

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Hidrólise das proteínas do soro de queijo utilizando alcalase imobilizada em pó de sabugo de milho

Clariana Zanutto Paulino da Cruz¹, Aline Buda dos Santos Vaz,² Elen Tomoko Taniguchi³, Juliana Cristina Bassan⁴, Natália Bassan⁵, Saulo Santesso Garrido⁶ e Rubens Monti⁷

^{1,2,6}Instituto de Química, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Departamento de Biotecnologia. Cep. 14800-060 Araraquara-SP, Brasil- E-mail: clarianadacruz@gmail.com

^{3,4,5,7}Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Departamento de Alimentos e Nutrição Cep. 14800-903. Araraquara, SP, Brasil, E-mail: montiru@cfar.unesp.br

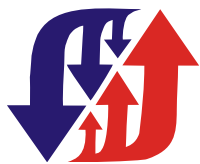
RESUMO

O trabalho atual teve como objetivos imobilizar a alcalase em pó de sabugo de milho (SM), realizar a hidrólise das proteínas do soro de queijo utilizando alcalase glioxil pó de sabugo de milho (AGSM) e comparar os resultados obtidos com a alcalase glioxil agarose (AGA) e alcalase solúvel (AL). Os derivados AGA e AGSM apresentaram rendimentos de imobilização semelhantes=71,02% e 71,05% respectivamente. AGSM obteve melhor estabilidade térmica (62 e 15,5 vezes maior do que a AL e AGA nessa ordem). A hidrólise das soroproteínas utilizando AGSM foi comprovada pelo teor de proteína=7,05 mg/mL, grau de hidrólise=26,59%, SDS-PAGE, e perfil cromatográfico o qual mostrou um aumento no número de picos em diferentes tempos de retenção. Resultados semelhantes foram encontrados para AL e AGA, portanto, o SM representa uma fonte inovativa, de baixo custo, para imobilização da alcalase e obtenção de hidrolisados proteicos (HP).

Palavras-chave: Alcalase; soro de queijo; hidrolisados proteicos; ligação covalente multipontual; pó de sabugo de milho.

INTRODUÇÃO

O soro do leite bovino é um subproduto da fabricação de queijos, altamente poluente e de grande valor nutricional, devido à presença de lactose e proteínas. Uma alternativa para minimizar o impacto ambiental e aproveitar as propriedades nutritivas do soro é utilizar este resíduo na obtenção de hidrolisados proteicos (ROHLFES *et al.*, 2014). Estes hidrolisados representam uma fonte rica de nutrientes exercendo impacto positivo sobre a saúde e as diversas funções do organismo. A maneira mais comum de sua obtenção é por meio da hidrólise de soroproteínas utilizando enzimas proteolíticas (MÖLLER *et al.*, 2008; NAJAFIAN e BABJI, 2014). A alcalase é uma endopeptidase caracterizada por seu desempenho em altas temperaturas e moderada alcalinidade. A imobilização covalente multipontual da enzima melhora fortemente a estabilidade, atividade e a seletividade. O sistema hidrolítico com imobilização enzimática é mais viável economicamente que o sistema de enzimas solúveis, pois o processo de imobilização pode ser executado continuamente, possibilitando a reutilização da enzima (GUISÁN, 2006). Ademais, os suportes alternativos denominados lignocelulósicos podem ser utilizados como forma de diminuição de custo. A agarose é muito utilizada como suporte para imobilização de enzimas, devido suas características físico-químicas, mas possui custo elevado. O pó de sabugo de milho (SM) é o principal resíduo formado da indústria de processamento de milho. Desta forma, ressalta-se a importância da utilização deste material, como suporte inovativo, de baixo custo, para a imobilização de enzimas. Os objetivos deste trabalho foram imobilizar a alcalase em pó de



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

sabugo de milho, caracterizar a enzima livre e imobilizada, realizar a hidrólise das proteínas do soro de queijo utilizando os derivados e comparar os resultados obtidos com a alcalase livre e o derivado.

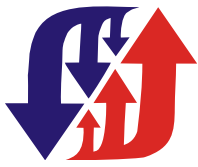
MATERIAL E MÉTODOS

Alcalase livre e derivados: Alcalase® foi adquirida comercialmente da Merk e imobilizada covalentemente por ligação multipontual em agarose e suporte inovativo pó de sabugo de milho, segundo Guisán (2006). **Ensaio de atividade enzimática:** foi feito usando substrato sintético Boc-Ala-ONP de acordo com Tardioli *et al.* (2003). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de Boc-Ala-ONp por minuto. **Caracterização cinética da enzima livre e dos derivados.** Os valores K_M e V_{max} aparentes da alcalase foram determinados pelo método gráfico de Eadie-Hofstee. **Inativação térmica e pH ótimo:** AL e os derivados foram incubados a 65° C, em solução tampão fosfato de sódio 100 mmol.L^{-1} pH 7. Em determinados tempos, uma amostra foi retirada, e verificada a atividade enzimática. Para o pH ótimo, as enzimas foram incubadas em sistemas tamponantes, com pH ajustado entre 3,0 e 10. **Hidrólise das proteínas do soro:** 20 mL de soro tratado (dialisado, desengordurado e centrifugado) foi utilizado para a da hidrólise das proteínas por 24 horas a 50° C, pH 9 e agitação 100 rpm (shaker Innova 40) usando 0,5 mL de AL (diluída 300 vezes) e 0,5 g de cada derivado. **Caracterização e quantificação dos hidrolisados:** Foram determinados o grau de hidrólise DH (%) (SPADARO *et al.*, 1979), o teor de proteínas (BRADFORD, 1976), SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e perfil dos hidrolisados por CLAE em cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A com coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (15 x 4,6 mm; 5 μm ; 300 Å), gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Caracterização cinética da enzima livre e dos derivados

Os derivados apresentaram rendimento de imobilização semelhantes sendo 71,02% e 71,05% para AGA e AGSM, respectivamente. Para a atividade recuperada, obteve-se 100% para a AGA e 66,16% para a AGSM (Tabela 1). Embora AGSM tenha apresentado um valor inferior que AGA, ainda assim exibe uma medida superior a outras encontradas na literatura. Por exemplo, Tardioli *et al.* (2003) obtiveram 54% de retenção da atividade da AGA. Os resultados de imobilização obtidos para AGA e AGSM foram muito semelhantes, revelando que esse resíduo lignocelulósico apresenta amplo potencial para imobilização de enzimas, fato que complementa valores já encontrados por nosso grupo de pesquisa, o qual já conseguiu imobilizar outras enzimas com muito êxito nesse suporte inovativo e de baixo custo. Na Tabela 1 e Figura 1 é possível observar que o derivado AGSM é 62 vezes mais estável do que a AL e 15,5 vezes mais estável que AGA. Sendo AGA 2 vezes mais estável que AL. Além disso, o tempo de meia-vida em horas da AL é de 0,5, da AGA, 02 e da AGSM 31. Na literatura encontramos resultados semelhantes de estabilidade térmica para a AGA quando comparado com AL e em nenhum deles foram encontrados valores superiores ao AGSM deste trabalho. Tardioli (2003) obteve AGA 3,6 vezes mais estável que AL a 60°C. Yust *et al.* (2010) produziram um derivado alcalase glioxil-agarose 24 vezes mais estável do que a AL a 50°C. Portanto, pode-se dizer que a imobilização da alcalase em suporte inovativo pó de sabugo de milho é exequível e apresenta melhor estabilidade térmica do que AL e AGA. A



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

estabilidade térmica da enzima é um parâmetro cinético muito importante para verificar o quanto a imobilização é capaz de manter ou modificar as características cinéticas em relação à enzima solúvel, pois a fixação da enzima em um suporte sólido dificulta sua movimentação e, conseqüentemente, reduz a capacidade de autodigestão. Ademais, é uma variável bastante considerável na obtenção de HP, pois permite que se trabalhe em temperaturas maiores por períodos prolongados, o que evita o crescimento microbiano no reator quando se pretende o escalonamento do processo (PESSATO, 2014). A ação catalítica de uma reação enzimática é alcançada dentro de limites muito estreitos de pH. Segundo Yust et al. (2010), o pH ótimo de atuação da alcalase varia de 6,5 a 8,5. Na Tabela 1 é exposta a faixa de pH ótimo para AL (8,0-9,5), AGA (6,5-10,0) e AGSM (7,0-10,0) e se assemelham aos valores expressos pelos autores.

Tabela 1. Caracterização cinética da alcalase livre e imobilizada.

| Enzima | Atividade enzimática | Km (mM) | V _{máx} U/mL | pH ótimo | Eficiência catalítica | Rendimento de imobilização (%) | Atividade Recuperada (%) | Tempo de meia-vida (horas) | Fator de estabilização |
|---------------------------------------|----------------------|---------|-----------------------|----------|-----------------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|
| Alcalase solúvel | 4426 U/mL ±287,91 | 0,243 | 115,96 U/mL | 8,0-9,5 | 477,2 | - | - | 0,5 | - |
| AGA (6 BCL) 87,6 mmol.g ⁻¹ | 13,80 U/g ±0,31 | 1,53 | 25,08 U/g | 6,5-10,0 | 16,39 | 71,02±12,86 | 100,0 ±0,00 | 2 | 4 |
| AGSM (131,8 mmol.g ⁻¹) | 9,54 U/g ±0,38 | 0,464 | 10,50 U/g | 7,0-10,0 | 22,6 | 71,05±11,72 | 66,16±3,30 | 31 | 62 |

Figura 1. Inativação térmica a 65° C.

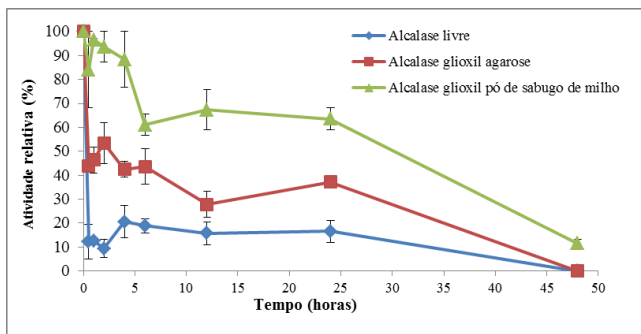
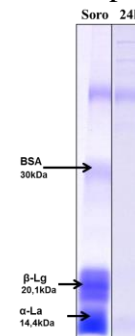
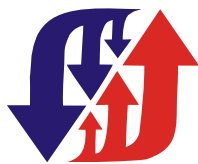


Figura 2. SDS-PAGE do soro e HP usando AGSM após 24h de hidrólise.



Caracterização e quantificação dos hidrolisados

As Figuras 3 A e 3 B apresentam respectivamente o teor de proteínas e o grau de hidrólise dos produtos obtidos utilizando AL, AGA e AGSM em 24 horas de reação. O teor de proteína do soro de queijo (antes da hidrólise), ou seja, no tempo zero= 15,04 mg/mL. O gráfico A exibe uma diminuição do teor de proteínas nos HP conforme se aumentou o tempo de hidrólise nos três ensaios enzimáticos. Isto pode ser explicado pela possível quebra das ligações peptídicas devido à hidrólise enzimática e podemos correlacionar esses valores com o gráfico 3 B onde o grau de hidrólise descreve um crescimento exponencial nas primeiras 3 horas de reação, sendo AL= 34,15%, AGA= 32,25% e AGSM= 10,63%. Após esse tempo a velocidade de reação começou a diminuir, chegando próximo de um platô em 24 horas com AL= 59,63%, AGA= 43,88% e AGSM= 26,59%. De forma geral, a velocidade inicial de reação com a enzima solúvel foi maior do que com as enzimas imobilizadas. Isso pode ser



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

explicado pela dificuldade de acesso do substrato à enzima imobilizada dentro dos poros dos suportes utilizados. Fato confirmado pelos valores de $V_{m\acute{a}x}$ (Tabela 1) em que AL= 115,96 U/mL, AGA= 25,08 U/g e AGSM= 10,50 U/g. O derivado AGSM mostrou ser efetivo na hidrólise das proteínas do soro de queijo mesmo apresentando maiores valores no teor de proteínas e menores valores de DH% quando comparados com AL e AGA após 24 horas. O comportamento cinético da enzima imobilizada pode diferir significativamente daquele da mesma enzima na forma solúvel. Essas mudanças podem ser tanto devido às alterações conformacionais na enzima, resultante do processo de imobilização, quanto da presença e natureza do suporte de imobilização (GUISÁN, 2006). No entanto, a utilização de AGSM na obtenção de HP do soro foi possível como podemos observar na SDS-PAGE (Figura 2) pelo desaparecimento das bandas proteicas do soro referentes à soroalbumina (BSA), β -lactoglobulina (β -Lg) e α -lactoalbumina (α -La). Além disso, os perfis de hidrólise do soro de queijo revelam que o uso da AGSM promoveu a hidrólise das proteínas quando comparamos o perfil do soro não hidrolisado (Figura 4 A) com os perfis dos HP (Figura 4 B, C e D). Há um aumento no número de picos entre os tempos de retenção 2,5-15 minutos. Portanto, os parâmetros utilizados para a caracterização e quantificação dos HP usando AGSM podem ser considerados equiparáveis com AL e AGA.

Figura 3. Teor de proteínas e grau de hidrólise dos HP de AL, AGA e AGSM por 24h.

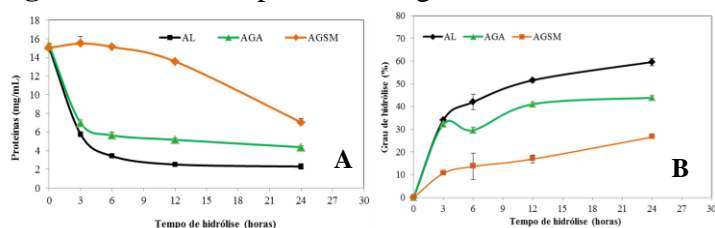
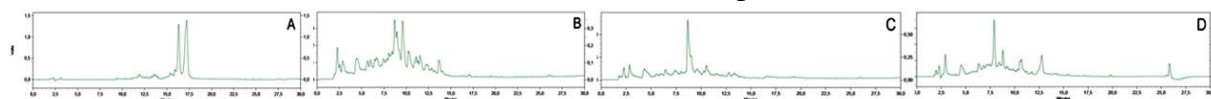


Figura 4. Cromatogramas de HPLC-fase reversa com detecção UV a 220 nm do soro (A) e hidrolisados utilizando AL (B), AGA (C) e AGSM (D) após 24 horas de hidrólise.

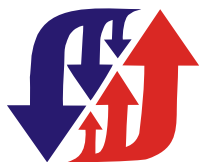


CONCLUSÕES

Foi possível imobilizar covalentemente a alcalase em pó de sabugo de milho com obtenção de um derivado estável. O processo de hidrólise utilizando AGSM foi eficaz, sendo o DH= 26,59% e a hidrólise das soroproteínas confirmadas pela SDS-PAGE. O perfil cromatográfico dos HP do soro revelou um aumento no número de picos em diferentes tempos de retenção. Resultados equiparáveis foram encontrados para AL e AGA, portanto, o SM representa uma fonte inovativa de baixo custo para imobilização da alcalase e obtenção de HP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, MM. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248-254.
- Guisán JM. Immobilization of enzymes and cells. Humana Press 2ªed., 2006, 449p.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

- Möller, NP, Scholz-ahrens, KE, Roos, N, Schrezenmeir, J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition* 47:171-182.
- Najafian L, Babji, AS. 2014. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydolysate. *Journal of functional foods* 9:280–289.
- Pessato, TB. 2014. Hidrolisados de isolado proteico do soro de leite obtidos com alcalase livre e imobilizada: caracterização e detecção de proteínas alergênicas. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000928302>.
- Rohlfes, ALB, De Monte BN, Oliveira MSR, Marquardt, L, Weis L, Lopes L, Hochscheid, SL. 2014. Aproveitamento de subproduto de agroindústrias do setor queijeiro para desenvolvimento de produtos alimentícios e redução de impacto ambiental. *Tecno-Lógica* 18:13-18.
- Spadaro AC, Draghetto W, Del Lamma SN, Camargo AC, Greene LJ. 1979. A convenient manual trinitrobenzenesulfonic acid method for monitoring amino acids and peptides in chromatographic column effluents. *Anal Biochem* 96:317-21.
- Tardioli PW, Pedroche J, Giordan, RLC, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM. 2003. Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose. *Biotechnology progress* 19:352-360.
- Yust, DMM, Pedroche, J, Millán-linares, M. C, Alcaide-hidalgo, J, Millán, F. 2010. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food chemistry* 122:1212-1217.