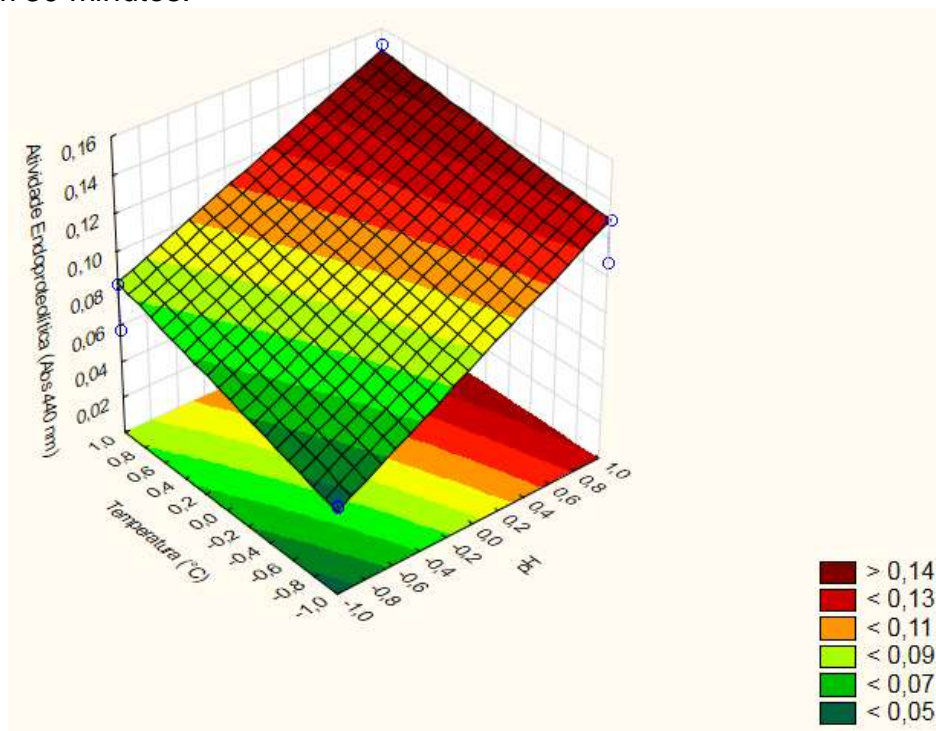
Eq.[2]

Todas as interações entre as variáveis pH, temperatura e tempo não foram significativas. Analisando os efeitos e coeficientes da análise estatística a nível de 5%, o pH e o tempo de incubação tiveram maior interferência na atividade endoproteolítica do trigo. Segundo Damodaran (2010), o pH está entre os mais importantes fatores ambientais que influenciam a atividade, sendo que alterações desse parâmetro compreende o principal modo físico de controle da ação de enzimas em matrizes alimentares.

A temperatura tem efeitos previsíveis e opostos (ativação e desativação) sobre a atividade de enzimas. Aumentos contínuos de temperatura além do máximo ou “ótimo” para a atividade enzimática levam à diminuição drástica da constante de velocidade da reação (PARKIN, 2010). Isso ocorre porque a estrutura tridimensional das enzimas se desorganiza, impossibilitando a formação do complexo enzima-substrato (DAMODARAN, 2010).

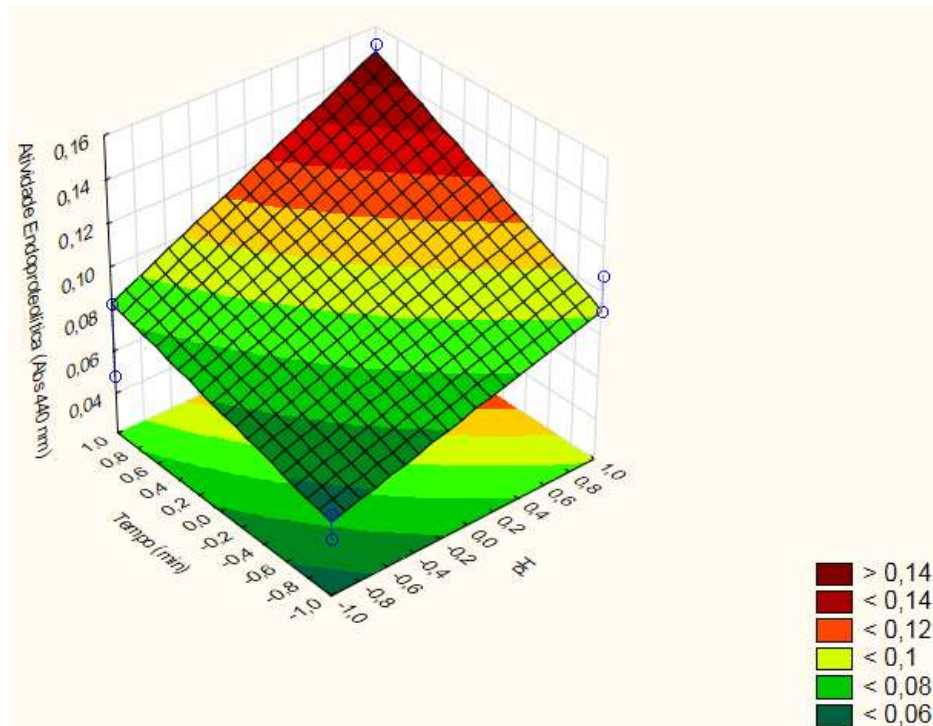
Nas Equações 1 e 2 e nas Figuras 6 e 7, foi possível observar a maior influência do pH na atividade endoproteolítica em comparação com as demais condições estudadas. É importante ressaltar também, que o melhor tempo segundo o planejamento experimental (30 min), foi menor (50% ou mais) comparando com outros autores que utilizaram tempo de incubação de 60 até 180 minutos (apresentados na Tabela 1).

Figura 6 - Superfície de resposta da atividade endoproteolítica (Abs 440 nm) em função da temperatura (°C) x pH de incubação do extrato de trigo, fixando a variável tempo em 30 minutos.



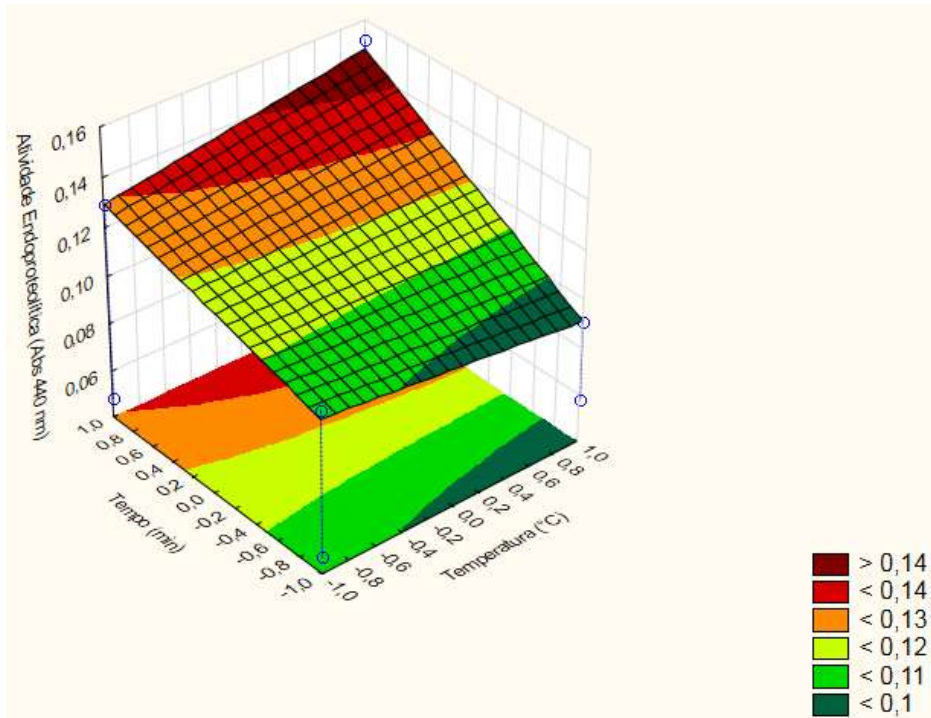
Foi observado a tendência de aumento na resposta da atividade endoproteolítica com o aumento da temperatura e do pH durante a incubação (Figura 6). Fahmy et al. (2004) caracterizaram a protease cisteína no trigo *Triticum aestivum*. A protease cisteína de *T. aestivum* apresentou boa estabilidade de armazenamento e foi estável até 50°C e apresentou um pH ácido amplo (pH 3,5-5,5), valores próximos aos observados na superfície de resposta (Figura 6).

Figura 7 - Superfície de resposta da atividade endoproteolítica (Abs 440 nm) em função do tempo (min) x pH de incubação do extrato de trigo, fixando a variável temperatura em 50°C.



Há uma tendência de aumento na resposta da atividade endoproteolítica com o aumento do tempo e do pH de incubação (Figura 7). Yang et al. (2011) purificaram uma protease do gérmen de trigo e encontraram as condições ótimas para a detecção da atividade proteolítica. A atividade da protease inicialmente aumentou de 30 até 50°C e depois diminuiu rapidamente com o aumento gradativo da temperatura até 80°C, finalmente a enzima mostrou temperatura ótima de 50°C. Usando caseína como substrato, a protease tinha um pH ótimo cerca de 5,5, em pH<4,5 ou pH>6,5, mais de 50% da atividade foi perdida. A protease manteve a sua atividade durante 30 minutos a pH 5,5. Já no presente trabalho, a atividade foi crescente quando foi utilizado o pH de 5,5 para 6,5 e a temperatura de incubação de 50°C, a mesma usada pelos autores.

Figura 8 - Superfície de resposta da atividade endoproteolítica (Abs 440 nm) em função do tempo (min) x temperatura (°C) de incubação do extrato de trigo, fixando a variável pH de 6,5.



Com o aumento do tempo e temperatura de incubação há uma tendência de aumento na resposta da atividade endoproteolítica (Figura 8). No trabalho de Fahmy et al. (2004), a enzima proteolítica exibiu maior atividade em relação à azocaseína do que os outros substratos examinados. Além disso, a temperatura ótima foi de 50°C e com base no estudo de estabilidade térmica 55% da sua atividade inicial permaneceu após pré-incubação da enzima a 50°C durante 30 minutos antes da adição de substrato. Valores semelhantes ao encontrado no presente estudo.

As superfícies de resposta apresentaram uma inclinação ascendente (Figuras 6, 7 e 8) reforçando que os melhores resultados foram obtidos em maiores faixas das variáveis estudadas. Dessa forma verificou-se que as condições para obter maior resposta na atividade endoproteolítica no trigo, dentre os valores estudado são: valor de pH de 6,5, temperatura de 50°C e tempo de 30 minutos. Foram necessários testes complementares para obter o ótimo de cada variável.

5.3 TESTES COMPLEMENTARES

Após concluir o planejamento experimental, amostras de maltes comerciais também foram analisadas, nas melhores condições estudadas (pH 6,5, 30 min e 50°C). Segundo produtores de cervejas artesanais, a melhor temperatura para a ativação das proteases é de 50 a 55°C (MORADO, 2009). Para detectar se a atividade seria maior com o aumento da temperatura, a metodologia foi testada a 55°C (Tabela 8).

Tabela 8 - Atividade endoproteolítica em diferentes temperaturas de incubação.

Temperatura (°C)	Atividade Endoproteolítica (Abs 440 nm)		
	Trigo	Malte de trigo	Malte de cevada
50	0,101±0,009bA	0,106±0,009bA	0,128±0,015aA
55	0,098±0,014bA	0,108±0,008bA	0,128±0,011aA

Média±Desvio Padrão. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Os resultados foram similares para ambas temperaturas, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a atividade endoproteolítica quando se elevou a temperatura de 50°C para 55°C. Entre os resultados obtidos para as diferentes amostras, o malte de cevada foi o que obteve uma maior atividade endoproteolítica e diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) das demais amostras, mas não houve diferença entre os valores do malte de trigo e do grão de trigo. Estes resultados podem ser explicados devido ao processamento dos maltes, onde os grãos de trigo ou cevada passam pela germinação e secagem controladas. Na etapa de germinação após o grão atingir um nível de umidade suficiente é ativado o metabolismo dos tecidos embrionários e aleurona, conduzindo, por sua vez, ao desenvolvimento de enzimas hidrolíticas. Na secagem utiliza-se temperaturas brandas para garantir a ação de enzimas que serão cruciais na cervejaria para hidrolisar o amido do malte em açúcares fermentáveis e outro componentes como as proteínas, que também possuem um papel importante nos extratos de malte.

Sendo a cevada o grão considerado ideal para maltagem, todas as respostas tecnológicas são melhores quando comparado à maltagem de outros grãos.

Faltermaier et al. (2015), analisaram a atividade enzimática proteolítica total no mosto com diferentes proporções de malte de cevada e de trigo, onde uma unidade de atividade enzimática proteolítica (U) correspondeu à hidrólise enzimática que libertou 1 mg de L-leucina/h sob as condições de ensaio. Uma diminuição global durante o processo de mosturação pode ser detectada em todas as amostras: amostra A (100% malte de trigo) com 23,84 a 8,41 U/g de malte e amostra F (100% malte de cevada) com 25,79 a 10,39 U/g de malte de 35°C a 78°C, respectivamente. Entre as amostras A e F foram observadas diferenças significativas na atividade da protease, durante todos os estágios de mosturação. A amostra F apresentou atividade proteolítica 19% superior a amostra A. Além disso, com aumento da proporção de malte de trigo, foi notada uma diminuição na atividade de protease. Embora as unidades sejam diferentes aquela dos autores, no presente trabalho também pode-se observar uma menor atividade endoproteolítica (abs 440 nm) no malte de trigo de 0,106 em comparação ao malte de cevada 0,128.

Como no planejamento experimental não foi observado o ponto ótimo para a variável pH, foi necessário realizar outro teste complementar utilizando o pH de 7,5 (Tabela 9).

Tabela 9 - Atividade endoproteolítica em diferentes pH do extrato.

pH	Atividade Endoproteolítica (Abs 440 nm)		
	Trigo	Malte de trigo	Malte de cevada
6,5	0,101±0,009bA	0,106±0,009bA	0,128±0,015aA
7,5	0,056±0,009bB	0,060±0,009bB	0,101±0,006aB

Média±Desvio Padrão. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Os resultados em pH 6,5 foram significativamente maiores ($p \leq 0,05$) em comparação aos resultados obtidos em pH 7,5, pois para todas as amostras, houve uma diminuição maior que 50% da atividade endoproteolítica no trigo, caracterizando uma inativação da enzima quando o pH foi elevado. O malte de cevada foi o que obteve maior atividade em comparação com as amostras de trigo e malte de trigo comercial, independente do pH utilizado.

Os autores Jones e Budde (2003) estudaram o efeito dos agentes redutores, oxidantes e do pH nas atividades endoproteolíticas do malte de cevada. As atividades globais diminuíram à medida em que o pH aumentou, com 15 U (uma unidade era a alteração a 440 nm/min multiplicado por 1000) para 3 U quando o pH passou de 5,1 para 6,2 em 30 minutos de mosturação, provavelmente porque as cisteína-endoproteínases ativas em pH ácido tornaram-se menos ativas e as proteinase aspártica e metalo-proteinase se tornaram predominantes. Esta alteração nas atividades proteolíticas refletiu nos níveis de FAN (nitrogênio amino livre) de malte e proteína solúvel, os quais caíram 47 e 30% respectivamente, à medida que o pH aumentava de 5,1 para 6,2.

5.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS DOS MALTES COMERCIAIS E DO GRÃO DE TRIGO

Foram realizadas análises de umidade, nitrogênio total, nitrogênio solúvel proteico e atividade endoproteolítica do trigo. Para a atividade endoproteolítica utilizaram-se as melhores condições encontradas a partir do planejamento experimental e testes complementares, ou seja, pH 6,5, 50°C e 30 minutos de incubação. Para comparação, fez-se também as mesmas determinações para as amostras de maltes comerciais (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores de umidade, nitrogênio total, nitrogênio solúvel e atividade endoproteolítica das amostras de trigo e maltes comerciais.

Amostra	Umidade (g/100g)	Nitrogênio Total b.s. (mg/g)	Nitrogênio Solúvel b.s. (mg/g)	Atividade Endoproteolítica (Abs 440 nm)
Trigo	13,91±1,13 ^a	26,90±0,33 ^a	13,41±0,79 ^a	0,101±0,009 ^b
Malte de trigo	7,66±0,02 ^b	16,80±0,14 ^b	8,09±0,73 ^c	0,106±0,009 ^b
Malte de cevada	5,03±0,08 ^c	15,94±0,18 ^c	9,88±0,34 ^b	0,128±0,015 ^a

Média±Desvio Padrão. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O teor de umidade do trigo foi de 13,91 g/100g (Tabela 10), como medida preventiva, o teor de umidade no trigo para uma melhor conservação durante o armazenamento é de no máximo 13% (BRASIL, 2001). O malte de trigo e de cevada obteve valores de 7,66 e 5,03 g/100g respectivamente. Os maltes apresentaram

valores menores de umidade pois durante o processo de maltagem os grãos que passaram pelas etapas de maceração e germinação, são submetidos à secagem mais intensa para cessar a germinação, nesta etapa a umidade do malte resultante é de aproximadamente 5% (MARTINS; RODRIGUES, 2015), valor similar ao encontrado nas amostras de malte de trigo e cevada que permite a melhor conservação do material (Tabela 10).

O conteúdo de nitrogênio total (Tabela 10), o grão de trigo teve maior teor (26,90 mg/g), seguido do malte de trigo e de cevada com 16,80 e 15,94 mg/g respectivamente. Já para o teor de nitrogênio solúvel, o grão de trigo obteve o maior valor de 13,41 mg/g de amostra, seguido do malte de cevada (9,88 mg/g) e malte de trigo (8,09 mg/g).

O nitrogênio solúvel correspondeu 62,0% do total de nitrogênio proteico do malte de cevada, seguido de 51,7% do grão de trigo e de 48,1% do malte de trigo, o que explica a maior ação das endoproteases no malte de cevada. Semelhantes ao estudo que caracterizou as alterações físico-químicas e da atividade enzimática de diferentes variedades de trigo da região sul do Brasil, que sofreram danos por chuva, Carvalho e Beléia (2015) obtiveram valores de nitrogênio solúvel entre 21,8 a 50,2% do total de nitrogênio proteico nos grãos.

Jin et al. (2008) investigaram a viabilidade da maltagem utilizando trigo com altos níveis de proteína. Com o aumento no teor de proteína do malte de trigo, a proteína solúvel (albumina) diminuiu, houve também uma diminuição linear significativa do Índice de Kolbach (relação entre nitrogênio solúvel e nitrogênio total em %) com o aumento do teor de proteína. Quando o teor de proteína no malte era de 16%, a atividade da protease chegou a 90 U e diminuiu significativamente para 40 U quando o malte de trigo apresentou teor de proteína de 18,5%, não houve correlação entre o teor de proteína e a atividade proteolítica no malte.

O teor de proteína do trigo foi de 14%, já os maltes apresentam menor valor aproximadamente 9% tanto para o malte de trigo quanto para o de cevada. Estes menores teores encontrados em malte são devido aos grãos reduzirem a proteína durante a maltagem para o desenvolvimento da plântula e radícula que são eliminadas no processamento.

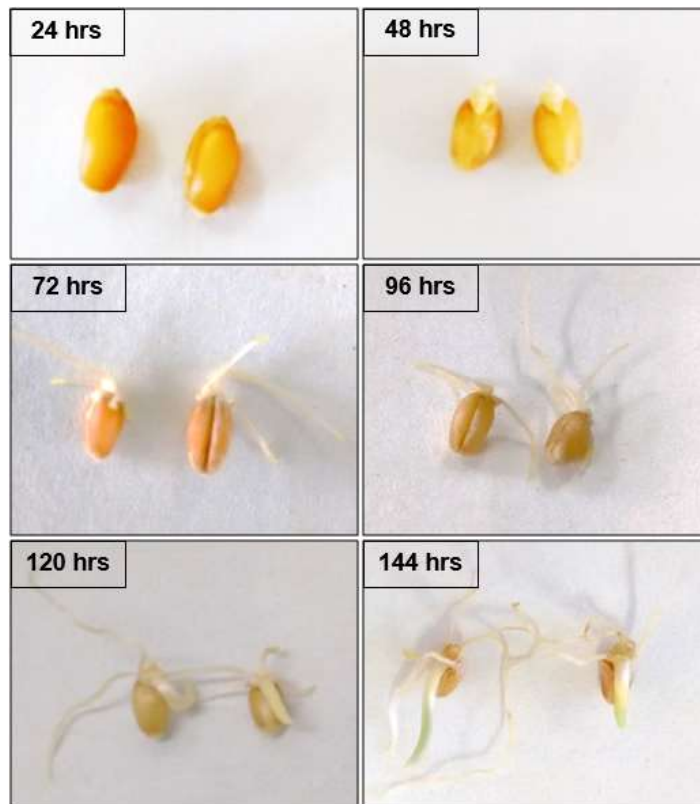
Os resultados da atividade endoproteolítica (Tabela 10) do malte de cevada foi significativamente maior com 0,128 (Abs 440 nm) em relação as demais

amostras que não se diferiram entre elas ($p \leq 0,05$), com valores próximos a 0,100 (Abs 440 nm).

5.5 CONTROLE DA GERMINAÇÃO DO GRÃO DE TRIGO

Durante a germinação, as proteínas de reserva são hidrolisadas e os aminoácidos reutilizados na síntese dos novos tecidos. A hidrólise inicial é mediada pelas proteases da própria semente. O desenvolvimento do grão de trigo a cada 24 horas de germinação foi acompanhado (Figura 9). As imagens mostram que ao longo da germinação há o crescimento das radículas, raízes seminais e do coleóptilo. A umidade inicial do grão de trigo pré-germinação foi de 12,51%, indo para 65,58% após 24 horas de maceração. A fase germinativa ocorre em quatro estágios, como: a) absorção de água pelas sementes (embebição); b) ativação dos sistemas enzimáticos; c) metabolismo das reservas de armazenagem e o seu transporte para o endosperma e embrião; d) o surgimento de radícula e o crescimento da plântula (MIRANSARI; SMITH, 2014).

Figura 9 - Desenvolvimento do grão em intervalos de 24 horas durante a germinação do trigo.



Fonte: O autor.

As mudanças nutricionais ocorrem nos componentes como proteínas e amido que são transformados por enzimas em compostos simples que serão utilizados na respiração, na produção de novas células do embrião e no transporte de nutrientes para broto (TAIZ; ZEIGER, 2006).

As análises da atividade endoproteolítica, nitrogênio solúvel e umidade foram realizadas nos grãos que foram germinados por 144 horas e analisados a cada 24 horas, os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Atividade endoproteolítica, nitrogênio solúvel e teor de umidade do grão de trigo germinado por 144 horas.

Tempo de Germinação (horas)	Atividade Endoproteolítica (Abs 440 nm)	Nitrogênio Solúvel b.s (mg/g)	Umidade (g/100g)
24	0,075±0,005 ^d	13,9±0,3 ^{bc}	65,6±0,4 ^a
48	0,075±0,012 ^d	14,7±0,6 ^b	65,8±0,2 ^a
72	0,090±0,004 ^c	12,3±0,5 ^d	54,4±0,5 ^c
96	0,099±0,005 ^b	13,2±0,4 ^{cd}	55,6±0,2 ^c
120	0,131±0,006 ^a	15,9±0,5 ^a	57,5±0,2 ^b
144	0,123±0,007 ^a	14,9±0,2 ^b	58,2±0,2 ^b

Média±Desvio Padrão. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A atividade endoproteolítica progrediu durante a germinação. Houve um aumento significativo a partir das 48 horas até 120 horas que não se diferiu de 144 horas de germinação (Tabela 11). Os valores iniciais de atividade são menores que os resultados da Tabela 10 para o trigo, pois é possível que tenha havido lixiviação de proteínas solúveis, albuminas e globulinas, durante o processo de hidratação dos grãos. A maior atividade endoproteolítica foi a 120 horas após o início da germinação com valor de 0,131 (Abs 440 nm). Neste ponto o nitrogênio solúvel apresentou maior teor com 15,9 mg/g de trigo. A atividade após 120 horas de germinação é comparável a do malte de cevada comercial (Tabela 10) e mais alta que a do malte comercial de trigo.

Brijs et al. (2002) estudaram as enzimas proteolíticas em grãos de centeio germinados. A atividade proteolítica geral do centeio aumentou durante os três primeiros dias de germinação permanecendo constante depois disso. A atividade endoproteolítica foi aproximadamente 7,5 vezes superior à dos grãos de centeio não germinados, sendo que o centeio teve uma atividade de 1,40 para o grão não germinado e de 9,80 de atividade proteolítica a 440 nm/hr em pH 5,5 e 40°C após 5 dias de germinação.

Faltermaier et al. (2013) estudaram parâmetros para a produção de malte de trigo com qualidade destinado à fabricação de cerveja e recomendam valores-limite para os parâmetros de qualidade do malte de trigo, sendo o nitrogênio solúvel de 6,50 a 7,80 mg/g. Os valores de nitrogênio solúvel obtidos dos grãos de trigo germinados (Tabela 11) foram superiores aos recomendados pelos autores.

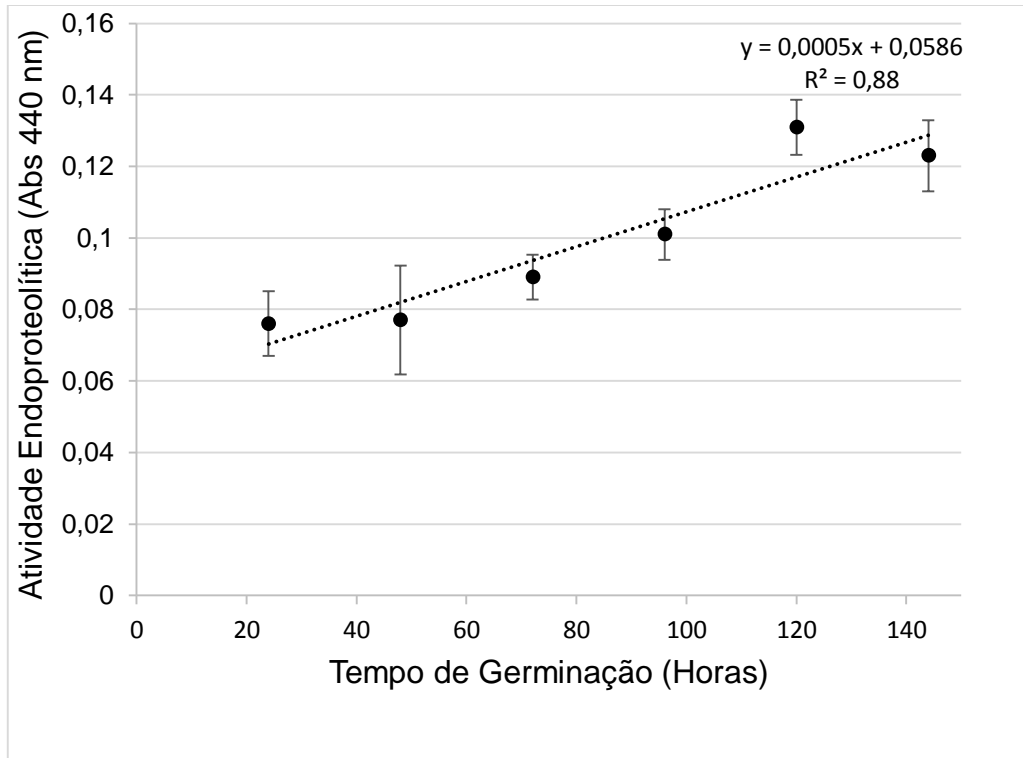
Jones (1999) estudou as endoproteases no malte de cevada e como elas afetam os níveis de proteína solúvel do mosto. Os resultados indicaram que havia pouca atividade na amostra não maltada. As atividades começaram a aumentar após o primeiro dia de germinação e atingiram um máximo no terceiro dia (valores três vezes maiores). Estes resultados são consistentes com o que seria esperado das enzimas que se formaram em resposta hormonais da planta ou pela ativação de enzimas preexistentes.

Os resultados do presente estudo confirmam que as endoproteases estão presentes durante a germinação do grão, sendo as responsáveis pela degradação de proteínas de armazenamento. Isto é consistente com o momento de seu papel fisiológico de fornecer ao embrião em desenvolvimento aminoácidos livres. As endoproteases são sintetizadas nas células vivas do grão e segregadas no endosperma onde são armazenadas as proteínas de armazenamento. No endosperma, as endoproteases hidrolisam as proteínas em peptídeos e subsequentemente carboxipeptidases no endosperma e aminopeptidases no escutelo completam a hidrólise de aminoácidos livres (OSMAN et al., 2002).

Os mesmos processos presumivelmente ocorrem durante a produção do malte. Em cereais como cevada e trigo, este processo é comercialmente importante pois constitui a base para as indústrias de malte e cerveja. Na maltagem e na fase de maceração da cerveja, uma porção das proteínas insolúveis da cevada deve ser convertida em proteínas solúveis. Esta fração de proteínas solúveis compreende uma mistura de aminoácidos, peptídeos e proteínas dissolvidas, e uma grande parte destes constituintes surgem por proteólise das proteínas do cereal. Para produzir mais eficientemente cepas de malte que melhoraram a qualidade de proteínas solúveis e desenvolver métodos de maltagem e de fermentação mais eficazes, é necessário determinar quais enzimas proteolíticas estão envolvidas e como elas funcionam (JONES; BUDDE, 2005).

Foi possível correlacionar os resultados obtidos na análise de atividade endoproteolítica durante a germinação do grão de trigo (Figura 10).

Figura 10 - Atividade endoproteolítica do trigo durante a germinação.



Há aumento relativamente contínuo na atividade endoproteolítica durante as 144 horas de germinação. Observa-se na Figura 10, uma reta ascendente, ou seja, a atividade endoproteolítica foi crescente em relação ao tempo de germinação. Para malteadores e cervejeiros, endoproteases e seus produtos executam multifunções durante a germinação, secagem, maceração, fermentação, e na cerveja. Fornecem aminoácidos livres para a síntese de enzimas hidrolíticas, para a produção de cor e substâncias de sabor e para nutrição de levedura. Além disso, a hidrólise da proteína de armazenamento e estruturas relacionadas facilitam o movimento da água e da enzima hidrolítica, libertam o amido dos corpos proteicos e garantem uma modificação uniforme. A hidrólise insuficiente das proteínas de armazenamento está associada a problemas de processamento, baixo extrato e baixa fermentação. Por outro lado, a proteólise excessiva está associada com o desenvolvimento de sabores e cores indesejáveis e com níveis diminuídos de proteínas formadoras de espuma na cerveja. Os aumentos no nitrogênio amino livre e proteínas solúveis no mosto em comparação com o malte fornecem mais evidências em apoio da proteólise durante a maceração (OSMAN et al., 2002).

O papel das proteases de cisteína em desenvolvimento e germinação de proteólise sementes de cereais é um processo complexo que envolve muitas redes metabólicas, diferentes compartimentos subcelulares, e vários tipos de peptidases, principalmente, cisteína, serina, aspártico e metalo-proteases. Muitos resultados da investigação indicam que proteases de cisteína pode ser o grupo mais abundante de proteases responsáveis pela degradação e mobilização das proteínas de reserva (DOMINGUES, CEJUDO; 1996).

Não há correlação entre atividade enzimática e nitrogênio solúvel formado, primeiro porque as radículas onde novos tecidos são sintetizados foram eliminadas e, segundo, porque a proteína do grão analisado está sendo consumida. Por outro lado, outros estudos mostraram essa correlação, Jin et al. (2014) investigaram a associação da solubilidade proteica com as atividades das enzimas de degradação do malte de trigo. A atividade proteolítica foi aumentada de 6,00 U no trigo para 39,36-83,69 U em maltes de trigo. A protease exibiu atividade máxima em índices de Kolbach (relação em % entre o N-solúvel e o N-total) de 37,6, a 42,7%, respectivamente. Foi estabelecida uma interação entre a degradação proteica, a atividade enzimática e a qualidade do mosto. O aumento da protease promoveu a degradação da proteína, ou seja, melhorou o índice de Kolbach do malte de trigo e promoveu a degradação das gliadinas em albuminas e globulinas.

6 CONCLUSÃO

A partir do planejamento experimental e testes complementares, foi possível verificar que as melhores condições dos parâmetros utilizados na metodologia de atividade endoproteolítica foram pH 6,5, 30 minutos de reação e 50°C. Foi possível detectar uma atividade enzimática crescente durante o desenvolvimento do grão de trigo na germinação.

REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis**, 16^a ed. Washington, DC. 1995.

AACC. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists**, v.1 e 2. 10 ed. St. Paul: AACC, 2000.

BANFORTH, C. W.; BARCLAY, A. H. P. Malting technology and the uses of malt. In: MACGREGOR, A. W.; BHATTY, R. S. (Eds.). **Barley: Chemistry and Technology**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1993. p.297-354.

BELDEROK, B.; MESDAG, H.; DONNER, D. A. Survey of gluten proteins and wheat starches. In: _____. **Bread-Making Quality of Wheat**. Springer, New York, 2000, p.30-39.

BOTTARI, A.; CAPOCCHI, A., FONTANINI, D.; GALLESCHI, L. Major proteinase hydrolysing gliadin during wheat germination. **Phytochemistry**, v.43, n.1, p.39-44, 1996.

BOWDEN, P; FERGUSON, N. et al. Germination and emergence. In: NSW Department of Primary Industries. **Wheat growth and development**. Orange, 2008. p.9-26.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.11 de 13 de março de 2013. Regulamento técnico do malte de cevada. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 mar. 2013, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SARC no 7, de 15 de agosto de 2001. Regulamento técnico de identidade e de qualidade do trigo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n.160-E, 21 ago. 2001. Seção 1, p.33-35.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.38 de 30 de novembro de 2010. Regulamento técnico do trigo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 01 dez. 2010(a), Seção 1, p.3.

BRIJS, K.; TROGH, I; JONES, B. L.; DELCOUR, J. A. Proteolytic enzymes in germinating rye grains. **Cereal Chem.**, v.79, n.3, p.423-428, 2002.

CARVALHO, P. T; BELÉIA, A. D. P. Alterações físico-químicas e atividade enzimática de trigo com germinação pré-colheita. **Rev. Ciênc. Agron.**, v.46, n.3, p.524-531, jul-set, 2015.

CMBTC - Canadian Malting Barley Technical Center. Malting with canadian barley. In: CMBTC (Ed.) - **Canadian Barley Malting and Brewing Technical Guide**, p.21-24, 2012.

DAMODARAN, S. Componentes principais dos alimentos: aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.179-262.

DEPEC - Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos. **Trigo**, 2016.

Disponível em:

<https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_trigo.pdf> Acesso em: 04 de nov. de 2016.

DOMINGUEZ, F.; CEJUDO, F. J. Characterization of the endoproteases appearing during wheat grain development. **Plant. Physiol.**, Seville, v.112, n.3, p.1211-1217, 1996.

FAHMY, A. S.; ALI, A. A., MOHAMED, S. A. Characterization of a cysteine protease from wheat *Triticum aestivum* (cv. Giza 164). **Bioresource Technology**, v.91, n.3, p.297-304, 2004.

FALTERMAIER, A.; NEGELE, J.; BECKER, T.; GASTL, M.; ARENDT, E. Evaluation of mashing attributes and protein profile using different grist composition of barley and wheat malt. **Brewing Science**, v.68, n.5, p.67-77. 2015.

FALTERMAIER, A.; WATERS, D.; BECKER, T.; ARENDT, E. K., GASTL, M. Protein modifications and metabolic changes taking place during the malting of common wheat (*Triticum aestivum* L.). **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v.71, n.3, p.153-160, 2013.

FORNASIERI FILHO, D. F. **Manual da cultura do trigo**. Jaboticabal: Funep, 2008. 338 p.

FISCHER, A.; FELLER, U. The pattern of proteins and of peptide hydrolase activities in shoots of field-grown winter wheat during the cold season. **Agronomie**, EDP Sciences, v.4, n.13, p.293-299, 1993.

GUERRERO, B. G.; EDNEY, M. J. Determinación de la actividad endo-proteolítica en cebada malteada. **Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay**, n.8, p.44-51, 2013.

HALPERN, M. J. **Bioquímica**. 1. ed. Lisboa: Lidel Edições Técnicas, 1997.

HOSENEY, R. C. **Principles of Cereal Science and Technology**. Manhattan: AACC, 1986. 327 p.

IAPAR- Instituto Agrônomo do Paraná. **Cultivar de Trigo IPR Catuara TM: Trigo melhorador alto rendimento precoce**, 2012. Disponível em:

<http://www.iapar.br/arquivos/File/Sementes_e_Mudas/ipr_catuara.pdf> Acesso em: 08 de nov. de 2016.

IZYDORCZYK, M. S.; MACGREGOR, A. W. Evidence of intermolecular interactions of β -glucans and arabinoxylans. **Carbohydrate Polymers**, v.41, n.4, p.417-420, 2000.

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. **J. Inst. Brew.**, v.120, n.3, p.201-206, 2014.

JIN, Y. L., SPEERS, R. A., PAULSON, A. T., STEWART, R. J. Barley β -glucan and their degradation during malting and brewing. **Technical Quaterly-Master Brewers Association of the Americas**, v.41, n.3, p.231-240, 2004.

JIN, Y.; ZHANG, K.; DU, J. Effects of wheat protein content on endosperm composites and malt quality. **Journal of the institute of brewing**, v.114, n.4, p.289-293, 2008.

JONES, B. L.; BUDDE, A. D. Effect of reducing and oxidizing agents and pH on malt endoproteolytic activities and brewing mashes. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, n. 25, p.7504-7512, 2003.

JONES, B. L.; BUDDE, A. D. How various malt endoproteinase classes affect wort soluble protein levels. **Journal of Cereal Science**, v.41, n.1, p.95-106, 2005.

JONES, B. L. Malt Endoproteinases and how they affect wort soluble protein levels. In: **9th Australian Barley Technical Symposium**, 1999. 8 p.

KRUGER, J. E.; MACGREGOR, A. W.; MARCHYLO, B. A. Endogenous cereal enzymes. In: FOX, P. F. **Food Enzymology**. London: Elsevier Applied Science, 1991. p.1-46.

KRUGER, J. E.; REED, G. Enzymes and color. In: POMERANZ. **Wheat Chemistry and Technology**. Washington: AACC, 1988. cap.8, p.141-501.

LORENZ, K. Cereal sprouts: composition, nutritive value, food applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.13, n.4, p.353-385, 1980.

MARTINS, V. M. R.; RODRIGUES, M. A. Produção e tecnologia de cereais: processo de maltagem da cevada. In: **Jornadas de lúpulo e cerveja: novas oportunidades de negócio**, Bragança, p.37-51, 2015.

MEREDITH, P.; POMERANZ, Y. Sprouted grain. In: POMERANZ, Y. (Ed.). **Advances in cereal science and technology**. Saint Paul: A.A.C.C, 1985. v.7, p.239-320.

METIVIER, J. R. Dormência e germinação. In: FERRI, M. G. (Coord.). **Fisiologia vegetal**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária: Ed. da Universidade de São Paulo, 1979. v.2, cap.12, p.343-392.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environ. Exp. Bot.** v.99, p.110-121, 2014.

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009.

OSMAN, A.M.; COVERDALE, S.M.; COLE, N.; HAMILTON, S.E.; JERSEY, J.; INKERMAN, P.A. Characterization 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.

PARKIN, K. L. Enzimas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.261-342.

POMERANZ, Y. **Modern cereal Science and technology**. New York: VCH Publishers, 1987.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.

PRESTON, K.; KRUGER, J. Location and activity of proteolytic enzymes in developing wheat kernels. **Canadian Journal of Plant Science**, v.56, n.2, p. 217-223, 1976.

RANI, K. U.; RAO, U. J. S. P.; LEELAVATHI, K.; RAO, P. H. Distribution of enzymes in wheat flour mill streams. **Journal of Cereal Science**, v.34, n.3, p.233-242, 2001.

RASPER, V. F. Quality evaluation of cereal and cereal products. In: LORENZ, K. J.; KULP, K. **Handbook of cereal science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.595-638.

RICARDO, C. P.; TEIXEIRA, A. **Enzimas**. 4. ed. Lisboa: Plátano Editora S.A., 1993.

RIEGEL, R. E. **Bioquímica**. 3. ed. São Leopoldo: Edunisinos, 2003.

SANTOS, L. F., KOBLITZ, M. G. B. Proteases. In: KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.77-103.

SANTOS, P. M.; PROVAZI, M.; SOUZA, G. B. **Determinação de atividade de proteases em Panicum maximum cv. Tanzânia**. Comunicado técnico: Embrapa Pecuária Sudeste, v.62, p. 1-5, 2005.

SHEWRY, P.R.; CHARMET, G.; BRANLARD, G.; LAFIANDRA, D.; GERGELY, S.; SALGADO, A.; SAULNIER, L.; BEDIO, Z.; CLARE MILLS, E.N.; WARD, J.L. Developing new types of wheat with enhanced health benefits. **Trends in Food Science & Technology**, v.25, n.2, p.1-8, 2012.

SIGMA-ALDRICH. **Azocasein: protease substrate**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2765?lang=pt®ion=BR>> Acesso em: 23 de mar. de 2016.

ŠRAMKOVÁ, Z.; GREGOVÁ, E.; ŠTURDÍK, E. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. **Acta Chimica Slovaca**, v.2, n.1, p.115-138, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4th ed. Washington, DC: Sinauer Associates Inc., 2006. 705 p.

USDA- United States Department of Agriculture - Foreign Agricultural Service. - **World Wheat Trade**, 2016. Disponível em:
<<http://www.ers.usda.gov/topics/crops/wheat/>> Acesso em: 04 de nov. de 2016.

WHITAKER, J. R. The Proteolytic Enzymes. In: _____ **Principles of enzymology for the food sciences**. New York : M. Dekker, 1972. p.511-544.

WROBEL, R.; JONES, B. L. Electrophoretic study of substrate and pH dependence on endoproteolytic enzymes in green malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v.98, n.6, p.471-478, 1992.

YANG, R.; SONG, J.; GU, Z.; LI, C. Partial purification and characterization of cysteine protease in wheat germ. **J. Sci. Food Agric.**, v.91, n.13, p.2437-2442, 2011.