

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Caracterização de Transglutaminase para Aplicação em Filmes de Gelatina

M. E. R. DE SOUZA¹, E. B. BRANDALISE¹, C. BALDASSO¹ e A. DETTMER¹

¹ Universidade de Caxias do Sul – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias
Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - E-mail: elizetebaggio@yahoo.com.br

RESUMO

As transglutaminases (EC 2.3.2.13) ou TGases são enzimas transferases capazes de catalisar a formação de ligações covalentes cruzadas entre proteínas, peptídeos e várias aminas primárias através de reações do tipo acil-transferência entre grupos γ -carboxiamida de resíduos de glutamina e grupos aminas. As transglutaminases vem sendo utilizadas em filmes de gelatina devido a diminuição do caráter hidrofílico e alteração das propriedades mecânicas dos mesmos. No presente trabalho, a enzima transglutaminase (3 g/l) foi caracterizada em temperaturas de 37°C, 50°C e 60°C, em diferentes valores de pH (6-8) e sua estabilidade térmica a 50 °C também foi avaliada. A enzima apresentou melhor atividade em pH 7 e temperatura de 37°C. A desnaturação da enzima ocorreu em 15 minutos, quando submetida a temperatura de 50°C.

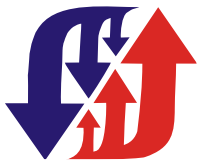
Palavras-chave: Enzima Transglutaminase, Atividade Enzimática, Estabilidade Térmica, Temperatura Ótima, pH Ótimo.

INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas globulares solúveis sintetizadas pelos organismos vivos com a finalidade específica de catalisar as reações bioquímicas que, de outro modo, não ocorreriam sob as condições fisiológicas habituais. As vantagens de utilizar enzimas na produção de filmes de gelatina decorrem de sua capacidade de catalisar reações, devido à sua grande especificidade, sem causar reações secundárias (ÓRDOÑEZ, 2005).

A Transglutaminase (TGase) (EC 2.3.2.13) é uma enzima capaz de modificar proteínas através de reações de transferência de acila entre um grupo G-carboxiamida de peptídeos ligados a resíduos de glutamina (doadores de acila) e uma variedade de aminas primárias (aceptores de acil), incluindo o grupo ϵ -amino de resíduos de lisina em certas proteínas (HINZ et al., 2007). As propriedades bioquímicas das MTGases e TGases contribuíram para seu emprego em larga escala na indústria, pois estas enzimas são capazes de introduzir ligações covalentes nas proteínas, alterando propriedades como: solubilidade, habilidade de hidratação, capacidade emulsificante e espumante, viscosidade, elasticidade e geleificação das proteínas para o consumo humano (JAROS et al., 2006; LORENZEN et al., 2002).

De acordo com Ando et al. (1989), a massa molecular da transglutaminase, avaliada por SDS-PAGE, é em torno de 40 kDa, com pH ótimo, entre 5 e 8. Entretanto, mostra



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

alguma atividade em valores de pH entre 4 e 9, sendo estável em larga faixa de pH. A temperatura ótima da transglutaminase é 50°C (por 10 minutos e pH 6,0) e se mantém ativa por 10 minutos a 40 °C, mas perde a sua atividade a 70 °C em poucos minutos.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a atividade enzimática de uma transglutaminase comercial, bem como sua estabilidade térmica, temperatura ótima e pH ótimo. A caracterização da enzima visa sua posterior aplicação na produção de filmes contendo gelatina.

MATERIAL E MÉTODOS

Determinação da atividade enzimática

Para determinação da atividade enzimática, foi utilizada a enzima transglutaminase, solução de 3 g/l, cedida pela Ajinomoto do Brasil, Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. (São Paulo, SP, Brasil), comercializada como ACTIVA® YG.

A metodologia foi adaptada de GROSSOWICZ et al. (1950). O reagente “A” foi preparado com Tampão Tris-acetato 200 mM e pH 6,0 contendo 100mM de hidroxilamina, 10mM de glutatona reduzida e 30 mM de substrato CBZ-Gln-Gly. O Reagente “B” continha: solução 1:1:1(v/v/v) de HCl 3 N, ácido tricloroacético a 12%, e FeCl₃.6H₂O a 5% dissolvido em HCl 0,1 N. Em 1,0 mL de extrato enzimático adicionou-se a mesma quantidade de reagente “A”. Após a homogeneização incubou-se por 10 min a 37°C e interrompeu-se a reação adicionando 1,0 mL do reagente “B”. Procedeu-se a leitura da amostra em espectrofotômetro a 525 nm. A curva-padrão foi feita com ácido L-glutâmico- γ -monohidroxâmico. Uma unidade de atividade enzimática TGase foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1,0 μ mol de hidroxamato por minuto nas condições do ensaio.

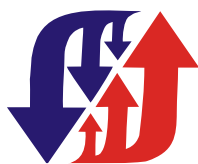
Efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática

Diferentes valores de pH (6-8) foram avaliados a fim de determinar o valor ótimo. Temperatura e estabilidade térmica também foram avaliados. O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado em temperaturas de 37, 50 e 60°C. Para a determinação da estabilidade térmica, utilizou-se pH 7 e as soluções enzimáticas foram expostas a temperatura de 50°C durante 0, 15, 30, 45 min. A atividade residual foi calculada considerando o tempo de 0 min como controle.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Efeitos do pH e da temperatura na atividade enzimática

Diversos fatores afetam as reações catalisadas pelas enzimas, dentre os quais se destacam: a concentração da enzima, a concentração de substratos, pH, e temperatura. A análise de todos esses fatores é importante no conhecimento da natureza da reação enzimática.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

O efeito dos diferentes valores de pH sobre a atividade enzimática está apresentado na Figura 1 (a). Observa-se que os maiores valores para a atividade enzimática foram obtidos para valores de pH de 7 e 8.

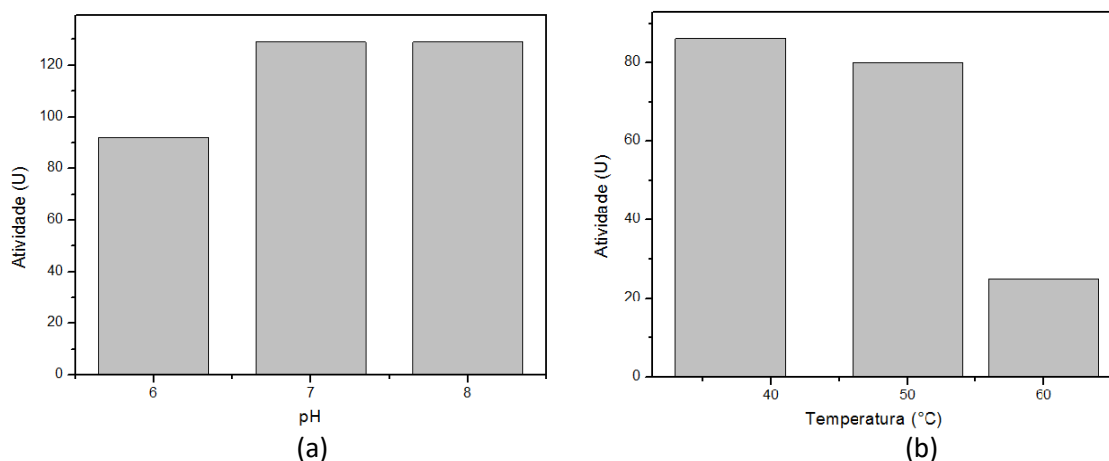


Figura 1: atividade enzimática para a) diferentes valores de pH b) diferentes temperaturas.

Os valores para a atividade enzimática em diferentes temperaturas estão apresentados na Figura 1 (b). As maiores atividades ocorreram nas temperaturas de 37 e 50°C. De acordo com Piccolo (2006) e Gauche (2008), transglutaminases, normalmente, apresentam pH ótimo entre 5-8 e temperatura ótima de 50°C. Diversos trabalhos apresentados na literatura indicam que a utilização da enzima transglutaminase deve acontecer em temperaturas de 50°C (CHAMBI e GROSSO, 2006; PIOTROWSKA et al., 2008). A partir dos resultados obtidos neste trabalho observa-se que temperaturas mais brandas podem ser utilizadas sem prejudicar a ação da enzima.

Atividade Residual

A estabilidade térmica da enzima é muito importante para a sua aplicação industrial. Na Figura 2 está apresentada a estabilidade térmica da enzima.

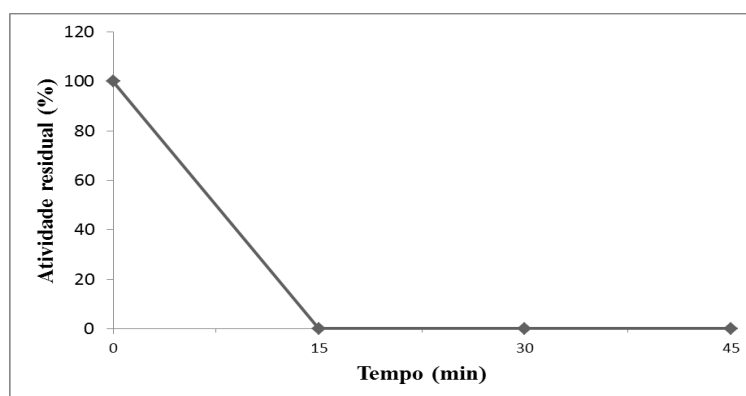
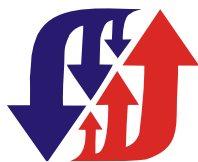


Figura 2: Atividade residual (%) da transglutaminase



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Observou-se que a enzima perdeu totalmente a sua atividade quando exposta durante 15 min a temperatura de 50°C. Este fato pode ser atribuído a desnaturação da mesma.

Estudos, realizados por Souza et al. (2011), demonstraram que a atividade da MTGase produzida por *Bacillus circulans* BL32 foi reduzida a zero após 10 min exposta a temperaturas de 60 e 70 °C. Porém, em temperaturas de 30, 40 e 50 °C a enzima manteve-se estável por até 120 min. Estudando a produção de MTGase por uma linhagem de *Streptomyces sp.*, Mahmood (2013) observou que em temperatura de 40°C, a enzima era estável termicamente por 60 min. Nesse mesmo período, a referida enzima conseguiu preservar entre 35% e 10% de sua capacidade catalítica a 50 e 55°C, respectivamente, e não apresentou atividade em 30 min de incubação a 60°C.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados conclui-se que a enzima transglutaminase apresentou melhores valores para a atividade enzimática em temperaturas de 37 e 50°C, valores de pH de 7 e 8. Ainda, determinou-se que a enzima não apresenta atividade residual quando submetida a temperatura de 50°C durante 15 min. Diante do exposto, conclui-se que a utilização da mesma para a produção de filmes de gelatina pode ser realizada com pH 7,00 e em temperaturas amenas (37°C).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKE, H.; MOTOKI, M. 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms, *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, n. 10, p. 2613-2617.
- GAUCHE, C.; TOMAZI, BORDIGNON-LUIZ, M. T. 2008. Polimerização das proteínas do leite por transglutaminase: modificação das propriedades funcionais e aplicação em produtos lácteos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 26, n. 1, p. 111-122.
- CHAMBI, H.; GROSSO, C. 2006. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, v. 39, 458-466.
- GROSSOWICZ, N.; WAINFAN, E.; BOREK, E.; WAELSCH, H. 1950. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*, v.187, p.111-125.
- HINZ, K.; HUPPERTZ, T.; KULOZIK, U.; KELLY, A. L. 2007. Influence of enzymatic crosslinking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. *International Dairy Journal*, v. 17, n. 4, p. 289-293.
- JAROS, D.; JACOB, M.; OTTO, C.; ROHM, H. 2010. Excessive crosslinking 583 of caseins by microbial transglutaminase and its impact on physical 584 properties of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, v. 20, 321-327.
- LORENZEN, P. C.; SCHILIMME, E.; ROOS, N.1998. Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase, *Nahrung*, v. 42, p. 151-154.
- MAHMOOD, W. A. 2013. Production of Transglutaminase by a Local *Streptomyces* Isolate Using Wheat Bran. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, v. 9, n. 1, p. 33-42.
- ORDÓÑEZ, J. A. 2005. *Tecnologia de Alimentos – Volume 1*. ISBN 9788536304366.294 p. Editora Artmed.
- PICCOLO, K. C. 2006. Avaliação do efeito da enzima transglutaminase no processo de produção de requeijão cremoso. São Caetano do Sul-SP, 102p., 2006. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de processos químicos e bioquímicos). Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia.
- PIOTROWSKA, B.; SZTUKA, K.; KOLODZIEJSKA, I.; DOBROSIELSKA, E. 2008. Influence of transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) on the properties of fish-skin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, v. 22, 1362-1371.
- SOUZA, C. F. V.; VENZKE, J. G.; FLORES, S. H.; AYUB, M. A. Z. 2011. Enzymatic Properties of Transglutaminase Produced by a New Strain of *Bacillus circulans* BL32 and its Action Over Food Proteins. *LWT-Food Science and Technology*, v. 44, n.2, p. 443-450.