



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ELAINE BERGER CERESINO

**Ligações cruzadas em proteínas do glúten aplicando
transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 em
massa de trigo e outros materiais**

CAMPINAS

2018

ELAINE BERGER CERESINO

**Ligações cruzadas em proteínas do glúten aplicando
transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 em
massa de trigo e outros materiais**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutora em Ciência de Alimentos

Orientadora: Hélia Harumi Sato

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA ELAINE BERGER CERESINO E
ORIENTADA PELA PROF. DRA. HÉLIA
HARUMI SATO.

CAMPINAS

2018

Agência de fomento e nº de processo: CNPq, 141871/2013-0

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9218-0031>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

C334L Ceresino, Elaine Berger, 1985-
Ligações cruzadas em proteínas do glúten aplicando transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 em massa de trigo e outros materiais / Elaine Berger Ceresino. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Hélia Harumi Sato.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Transglutaminases. 2. Trigo. 3. Glúten. 4. Ligação cruzada. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cross-linking of gluten proteins applying transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 in wheat dough and other materials

Palavras-chave em inglês:

Transglutaminases

Wheat

Gluten

Cross-linking

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Hélia Harumi Sato [Orientador]

Luciana Ferracini dos Santos

Célia Maria Landi Franco

Guilherme Miranda Tavares

Juliano Lemos Bicas

Data de defesa: 11-05-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Profa. Dra. Luciana Ferracini dos Santos
UNIARARAS

Profa. Dra. Célia Maria Landi Franco
IBILCE – UNESP

Prof. Dr. Guilherme Miranda Tavares
FEA – UNICAMP

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
FEA – UNICAMP

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

À minha família
DEDICO

Agradecimentos

Em especial às professoras Hélia Harumi Sato, minha orientadora de doutorado; Eva Johansson e Ramune Kuktaite pela parceria e orientação no período sanduíche na *Swedish University of Agricultural Sciences* (SLU). Muito obrigada!

À Unicamp obrigada pela oportunidade de mestrado e doutorado. Camila e Andrea da SPG, muito obrigada. À SLU por sua breve, mas grande importância na minha formação e à banca examinadora pelas contribuições e avaliação desta tese.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários envolvidos no andamento deste trabalho, especialmente Maria Luisa Prieto-Linde pela especial assistência com as análises cromatográficas. Também à equipe responsável pela recepção e assistência em organizar minha chegada à SLU.

Ao Tomás S. Plivelic (Laboratório de Luz Síncrotron MAX IV), Stephen A. Hall (Laboratório de Mecânica dos Sólidos, LTH, *Lund University*) e Mikael Hedenqvist (*KTH Royal Institute of Technology*) pelas parcerias nos artigos em andamento.

Bill Newson, Faiza Rasheed, Waqas Kiani, Faraz Muneer, Evelyn Villanueva, Thomas Percheron, Anna-Lovisa Nynäs e todos os amigos muito queridos do *Plant Product Quality Group* e *Department of Plant Breeding* na SLU. Obrigada pela ajuda sincera e solícita!

Queridos amigos e companheiros que estão ou que passaram pelo Laboratório de Bioquímica de Alimentos e da FEA, obrigada por sua alegre companhia. Em especial Val, Marília, Jessika e Ricardo por terem me ajudado imensamente com várias questões práticas. Também aos meus queridos amigos, mais que irmãos, Célula de Barão Geraldo – Igreja Bola de Neve em Campinas, em especial Berna (*in memoriam*), Elzey, Edilson e família. Amigos da célula e da equipe de trabalho voluntário da Igreja Hillsong em Copenhague e Malmö.

A minha querida e amada família, por tudo, inclusive “paitrocínio” de parte deste estudo.

Primeiramente ao meu querido e íntimo Pai, a quem eu entrego toda a glória desta caminhada de 7 anos em Campinas. Antes eu te conhecia de ouvir falar, mas agora meus olhos te veem.

Resumo

As proteínas do glúten variam em tamanho de 30.000 a vários milhões de Daltons e formam um dos maiores e mais complexos polímeros presentes na natureza. A determinação das propriedades tecnológicas destas proteínas frente a diversos processos é um desafio que é intensificado quando novas ligações isopeptídicas são formadas com o auxílio de enzimas como a transglutaminase (TG). Esta é uma enzima que catalisa a formação de ligações cruzadas ϵ -(γ -glutamil)lisina intra e intermoleculares entre proteínas. A TG de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6) foi produzida em frascos de Erlenmeyer contendo meio de cultura composto de 2,5% de amido de batata; 0,5% de glicose; 2,45% de peptona de caseína e 0,8% de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7,0. O meio de cultivo foi fermentado a 30 °C, sob agitação constante de 150 rpm durante 96 h, resultando em atividade enzimática de 3,5 U/mL. A preparação enzimática de SB6 obtida por fracionamento com sulfato de amônio, diálise e liofilização apresentou 516,2 U/g de atividade. A TG comercial (Biobond™ TG-M) e a SB6 foram caracterizadas bioquimicamente e apresentaram temperatura ótima de atividade a 40 °C e entre 35-40°C, e pH ótimo de atividade entre 5,5-6,0 e 6,5, respectivamente. As massas de farinha de trigo às quais se adicionou 1,10 U/g de TG comercial apresentaram maior tempo e altura de desenvolvimento quando misturadas em mixógrafo, indicando a formação de uma massa mais forte quando comparada com uma massa controle. De forma similar, a adição de TG comercial em massas de glúten resultou em massas mais fortes em todas as concentrações utilizadas (0,87 e 1,73 U/g). Entretanto, a SB6 foi a preparação enzimática que teve maior impacto na polimerização das proteínas, promovendo a inclusão de gliadinas na rede proteica. O processo de extração severa ou branda do glúten também impactou significativamente a qualidade das massas. O tratamento das massas de glúten obtido pelo processo severo com SB6 favoreceu a formação de folhas- β na estrutura secundária das proteínas. A gliadina apresentou excelente capacidade de formação de espuma que foi favorecida pela adição de SB6. A polimerização das gliadinas foi promovida, resultando na expansão do volume dos poros das espumas liofilizadas. Assim, os resultados evidenciam o potencial da SB6 em modificar as propriedades das proteínas do trigo com aplicabilidade em vários processos tecnológicos da indústria de alimentos.

Abstract

Gluten proteins range in size from 30,000 to several million Daltons and form one of the largest and most complex polymers available in nature. The determination of the technological properties of these proteins in different processes is a challenge that is intensified when new isopeptidic bonds are formed with the aid of enzymes such as transglutaminase (TG). This is an enzyme that catalyzes the formation of intra- and intermolecular ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-links between proteins. The TG from *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6) was produced in Erlenmeyer flasks containing culture medium composed of 2.5% potato starch, 0.5% glucose, 2.45% casein peptone and 0.8% $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0. The culture medium was fermented at 30°C, under constant agitation of 150 rpm for 96 h, resulting in enzyme activity of 3.5 U/mL. The SB6 enzyme preparation obtained by fractionation with ammonium sulfate, dialysis and lyophilization presented an activity of 516.2 U/g. Commercial TG (Biobond™ TG-M) and SB6 were biochemically characterized and presented an optimal activity temperature at 40 °C and between 35-40 °C; and optimum activity pH between 5.5-6.0 and of 6.5, respectively. The wheat flour doughs containing 1.10 U/g of commercial TG presented higher peak time and peak height when mixed in a mixograph, indicating the formation of a stronger dough when compared to a control. Similarly, the addition of commercial TG in gluten doughs resulted in stronger doughs for all concentrations used (0.87 and 1.73 U/g). However, SB6 was the enzymatic preparation that had the greatest impact on the polymerization of proteins, promoting the inclusion of gliadins in the protein network. The harsh or mild gluten extraction also had a significant impact on the quality of gluten doughs. The treatment of gluten based doughs prepared with harshly separated gluten and SB6 favored the formation of β -sheets in the secondary structure of the proteins. Gliadin presented excellent foaming ability which was favored by the addition of SB6. Polymerization of the gliadins was promoted, resulting in the expansion of the pore size of the lyophilized foams. Thus, the results show the potential of SB6 to modify the properties of wheat proteins with applicability in various technological processes of the food industry.

Lista de abreviaturas

AL: Ácido linoleico

AACC: *American Association of Cereal Chemists*

ATR: Reflectância total atenuada

DTT: ditionitrotol

EB: Extração branda do glúten de trigo

ES: Extração severa do glúten de trigo

FDA: *U.S. Food and Drug Administration*

FT-IR: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Glia: Gliadina

Glut: Glutenina

Gly: Glicerol

ISP-2: Ágar extrato de malte-extrato de levedura – *International Streptomyces project*

LPP: Proteínas poliméricas de alta massa molecular

MP: Proteínas monoméricas

PC: Componente principal

PC1: Primeiro componente principal

PC2: Segundo componente principal

PCA: Análise de componentes principais

PP: Proteínas poliméricas

RP-HPLC: *Reverse-phase high-performance liquid chromatography* / Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.

SAXS: Espalhamento de raios-x a baixo ângulo

SB6: Transglutaminase produzida por *Streptomyces* sp. CBMAI 1617.

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SE-HPLC: *Size-exclusion high-performance liquid chromatography* / Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão por tamanho.

SPP: Proteínas poliméricas de baixa massa molecular

TFA: Ácido trifluoroacético

TG: Transglutaminase

TG comercial: preparação enzimática comercial (Biobond™ TG-M) de transglutaminase

UPP: Proteínas poliméricas não-extraíveis

Índice

INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1. Características gerais da transglutaminase	17
1.1. Transglutaminases de fontes variadas	19
2. Glúten do trigo	21
2.1. Proteínas do glúten do trigo	22
2.2. Rede polimérica formada pelas proteínas do glúten de trigo.....	23
2.3. Capacidade de formação de espuma das proteínas do glúten de trigo.....	27
3. Impacto do processamento nas propriedades do glúten de trigo	29
3.1. Mistura	29
3.2. Separação industrial do glúten.....	30
4. Efeito da transglutaminase em produtos de panificação	32
5. Referências Bibliográficas	35
CAPÍTULO 2	45
Transglutaminase produzida por <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 1617: caracterização e avaliação dos efeitos em proteínas de massas de trigo	45
Resumo	46
1. Introdução	47
2. Material e métodos	48
2.1. Fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 1617 em frascos agitados e produção de TG	49
2.2. Efeitos do pH e da temperatura na atividade enzimática de SB6 e TG comercial	50
2.3. Estrutura secundária das enzimas SB6 e TG comercial determinada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	50
2.4. Extração das frações de gliadina e glutenina	51
2.5. Preparação dos sistemas-modelo de massa de farinha de trigo, gliadina e glutenina.....	51
2.6. Análise da distribuição de proteínas por tamanho avaliadas por SE-HPLC.....	51
2.7. Solubilidade proteica determinada por RP-HPLC.....	53
2.8. Análise estatística	53
3. Resultados e discussão	54
3.1. Fermentação da linhagem <i>Streptomyces</i> sp CBMAI 1617 e produção de SB6	54
3.2. Caracterização bioquímica da TG e análise do espectro IR.....	54
3.3. Comportamento de mistura de massa de trigo e de frações ricas em gliadina e glutenina	57
3.4. Estudo da polimerização de proteínas de trigo avaliada por SE-HPLC.....	58
3.5. Estudo da solubilidade das proteínas de trigo	61
4. Conclusão	63
5. Referências bibliográficas	63
CAPÍTULO 3	67

Impacto do processo de separação do glúten e da fonte de transglutaminase nas propriedades da massa de glúten	67
Resumo.....	68
1. Introdução	69
2. Material e Métodos	71
2.1. Preparo das massas de glúten e propriedades reológicas das massas.....	72
2.2. Análise da distribuição proteica por tamanho por SE-HPLC (exclusão por tamanho)	74
2.3 Análise da solubilidade proteica por RP-HPLC (fase reversa)	75
2.4. Estrutura secundária das proteínas presentes nas massas de glúten determinada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	76
2.5. Análises estatísticas.....	76
3. Resultados e discussão	76
3.1 Efeito do tipo de glúten na qualidade funcional da massa – força, polimerização e solubilidade	76
3.2. Efeito da fonte de enzima nas propriedades da massa	81
3.3 Efeito da concentração de enzima TG nas propriedades da massa	84
3.4 Análise do espectro IR para determinação da estrutura secundária	85
4. Conclusão.....	88
5. Referências bibliográficas	88
CAPÍTULO 4	93
Efeito da adição de transglutaminase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 1617 e outros aditivos na estrutura de espumas formuladas com gliadina.....	93
Resumo.....	94
1. Introdução	95
2. Material e métodos	97
2.1. Preparo das espumas à base de gliadina	97
2.2. Análise da morfologia das espumas de gliadina por microscopia eletrônica de varredura.....	98
2.3. Tomografia de raios-X das espumas de gliadina	98
2.4. Análise das proteínas por SE-HPLC	98
2.5. Análises estatísticas.....	99
3. Resultados e discussão	99
3.1. Efeito da adição de SB6 nas propriedades de espumas à base de gliadina	99
3.2. Efeito da adição de glicerol e ácido linoleico em espumas formuladas à base de gliadina e modificadas por meio da preparação enzimática de SB6..	105
4. Conclusão.....	107
5. Referências Bibliográficas.....	108
DISCUSSÃO GERAL.....	112
CONCLUSÕES GERAIS	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
ANEXOS	130

INTRODUÇÃO

A transglutaminase (TG, EC 2.3.2.13) é uma transferase amplamente distribuída em mamíferos, plantas, peixes e micro-organismos, que catalisa as reações de formação de ligações cruzadas inter e intramoleculares entre resíduos de glutamina e lisina em proteínas (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004; GASPAR; DE GÓES-FAVONI, 2015).

A TG microbiana apresenta a propriedade de atuar sobre diversas proteínas, tais como glúten, globulinas de aveia e de soja, caseínas, actina, miosina e proteínas de ovos. E desde sua descoberta, vem sendo a principal fonte de TG utilizada em alimentos em escala industrial (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004).

A produção industrial de TG a partir da fermentação microbiana se iniciou com o isolamento da linhagem de *Streptomyces mobaraensis* em 1989 (WASHIZU et al., 1994) abrindo um vasto leque de aplicações potenciais em alimentos, tais como carne estruturada, embutidos, produtos lácteos, derivados de soja e pescado (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004). Entre as aplicações, a TG tem sido utilizada com destaque para melhorar a qualidade de produtos de panificação, uma vez que a formação de ligações cruzadas entre as proteínas do glúten reforça a estrutura da rede proteica, e conseqüentemente, modifica as propriedades visco-elásticas da massa (LARRÉ et al., 2000).

Ligações cruzadas promovidas pela atividade da TG mostrou reduzir a solubilidade das proteínas do glúten do trigo e elevar o teor de proteínas poliméricas (GUPTA; KHAN; MACRITCHIE, 1993; AUTIO et al., 2005). Concomitantemente, impactos positivos foram observados nas propriedades reológicas das massas avaliadas. A concentração da enzima mostrou ser uma fonte de variação nas propriedades da massa de trigo adicionadas de TG (BASMAN; KÖKSEL; NG, 2002; BAGAGLI et al., 2014). No entanto, a qualidade do desenvolvimento da massa e de produtos derivados de trigo podem, provavelmente, ser impactados pela adição de TGs de diversas origens.

O objetivo geral deste trabalho foi estudar os efeitos da adição de transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6) na polimerização das proteínas do glúten do trigo. Para isto, foram estudados os efeitos da SB6 em massa de trigo e massas-modelo de gliadina e glutenina comparativamente com a TG comercial (BiobondTM TG-M) produzida por *Streptomyces mobaraensis*. A avaliação

desses efeitos foi realizada por meio de técnicas que mensuraram as propriedades mecânicas durante a mistura de massas tratadas com TG, alterações na complexidade dos polímeros formados, mudanças na solubilidade desses polímeros frente à diversos solventes, bem como nas suas estruturas secundárias. De forma similar, foram comparados os efeitos da SB6 e da enzima comercial nas propriedades do glúten obtido industrialmente e do glúten de trigo extraído pelo método brando de lavagem da massa. Em seguida foi estudada a obtenção de espumas a base de gliadina modificadas com auxílio da TG de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6). A modulação das características de espumas a base de gliadina por ação da SB6 e outros aditivos foi elucidada por meio de imagens de tomografia e microscopia, além dos estudos de solubilidade.

A presente tese foi redigida sob forma de artigos apresentando 4 capítulos.

O CAPÍTULO 1 desta tese descreve uma breve revisão de literatura, introduzindo um referencial teórico sobre os principais tópicos estudados neste trabalho. Serão abordados os principais aspectos sobre a transglutaminase microbiana, as proteínas do glúten do trigo, transformação das proteínas quando submetidas a processos industriais de separação do glúten, mistura da massa e desenvolvimento de espumas, além de potenciais benefícios da aplicação da TG em proteínas do trigo.

No CAPÍTULO 2, as mudanças na polimerização proteica promovida pela TG de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6) foram comparadas com a ação da TG proveniente de *Streptomyces mobaraensis* (TG comercial). As enzimas foram adicionadas em 4 diferentes concentrações em massas-modelo de farinha de trigo, gliadina e glutenina, e os parâmetros de mistura que refletem a força do glúten foram avaliados.

O CAPÍTULO 3 consiste em um estudo comparativo das propriedades funcionais da massa de glúten em função das condições de pré-processamento do glúten e da aplicação de TGs provenientes de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6) e de *Streptomyces mobaraensis* (TG comercial). Foram avaliados os parâmetros de desenvolvimento da massa à base de glúten, suas propriedades estruturais e químicas.

No CAPÍTULO 4 foi estudada a polimerização proteica promovida pela SB6 durante a formação de espumas secas a base de gliadina e comparada a um

controle. As propriedades das espumas desenvolvidas com a adição de SB6 e plasticizantes foram exploradas por meio de análises morfológicas e com o auxílio de imagens de tomografia de raios-X.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Características gerais da transglutaminase

As transglutaminases (TG, E.C. 2.3.2.13) são uma família de enzimas que catalisam a reação de transferência de grupos acil do grupo γ -carboxiamida da glutamina para resíduos de lisina, formando ligações covalentes cruzadas inter e intramoleculares em proteínas e peptídeos (Figura 1.1) (MOTOKI; SEGURO, 1998; KURAISHI; YAMAZAKI; SUSA, 2001). Tais ligações são covalentes e estáveis, ao contrário de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Como resultado destas reações, polímeros de alta massa molecular podem ser produzidos alterando propriedades funcionais e tecnológicas das proteínas. Assim, novos produtos alimentícios com propriedades reológicas e sensoriais melhoradas podem ser obtidos (GASPAR; DE GÓES-FAVONI, 2015). Na ausência ou no caso de bloqueio de amina adequadas para reação, a água pode ser um aceptor e o resíduo de glutaminil se torna glutamyl pela desaminação catalisada pela enzima. Conseqüentemente, ácido glutâmico é formado, elevando a quantidade de resíduos carboxílicos, o que pode alterar a carga da proteína (GERRARD, 2002).

O mecanismo de ação da TG é muito semelhante ao das proteases (PLÁCIDO et al., 2008) e consiste em duas etapas. No início, o grupo tiol da cisteína presente no sítio ativo ataca a cadeia lateral de um resíduo de glutamina disponível no substrato proteico, formando um complexo acil-enzima e liberando amônia. Posteriormente, uma amina primária substitui a enzima, gerando uma glutamina carboxiamida modificada como ilustrado na Figura 1.2.

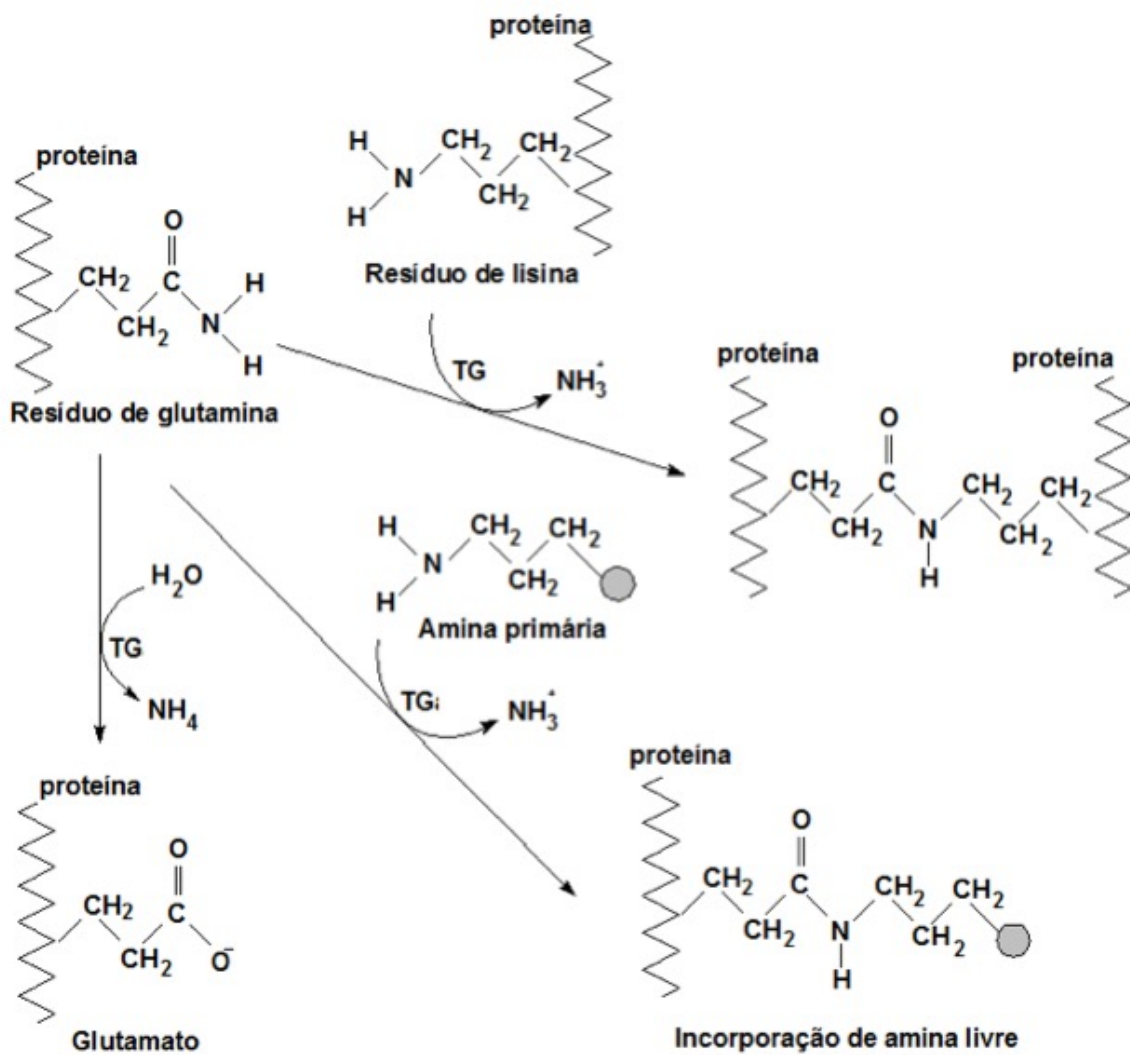


Figura 1.1- Reações gerais catalisadas pela transglutaminase: polimerização, incorporação de aminas e desaminação.

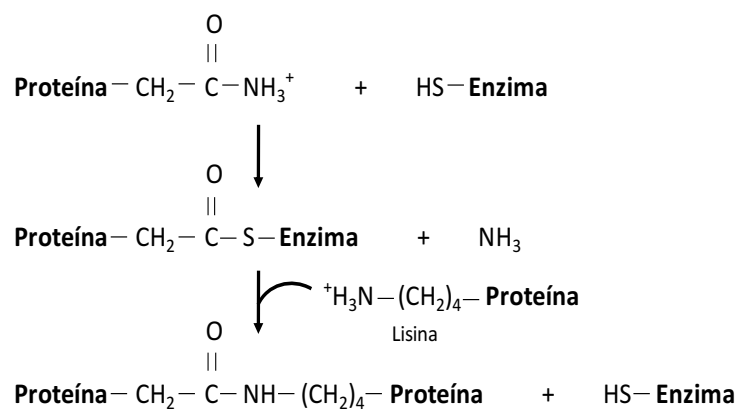


Figura 1.2- Mecanismo de ação da transglutaminase

A formação de ligações covalentes intra e intermoleculares entre resíduos de lisina e glutamina em proteínas por meio da TG, e conseqüentemente a possibilidade de modular as propriedades de proteínas tem despertado grande interesse em diversas áreas industriais, principalmente na estruturação de alimentos (MARINIELLO et al., 2014).

1.1. Transglutaminases de fontes variadas

As transglutaminases podem ser encontradas em fluídos corporais (FOLK, 1972), peixes (YASUEDA; KUMAZAWA; MOTOKI, 1994), vegetais (FALCONE; SERAFINI-FRACASSINI; DEL DUCA, 1993) e micro-organismos (WASHIZU et al., 1994), cumprindo uma grande variedade de funções biológicas em cada organismo, ou seja, agindo na apoptose, na diferenciação celular, na fusão do fibrinogênio como parte da cascata de coagulação em mamíferos, além de atuar na formação do citoesqueleto da membrana celular (GRIFFIN; CASADIO; BERGAMINI, 2002; LORAND; GRAHAM, 2003). As TGs podem ser intra ou extracelulares, o que caracteriza sua versatilidade de funções. Embora as TGs de animais e plantas possuam função catalítica similar às TGs microbianas, a sua composição em aminoácidos não é homóloga (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004).

A utilização de micro-organismos para obter TGs tornou o processo de produção da enzima mais versátil e com maior rentabilidade. A primeira TG microbiana detectada e explorada comercialmente foi obtida de uma linhagem de *Streptomyces mobaraensis* por Ando e colaboradores em 1989 (WASHIZU et al., 1994). O uso de técnicas de engenharia genética também foram relevantes para aumentar a exploração comercial da TG ao elevar a produtividade e facilitar a recuperação no meio de cultivo (YU et al., 2008). Outra forma mais simples e extensivamente pesquisada para reduzir os custos do processo de produção de TG é a otimização das condições de cultivo. Por exemplo, MACEDO et al., (2007) utilizaram o meio otimizado composto de 2,5% de farelo de soja, 2,0% de amido de batata, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 , 0,2% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,0% de peptona o que resultou em um aumento de 86% na atividade da TG de *Streptomyces* sp. CBMAI 837. GUERRA-RODRÍGUEZ e VÁZQUEZ (2014) estudaram a produção de TG por uma linhagem de *Streptomyces mobaraensis* e otimizaram um meio

composto apenas de 600 g.L⁻¹ de leite desnatado, 40 g.L⁻¹ amido de batata e 5 g.L⁻¹ de glicerol resultando em uma atividade de 2,95 ± 0,30 U.mL⁻¹ em 72h de fermentação.

A TG é produzida pelas linhagens de *Streptomyces* sp. na forma extracelular, sendo encontrada no sobrenadante do meio de cultura, facilitando a sua obtenção. Mas, outras propriedades da enzima também são responsáveis por sua versatilidade. Entre as diversas características destaca-se o fato de ser totalmente cálcio-independente (as TGs de mamíferos são cálcio-dependentes), sendo esta propriedade especialmente importante na modificação de proteínas de matrizes alimentares que são facilmente precipitáveis pela presença de Ca⁺². A temperatura ótima da TG produzida por *Streptomyces mobaraensis* normalmente varia entre 45 a 55 °C. A enzima é estável na faixa de pH 5 e 9 (KURASHI; YAMAZAKI; SUSA, 2001). A transglutaminase comercial obtida de linhagens de *Streptomyces* sp. apresenta a vantagem de ser ativa também em baixas temperaturas, de 5 a 10 °C, o que amplia o potencial de aplicação em produtos lácteos, como queijos *petit suisse* e iogurte. Novas linhagens produtoras de TG têm sido isoladas com o objetivo de se obter alto rendimento na produção de enzimas com características bioquímicas versáteis. A Tabela 1.1 ilustra alguns micro-organismos produtores de TGs e as características bioquímicas das enzimas encontradas. As TGs possuem características e funcionalidades que variam de acordo com micro-organismo produtor, sendo que as maiores diferenças são detectadas em TGs provenientes de bactérias de filos distintos. Os exemplos mais estudados de bactérias produtoras de TG pertencem ao gênero *Streptomyces* ou *Bacillus* (KIELISZEK; MISIEWICZ, 2014; GASPAR; DE GÓES-FAVONI, 2015). Observa-se, por exemplo que o valor de pH ótimo da TG de *Streptomyces* é ligeiramente mais baixo e a enzima é mais estável a variações de pH que TGs produzidas por linhagens de *Bacillus*.

Tabela 1.1- Micro-organismos produtores de TG e algumas características bioquímicas das enzimas.

Micro-organismo	pH ótimo de atividade	pH de estabilidade	Temperatura ótima de atividade	Temperatura de estabilidade	Referências bibliográficas
<i>Streptomyces mobaraensis</i>	6,0	5,0 - 9,0	50 °C	50 °C	WASHIZU et al., 1994; ZHANG et al., 2012.
<i>Streptomyces ladakanum</i>	5,5	4,8 - 6,2	40 °C	55 °C	HO et al., 2000.
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	6,0 – 7,0	5,0 – 8,0	37 – 45 °C	50 °C	CUI et al., 2007.
<i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	6,0 – 6,5	4,5 – 8,0	35 – 40 °C	45 °C	MACEDO; SETTE; SATO, 2010.
<i>Bacillus subtilis</i>	8,2	7,5 – 8,5	60 °C	N/A	SUZUKI et al., 2000.
<i>Bacillus circulans</i>	7,0	6,0 – 8,5	47 °C	50 °C	SOARES; ASSMANN; ZÁCHIA AYUB, 2003.

A aplicação da TG no processamento de alimentos abrange principalmente os setores de produtos cárneos (KURASHI; YAMAZAKI; SUSA, 2001; SUN; ARNTFIELD, 2011), lácteos (GAUCHE et al., 2009), derivados de soja (CHANG et al., 2011) e à base de cereais como centeio, triticale, arroz, aveia e sorgo (RENZETTI; DAL BELLO; ARENDT, 2008; BECK et al., 2011; STORCK et al., 2013). Segundo a Resolução nº 53, de 07 de outubro de 2014 da ANVISA, o uso da TG de *Streptomyces mobaraensis* é permitido em produtos destinados à alimentação humana em quantidade suficiente para a obtenção do efeito desejado em alimentos, denominado *quantum satis* (ANVISA, 2014). Diante das diferenças bioquímicas detectadas, novas pesquisas que explorem as funcionalidades das TGs para a aplicação em matrizes diversas são de interesse para as indústrias de alimentos.

2. Glúten do trigo

O trigo é mundialmente considerado como o cereal mais importante em termos de área cultivada e produção de alimentos no mundo (FAO, 2012). A produção de trigo representa cerca de 30% de todos os cereais cultivados e quase 3/4 do trigo produzido é destinado à alimentação humana. Sendo assim, é uma das fontes mais importantes de proteína e energia correspondendo a 19,2 % do total de

energia disponível para consumo. Além disso, o crescimento da produção de trigo é maior do que de outros cereais (JOHANSSON et al., 2013).

Em grãos de trigo maduros o teor de proteína varia entre 10-12 %. A farinha de trigo possui várias frações de proteínas solúveis e insolúveis. A albumina, globulinas e algumas glicoproteínas são proteínas solúveis que representam cerca de 20% das proteínas totais do trigo. As proteínas do glúten (entre 80 e 85% do total de proteínas) são as principais proteínas de armazenamento do trigo (GOESAERT et al., 2005).

2.1. Proteínas do glúten do trigo

O glúten pode ser obtido pela simples lavagem da massa de trigo sob uma corrente de água (VAN DER BORGHT et al., 2005). A elasticidade e extensibilidade próprias do glúten são desenvolvidas quando o trigo é hidratado e submetido à mistura (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995).

As proteínas do glúten são de dois tipos: gluteninas e gliadinas (Figura 1.3). Estas proteínas estão presentes em partes aproximadamente iguais no glúten de trigo, e podem ser diferenciadas levando-se em conta a solubilidade de cada fração em álcoois. As gliadinas são solúveis em solução aquosa contendo 70% (v/v) de etanol, enquanto as gluteninas são insolúveis nessa solução (WIESER, 2007).

As gliadinas são proteínas monoméricas que apresentam massa molecular de 30.000 a 80.000 Da e são subdivididas em 4 grupos (α , β , γ e ω) com base na mobilidade eletroforética em baixos valores de pH. A glutenina possui solubilidade limitada em solventes comuns, sendo extraídas na presença de um agente redutor, podendo ser subdividida em subunidades de baixa massa molecular (LMW-GS) (30.000 – 51.000 Da) e subunidades de alta massa molecular (HMW-GS) (80.000 – 160.000 Da) (SONG; ZHENG, 2007; DELCOUR et al., 2012). As diferenças na composição em aminoácidos do trigo e proteínas da farinha são influenciadas pelas espécies e cultivares, solo, clima e método de obtenção da farinha (JOHANSSON et al., 2013).

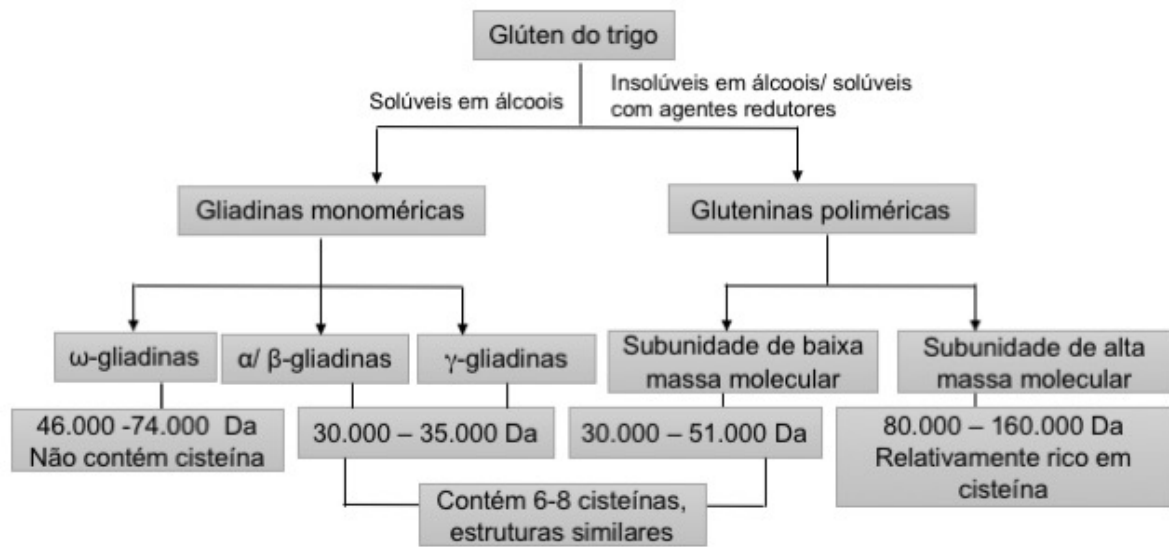


Figura 1.3- Classificação das proteínas do glúten do trigo.

A força e as propriedades elásticas da massa são concedidas majoritariamente pelas gluteninas. Sob hidratação, as gliadinas se comportam como um líquido viscoso que confere extensibilidade para a massa. O equilíbrio adequado entre a proporção de glutenina e gliadina resulta em um balanço apropriado entre viscosidade e elasticidade da massa de trigo. Uma massa pouco elástica pode resultar em pães com baixo volume. O aumento na elasticidade mostrou estar correlacionado com maior volume dos pães, porém, uma massa excessivamente elástica mostrou impedir a expansão do gás apropriadamente (KHATKAR; BELL; SCHOFIELD, 1995; BARAK; MUDGIL; KHATKAR, 2013).

A viscoelasticidade e as propriedades reológicas das massas de trigo fazem com que esse cereal seja relevante para a preparação de uma grande diversidade de produtos como pães, massas, biscoitos, bolos entre outros (DAY et al., 2006).

2.2. Rede polimérica formada pelas proteínas do glúten de trigo

Diversos modelos que descrevem a estrutura do polímero de glúten do trigo foram propostos e são descritos aqui em sequência cronológica. De acordo com os modelos mais antigos a molécula de glutenina apresenta somente ligações dissulfeto intramoleculares que modulam a conformação proteica de forma a promover sua interação com moléculas de glutenina adjacentes. Portanto, neste

modelo os agregados proteicos de glúten são formados por meio de ligações não-covalentes. Entretanto, em 1979 um novo mecanismo foi proposto, em que cadeias adjacentes e lineares de gluteninas se unem por meio de uma única ligação dissulfeto (EWART, 1979). Neste mesmo ano, com base em resultados de SDS-PAGE, KHAN e BUSHUK (1979) sugeriram que os complexos funcionais de glutenina apresentam ligações intra e intermoleculares cuja extensão depende da massa molecular das cadeias proteicas.

Posteriormente, novos estudos demonstraram uma correlação positiva entre as propriedades destes polímeros e as características reológicas da massa de trigo (MACRITCHIE, 1984). Uma vez que parte desses polímeros permanece não-extraível em diversas soluções extratoras (tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,9, contendo SDS e ácido acético) o termo % UPP – porcentagem de proteínas não-extraíveis em proteínas poliméricas totais – foi adotado e tem sido frequentemente utilizado para medir quantitativamente a distribuição de proteína por tamanho em glúten de trigo (GUPTA; KHAN; MACRITCHIE, 1993). Assim, espera-se que massas de trigo com maior %UPP tenham maior tempo de desenvolvimento e elasticidade do que massas com maior proporção de proteínas poliméricas extraíveis. Estudos adicionais revelaram que o tamanho dos polímeros pode variar desde dímeros até cadeias de grande massa molecular (WRINGLEY, 1996). Entretanto, pesquisas mais recentes mostraram que nem sempre um alto índice de proteínas não-extraíveis na farinha de trigo resulta em massas com maior % UPP após o desenvolvimento do glúten (HUSSAIN et al., 2012).

A Figura 1.4 ilustra esquematicamente a composição e complexidade do polímero formado pelas proteínas do glúten no grão de trigo. As ligações dissulfeto intra e intermoleculares são essenciais para a constituição deste polímero. Quando duas moléculas de cisteína da cadeia polipeptídica, ou em cadeias polipeptídicas diferentes reagem entre si, uma ligação cruzada dissulfeto intra ou intermolecular se forma. Esta ligação dissulfeto ocorre devido à oxidação do grupo funcional tiol (SH) nos resíduos de cisteína da glutenina. Os dois resíduos de cisteína quando são unidos por esta ligação são denominados cistina. A ligação dissulfeto que é formada confere estabilidade e funcionalidade (neste caso, força do glúten) às proteínas presentes no trigo (SHEWRY; TATHAM; LAZZERI, 1997).

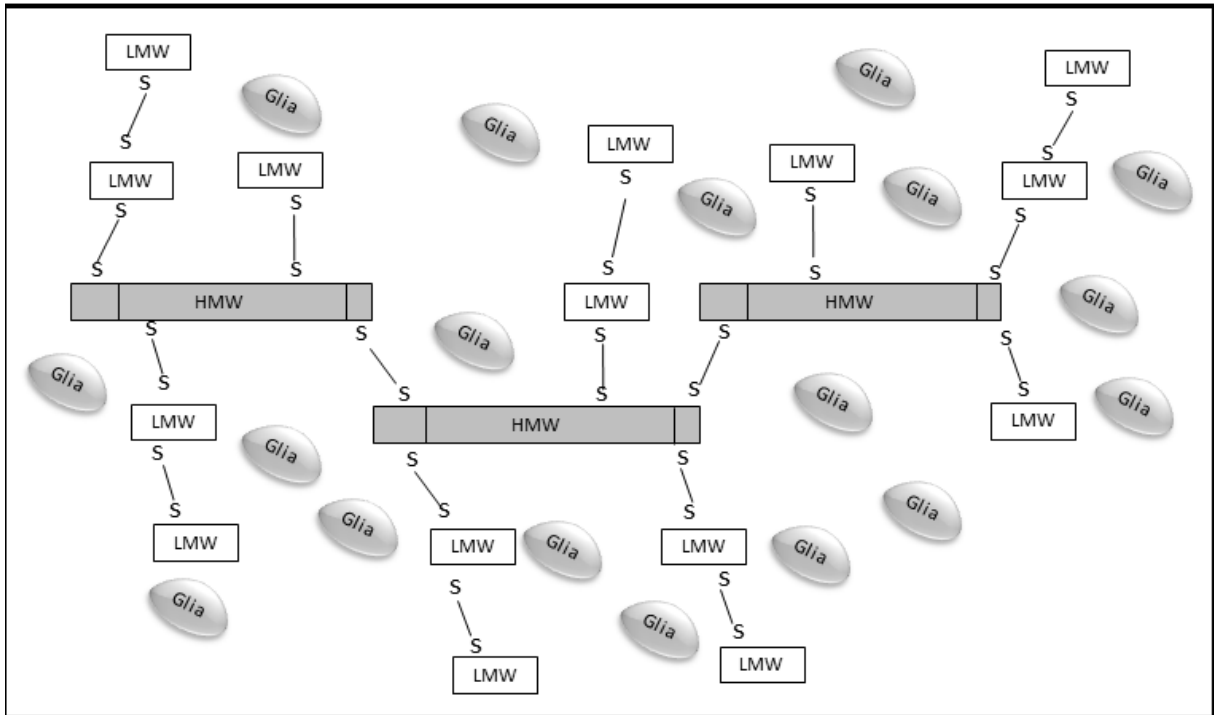


Figura 1.4 – Modelo estrutural esquemático da composição do glúten no grão de trigo. HMW: gluteninas de alta massa molecular; LWM: gluteninas de baixa massa molecular.

Outro tipo de ligação covalente presente entre as proteínas é a ditiosina (TILLEY et al., 2001). As ligações ditiosina estão presentes no processo de formação da massa, mas não são determinantes para a formação do glúten da mesma forma que as ligações dissulfeto (RODRIGUEZ-MATEOS et al., 2006). Tratamentos térmicos severos também podem levar a formação de ligações isopeptídicas entre um grupo amino de um resíduo de lisina e o grupo carboxílico de outro aminoácido (por exemplo, aspartato ou glutamato) (GERRARD, 2002).

Ambas as ligações intra e intermoleculares são importantes, bem como ligações não covalentes como ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura polimérica (BELTON, 1999). Porém, as ligações dissulfeto (S-S) que são formadas intermolecularmente entre as subunidades de glutenina são predominantemente responsáveis por formar a estrutura do polímero e o principal foco nos estudos destes polímeros (JOHANSSON et al., 2013). A Figura 1.5 ilustra o modelo estrutural do polímero gerado por essas interações (RASHEED, 2015).

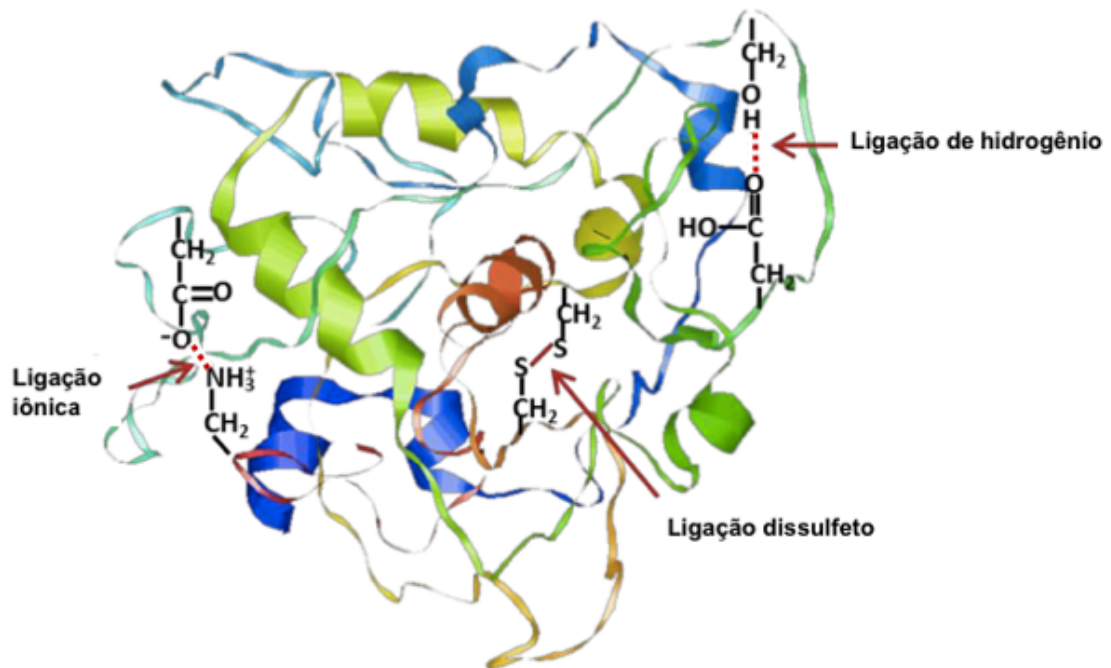


Figura 1.5 - Representação esquemática das ligações químicas na cadeia polipeptídica de proteínas do glúten.

Nos polímeros formados pelas proteínas do glúten, considera-se que as subunidades de alta massa molecular formam a cadeia principal dentro da estrutura do polímero, enquanto as subunidades de baixa massa molecular são extensores da cadeia na região terminal (MASCI et al., 2002). A viscosidade da massa geralmente é mais elevada quanto maior for a massa molecular do polímero, mas esse aumento da viscosidade é mais acentuado quando se atinge uma massa molecular crítica. Isso porque, a presença de ramificações aumenta a resistência ao escoamento e estas atuam como ligações cruzadas contribuindo para a força do glúten (SINGH; MACRITCHIE, 2001). Estudos realizados por SAXS (espalhamento de raios-x a baixo ângulo) mostram que o polímero do glúten possui uma estrutura amorfa, portanto não há uma estrutura molecular hierárquica (KUKTAITE et al., 2011).

Assim, o conhecimento da formação de polímeros em glúten é relevante para entender o comportamento do glúten durante seu processamento em diversos produtos.

A funcionalidade das proteínas do glúten também pode ser alterada pela adição de coadjuvantes como a cisteína e glutatona, que são agentes redutores (SONG; ZHENG, 2007). A glutatona está presente naturalmente no trigo e também

pode ser produzida pela *Saccharomyces cerevisiae* presente no fermento que é adicionado durante a fabricação de pães. Conseqüentemente, a estrutura da glutenina pode ser alterada, resultando em maior extensibilidade do glúten. Com a clivagem das ligações dissulfeto entre as proteínas da glutenina ocasionada pelos agentes redutores, a capacidade de retenção de CO₂ da rede proteica formada pelo glúten pode ser reduzida, alterando o volume dos pães. Por outro lado, a TG atua formando novas ligações covalentes entre as proteínas do glúten, aumentando a elasticidade e, conseqüentemente, o volume de pães (STEFFOLANI et al., 2008). A ação da transglutaminase em produtos de panificação será descrito detalhadamente no item 4 deste capítulo.

2.3. Capacidade de formação de espuma das proteínas do glúten de trigo

A espuma é definida como uma dispersão coloidal composta de duas ou três fases, em que normalmente uma fase gasosa é dispersa em uma fase contínua hidrofílica contendo um agente surfactante (WILSON, 1989). A energia fornecida para iniciar o processo de formação de espuma, como energia mecânica, promove a adsorção das proteínas na interface entre a fase líquida e gasosa como resultado do rearranjo dos polipeptídeos de acordo com sua polaridade. As características do filme interfacial formado e da espuma resultante são determinadas, entre outros fatores, pelas propriedades da proteína (ALLEONI CARRARO, 2006).

As proteínas do trigo apresentam excelentes propriedades que podem ser exploradas para criar novas espumas altamente estruturadas e estáveis. Em geral, as espumas provenientes destas proteínas apresentam boa estabilidade mecânica e poros pequenos. Além disso, estas proteínas proporcionam um meio sustentável de obter novas espumas, pois são desenvolvidas a partir de um material renovável, abundante, e que pode ser obtido em larga escala (QUESTER; KLEMMER; STREY, 2017).

As propriedades de espuma da gliadina foram estudadas inicialmente por MCDONALD e PENCE (1961). As espumas preparadas com gliadina apresentaram boa estabilidade, sendo consideradas como potenciais substitutos de claras de ovos, gelatinas, proteínas do leite ou soja em produtos alimentícios. Também foi demonstrado que a capacidade de formação de espuma de gliadina foi superior à da

glicinina e ambas apresentaram melhor desempenho do que a β -caseína (BOS; DUNNEWIND; VAN VLIET, 2003).

As propriedades mecânicas e estruturais de espumas liofilizadas de glúten foram estudadas por BLOMFELDT, KUKTAITE, JOHANSSON, & HEDENQVIST (2011). Posteriormente, BLOMFELDT et al. (2012) descreveram a preparação de espumas com frações ricas em glutenina e gliadina. Nesse estudo, a dispersão proveniente de gliadina apresentou menor viscosidade, expandindo-se mais do que a espuma preparada com a glutenina o que resultou em espumas menos densas. As gliadinas também demonstraram maior atividade superficial, apresentando, portanto, tensão superficial menor quanto à sua habilidade em ser adsorvida na interface ar-líquido. Quanto à estrutura, os filmes de gliadina apresentaram maior expansão, resultando em espumas cuja estrutura celular apresentou células com maior diâmetro. Quanto à solubilidade do polímero, as espumas de gliadina foram mais extraíveis em solução com SDS do que as espumas a base de glutenina.

Espumas microcelulares obtidas pela dispersão de CO₂ em gliadina hidratada apresentaram aspecto quebradiço (QUESTER; DAHESH; STREY, 2014) sugerindo a necessidade de melhorias na sua estrutura, bem como o uso de plasticizantes. No trabalho desenvolvido por BLOMFELDT et al. (2011) a adição de glicerol como plasticizante em espumas desenvolvidas com glúten resultou em uma rede polimérica mais desenvolvida e com melhores propriedades mecânicas. No entanto, o efeito oposto foi observado ao adicionar fibras de celulose bacteriana para reforçar as propriedades mecânicas dessas espumas.

O glicerol é um plasticizante permitido em alimentos que estruturalmente é inserido na matriz proteica e aumenta o espaço entre as cadeias de proteína, conseqüentemente, diminuindo a força intermolecular entre elas. Apesar de ser amplamente utilizado, o glicerol apresenta caráter higroscópico sendo sensível às variações de umidade do ambiente (MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008; KUKTAITE et al., 2016). Assim, a inclusão de componentes hidrofóbicos para aumentar o caráter hidrofóbico de géis e filmes proteicos tem sido estudados (GONTARD et al., 1994; ANDREUCETTI; CARVALHO; GROSSO, 2009). Ácido oleico foi utilizado como plasticizante hidrofóbico em filmes produzidos a partir de glúten de trigo reduzindo a permeabilidade ao vapor de água (GONTARD et al.,

1994) e ácido linoleico como plasticizante em resinas de policloreto de polivinila (BENECKE; VIJAYENDRAN; ELHARD, 2004).

3. Impacto do processamento nas propriedades do glúten de trigo

3.1. Mistura

A viscoelasticidade característica da massa de trigo é desenvolvida após a hidratação e mistura do material e é resultado da quantidade e composição das proteínas do glúten (PAYNE; HOLT; LAWRENCE, 1983; PIROZI et al., 2008; LI et al., 2017). A proporção entre gliadinas e gluteninas no glúten desempenha papel essencial na qualidade da massa (SHEWRY; TATHAM; LAZZERI, 1997; JOHANSSON et al., 2013).

Para a formação da massa de trigo são necessários essencialmente três fatores: farinha de trigo, água e energia. As massas são sistemas concentrados onde as forças de cisalhamento e tensão fornecida pelo processo de mistura promovem a polimerização das proteínas que formam uma matriz complexa (SINGH; MACRITCHIE, 2001). Durante o desenvolvimento, a massa de trigo adquire gradualmente as propriedades viscoelásticas até atingir um ponto ótimo de consistência. Em nível molecular, o que ocorre durante a mistura é que forças de tensão e cisalhamento promovem instabilidade termodinâmica alterando o estado de equilíbrio das gluteninas, e assim a cadeia polimérica é formada por meio das interações químicas promovidas por esta instabilidade. Após a extensão da cadeia de glutenina, as moléculas apresentam a elasticidade típica encontrada em materiais como a borracha. A alta elasticidade do material pode ser atribuída às ramificações que unem as moléculas de glutenina e retardam a retração molecular mesmo durante o descanso. Ao continuar o processo de mistura além do ponto ótimo de desenvolvimento espera-se que ocorra a quebra do polímero devido ao rompimento de ligações dissulfeto, levando a formação de moléculas de menor massa molecular (LÉTANG; PIAU; VERDIER, 1999).

As funções específicas dos componentes do glúten na funcionalidade da massa são complexas (GUPTA; SHEPHERD; MACRITCHIE, 1991; GUPTA; BATEY; MACRITCHIE, 1992; KHATKAR et al., 2002). Quando a fração de gliadina é misturada com amido e água, um material viscoso é formado e não há o estágio de desenvolvimento da mesma forma que na massa comum. O oposto é observado

com as gluteninas puras, que formam um material elástico com pouca extensibilidade. Assim, as propriedades mais marcantes e características do desenvolvimento do glúten durante a mistura são atribuídas a presença de glutenina (MACRITCHIE; SINGH, 2004). Embora a polimerização seja evidente entre as subunidades de gluteninas, estudos têm demonstrado que grande parte das moléculas de gliadina estão incorporadas ao polímero no tempo de desenvolvimento ótimo. As gliadinas atuam preenchendo os espaços da rede polimérica e plasticizando o polímero. Durante a mistura, a gliadina interage com a glutenina por meio de ligações não covalentes, gerando uma massa viscoelástica, que possui tanto força quanto extensibilidade (BARAK; MUDGIL; KHATKAR, 2015). As α , β , e γ gliadinas podem ser adicionadas ao polímero de glúten via ligações dissulfeto intermoleculares, enquanto as ω -gliadinas podem ser aprisionadas na rede polimérica, e incorporadas por ligações de hidrogênio ou outras ligações não covalentes (KUKTAITE; LARSSON; JOHANSSON, 2004). Assim, a formação do polímero de proteínas do glúten pode ser na realidade um processo mais complexo do que os estudos têm indicado até o momento.

3.2. Separação industrial do glúten

A produção em grande escala do glúten de trigo (~50.000 toneladas/ano) por meio da separação industrial como co-produto da produção de amido de trigo, tem transformado o glúten de trigo em um importante *commodity*. O glúten apresenta propriedades funcionais, como resistência e extensibilidade que são preservadas quando condições amenas de processamento são utilizadas (DAY et al., 2006). Por outro lado, a literatura relata que a temperatura utilizada durante a secagem do glúten é um ponto crítico do processo, pois temperaturas relativamente elevadas podem promover a polimerização proteica (RASHEED et al., 2014, 2015a). Nesse contexto, o controle apropriado das etapas de processamento do glúten tem contribuído para a produção de um concentrado proteico de qualidade, impulsionando sua comercialização. Este produto é comercializado como “glúten vital” quando suas propriedades tecnológicas são mantidas após hidratação (ORTOLAN et al., 2017). Em alimentos o glúten vital pode ser utilizado, por exemplo, como melhorador de farinha de trigo na indústria de produção de pão para melhorar a textura ou aderência de massas. Além disso, o glúten tem encontrado cada vez

mais aceitação na substituição, por exemplo, de proteínas do leite (~8 \$US/kg) e soja (~7 \$US/kg) devido ao seu preço competitivo (~1 EUR/kg) (DAY et al., 2006; WU et al., 2017).

Industrialmente, existem diversos arranjos operacionais para se produzir amido e glúten a partir do trigo. A operação de hidratação é uma etapa em comum destes produtos, que tem por objetivo promover a aglomeração do glúten e, conseqüentemente, facilitar sua separação (PAULY et al., 2012). A farinha de trigo e a água são misturadas sob a forma de uma massa, que é lavada cautelosamente, ou seja, evitando a sua ruptura, para separar o amido na fase aquosa. A severidade e a natureza do processo de lavagem também influenciam a recuperação tanto do amido quanto do glúten. Uma lavagem adequada deve manter e controlar as interações entre as proteínas do glúten e enfraquecer as interações do amido com as proteínas. Por isso, o nível de hidratação, mistura, tempo de descanso da massa e a severidade da lavagem devem ser bem controlados (VAN DER BORGHT et al., 2005; ZALM; GOOT; BOOM, 2009).

Após a hidratação, a massa segue para a operação de separação do amido e do glúten que divide a linha de processamento principal em duas linhas paralelas. As centrífugas e os hidrociclones são os equipamentos mais utilizados para a separação do glúten ou em menor extensão a decantação é aplicada uma vez que amido é mais denso do que as partículas de glúten. O glúten separado do amido por estes processos, em geral apresenta funcionalidade, e por isso, convencionou-se denominá-lo como vital (VERBERNE; ZWITSERLOOT, 1978). Devido à ação de enzimas proteolíticas, a rede proteica pode se tornar extremamente macia e extensível, que são características indesejáveis, ao contrário das propriedades visco-elásticas que são desejáveis. Por isso a etapa de secagem deve ocorrer em um curto período após a separação (DAY et al., 2006). Em produtos sensíveis ao calor, a liofilização é o método mais indicado de secagem, e por isso, é considerado o método de secagem ideal para o glúten. Na liofilização, a temperatura do glúten hidratado é reduzida até que toda água presente passe para o estado sólido, e ao reduzir a pressão da câmara de liofilização ocorre a sublimação do gelo. Porém, até o momento é o método menos viável economicamente para secar o glúten em grandes quantidades (SINGH; HELDMAN, 2014; KAUSHIK et al., 2015). A secagem a vácuo foi um dos primeiros métodos utilizados para a secagem do glúten, no entanto, devido ao seu alto custo operacional foi substituída por

métodos como *flash drying*. Nesse método aplica-se calor para se obter uma umidade de 6-10% no produto final. A preparação do glúten para o processo de secagem rápida, *flash drying*, consiste em extrusar o material que é cortado em fatias de aproximadamente 10 mm de comprimento. O material semi-úmido obtido após a extrusão é reunido ao glúten previamente seco, até se obter uma umidade de equilíbrio de 25-30%. O material é então disperso em um fluxo de ar aquecido que circula através de um tubo de secagem. Quando submetido à secagem por *spray drying*, o glúten úmido é disperso numa torre ou câmara com ar aquecido. As partículas atomizadas se movem com o ar quente, a água evapora, sendo carregada pelo ar. Nesse sistema, é possível manter a qualidade do produto devido ao sistema de resfriamento rápido das partículas (VAN DER BORGHT et al., 2005; DAY et al., 2006; SINGH; HELDMAN, 2014).

O processo de separação do glúten e a temperatura de secagem foram fatores que demonstraram impactar as propriedades dos filmes desenvolvidos com o glúten (KAYSERILIOĞLU et al., 2003; RASHEED et al., 2015a). Filmes elaborados com glúten obtido de um processo brando (lavagem da farinha de trigo com água corrente) apresentaram melhor integridade mecânica comparativamente aos filmes elaborados com glúten obtido industrialmente. As diferenças na polimerização das proteínas foram correlacionadas com a origem do glúten, sendo demonstrado que o glúten separado pelo processo brando estava menos polimerizado que o glúten obtido industrialmente antes do processamento em filme. A desnaturação proteica que ocorre por influência da temperatura durante a secagem do glúten mostrou promover a formação de uma rede proteica altamente conectada e complexa (RASHEED et al., 2015a).

4. Efeito da transglutaminase em produtos de panificação

O tamanho e a forma dos polímeros de glutenina formados são determinantes na viscoelasticidade da rede, conforme descrito detalhadamente nos itens anteriores. Por isso, agentes oxidantes e redutores têm sido utilizados para melhorar as propriedades mecânicas da massa de farinha de trigo ou glúten ao modificar o estado de oxidação dos grupos SH e SS das gliadinas e gluteninas. Provavelmente, tais modificações estão associadas a mudanças que são induzidas por estes agentes nas subunidades de glutenina e muitos dos mecanismos ainda

não foram elucidados, especialmente quanto ao uso de bromato de potássio e ácido ascórbico (LARRÉ et al., 2000). Quando a massa do trigo é fermentada pelas leveduras, uma fina estrutura porosa é formada devido à liberação de dióxido de carbono produzida durante a fermentação. A capacidade da massa de formar uma estrutura porosa pode ser atribuída a sua baixa energia livre na interface com o ar por causa da baixa atividade superficial destas proteínas (MITA; ISHIDA; MATSUMOTO, 1978).

Conforme novos estudos são publicados na literatura descrevendo os efeitos benéficos das enzimas, estas passam a substituir parcialmente o uso de agentes químicos. A TG é reconhecida pelo FDA como segura para ingestão humana o que a torna muito atrativa para aplicação em alimentos (AALAMI; LEELAVATHI, 2008). Por isso, o fornecimento de TG para modificar as proteínas da soja e trigo tem aumentado consideravelmente (DUBE et al., 2007). Em panificação a TG vem sendo cada vez mais utilizada, pois pode formar novas ligações covalentes entre os resíduos de lisina e glutamina das proteínas do trigo e de outros cereais e fortalecer a rede proteica (GOESAERT et al., 2005). As características das proteínas do glúten são determinantes na qualidade de produtos levedados porque a rede proteica do glúten é responsável pela estrutura e retenção de dióxido de carbono durante o processo de panificação. Interações com meio ambiente durante o cultivo e as variações genéticas do trigo mostraram impactar significativamente as características das proteínas do trigo, e portanto, a polimerização do glúten, a estrutura e a qualidade da farinha, além das propriedades reológicas das massas e dos produtos de panificação (JOHANSSON; PRIETO-LINDE; JONSSON, 2001). O tempo de desenvolvimento da planta ou período de maturação do grão de trigo pode ser alterado por fatores como temperatura e nitrogênio, sendo que este é essencial para a formação das proteínas do glúten (MALIK; KUKTAITE; JOHANSSON, 2013). Devido às inconsistentes flutuações sazonais, a habilidade da TG de adicionar ligações isopeptídicas ϵ -(γ -glutaminil)lisina na rede proteica do glúten tem sido aceita como uma solução promissora para melhorar a qualidade da farinha de trigo. Além disso, as propriedades funcionais das proteínas, ou seja, propriedades que influenciam o comportamento dos alimentos, dependem das condições de preparo, processamento, armazenamento, e consumo, e são determinantes na qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Diversos trabalhos na literatura mostram que a desaminação e a polimerização são

as principais reações catalisadas pela TG baseando-se na alteração da hidrofobicidade e na formação de polímeros de alta massa molecular. Ao modificar a solubilidade de proteínas, propriedades de emulsificação, capacidade de formação de espuma, viscosidade, entre outras, as propriedades funcionais são, conseqüentemente, alteradas (GASPAR; DE GÓES-FAVONI, 2015).

A Tabela 1.2 mostra alguns desses estudos que demonstraram a principal funcionalidade proteica melhorada pela adição de TG e uma breve descrição dos tratamentos utilizados.

BASMAN et al. (2002) estudaram o efeito da adição de transglutaminase em seis concentrações (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 % m/m) na extensibilidade e mistura em massas formuladas com as farinhas de trigo Roane (farinha de trigo vermelho mole de inverno) e Sharpshooter (farinha de trigo vermelho duro de primavera). O tempo de desenvolvimento da massa e a estabilidade aumentaram com o aumento da concentração de TG. Pequenas concentrações da enzima melhoraram a qualidade tanto da casca quanto do miolo dos pães, sendo que o impacto da TG foi mais evidente nos pães formulados com trigo mole. O trigo mole possui uma baixa qualidade proteica em relação ao trigo duro e a inclusão de ligações isopeptídicas auxiliou na polimerização proteica, conseqüentemente na qualidade dos pães. No entanto, nas concentrações mais elevadas (1 e 1,5%) foram observados efeitos negativos, como massas excessivamente resistentes. Esses resultados corroboram com os de LARRÉ et al. (2000), que estudaram as alterações reológicas e a formação de polímeros em proteínas do glúten devido a formação de ligações isopeptídicas catalisadas pela TG.

Em conclusão, a adição de TG pode modificar as propriedades tecnológicas das massas à base de trigo, e tais mudanças estão sujeitas a concentração enzimática utilizada. A utilização da TG é uma alternativa segura às adições de agentes químicos com o intuito de modular a solubilidade das proteínas e propriedades mecânicas das massas. O tratamento com TG pode resultar em considerável reforço da rede polimérica do glúten, e, portanto, aumentar a capacidade de retenção de água, resistência e elasticidade do glúten. Considerando a influência da polimerização das proteínas do glúten nas características dos produtos de panificação, a adição de transglutaminase tem se mostrado uma alternativa viável e eficiente para melhorar a qualidade destes produtos.

Tabela 1.2 - Propriedades funcionais modificadas pela TG em estudos com proteínas do glúten de trigo

Propriedade funcional	Tratamentos utilizados	Referências Bibliográficas
Solubilidade	Sulfito de sódio, ultrassom, TG	QIN et al., 2017
Solubilidade, propriedades intermoleculares	α -polilisina, TG	CUI et al., 2017
Viscosidade	Trealose, goma LBG (<i>Locust bean gum</i>), TG.	KIM et al., 2008
Interfásica	Quimotripsina, TG, variação de pH (4,0 e 6,0), 0,6 M NaCl	AGYARE; ADDO; XIONG, 2009
Viscosidade, propriedades mecânicas	TG, mistura	STEFFOLANI et al., 2008
Solubilidade, propriedades intermoleculares	TG	MUJOO; NG, 2003
Propriedades reológicas	TG	CABALLERO; GÓMEZ; ROSELL, 2007

5. Referências Bibliográficas

AALAMI, M.; LEELAVATHI, K. Effect of microbial transglutaminase on spaghetti quality. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. C306–C312, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2008.00741.x>>.

AGYARE, K. K.; ADDO, K.; XIONG, Y. L. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 72–81, 2009.

ALLEONI CARRARO, A. C. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 3, p. 291–298, 2006.

ANDREUCCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1113–1121, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.010>>.

ANVISA. Resolução RDC nº 53, de 07 de outubro de 2014. Anvisa, v. 2014, 2014.

BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 211–217, abr. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381200391X>>.

BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Biochemical and functional properties of wheat gliadins: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 357–368, 23 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2012.654863>>.

BASMAN, A.; KÖKSEL, H.; NG, P. K. Effects of increasing levels of transglutaminase on the rheological properties and bread quality characteristics of two wheat flours. **European Food Research and Technology**, v. 215, n. 5, p. 419–424, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-002-0573-3>>.

Battelle Memorial Institute Inc. Herman P. Benecke; Bhima R. Vijayendran; Joel D. Elhard. Plasticizers derived from vegetable oils. US nº US6797753B2, 04 maio 2001, 28 set. 2004.

BECK, M.; JEKLE, M.; SELMAIR, P. L.; KOEHLER, P.; BECKER, T. Rheological properties and baking performance of rye dough as affected by transglutaminase. **Journal of Cereal Science**, v. 54, n. 1, p. 29–36, 2011.

BELTON, P. S. Mini review: On the elasticity of wheat gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 29, n. 2, p. 103–107, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521098902272>>.

BLOMFELDT, T. O. J.; KUKTAITE, R.; JOHANSSON, E.; HEDENQVIST, M. S. Mechanical properties and network structure of wheat gluten foams. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1707–1715, 2011.

BLOMFELDT, T. O. J.; KUKTAITE, R.; PLIVELIC, T. S.; RASHEED, F.; JOHANSSON, E.; HEDENQVIST, M. S. Novel freeze-dried foams from glutenin- and gliadin-rich fractions. **RSC Advances**, v. 2, n. 16, p. 6617, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ra20946b>>.

BOS, M. A.; DUNNEWIND, B.; VAN VLIET, T. Foams and surface rheological properties of β -casein, gliadin and glycinin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, n. 1–4, p. 95–105, 2003.

CABALLERO, P. A.; GÓMEZ, M.; ROSELL, C. M. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 42–53, jul. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877406006376>>.

CHANG, Y. H.; SHIAU, S. Y.; CHEN, F. B.; LIN, F. R. Effect of microbial transglutaminase on the rheological and textural characteristics of black soybean

packed tofu coagulating with agar. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 1107–1112, 2011.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 612–618, 2007.

CUI, L.; YUAN, J.; WANG, P.; SUN, H.; FAN, X.; WANG, Q. Facilitation of α -polylysine in TGase-mediated crosslinking modification for gluten and its effect on properties of gluten films. **Journal of Cereal Science**, v. 73, p. 108–115, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521016302399>>.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R.. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DAY, L.; AUGUSTIN, M. A.; BATEY, I. L.; WRIGLEY, C. W. Wheat-gluten uses and industry needs. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 2, p. 82–90, 2006.

DELCOUR, J. A.; JOYE, I. J.; PAREYT, B.; WILDERJANS, E.; BRIJS, K.; LAGRAIN, B. Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 469–492, 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-022811-101303>>.

DUBE, M.; SCHÄFER, C.; NEIDHART, S.; CARLE, R. Texturisation and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 2, p. 287–299, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00217-006-0401-2>>.

EWART, J. A. D. Glutenin structure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, n. 5, p. 482–492, 1979.

FALCONE, P.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; DEL DUCA, S. Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 265–273, 1993.

FAO. FAO Statistical Yearbook 2012. FAO Statistical Yearbook 2012. World Food and Agriculture, p. 18–31, 2012.

FOLK, J. E. Structure and catalytic properties of hepatic transglutaminase. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 202, n. 1, p. 59–76, 1972.

GASPAR, A. L. C.; DE GÓES-FAVONI, S. P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. **Food Chemistry**, v. 171, p. 315–322, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.019>>.

GAUCHE, C.; TOMAZI, T.; BARRETO, P. L. M.; OGLIARI, P. J.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and

transglutaminase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 239–243, 2009.

GERRARD, J. A. Protein-protein crosslinking in food: Methods, consequences, applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n.12, 2002.

GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W. S.; COURTIN, C. M.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 12–30, 2005.

GRIFFIN, M.; CASADIO, R.; BERGAMINI, C. M. Transglutaminases: Nature's biological glues. **Biochemical Journal**, v. 368, n. 2, p. 377–396, 2002. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj20021234>>.

GUERRA-RODRÍGUEZ, E.; VÁZQUEZ, M. Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 4, p. 784–791, 2014.

GUPTA, R. B.; BATEY, I. L.; MACRITCHIE, F. Relationships between protein-composition and functional-properties of wheat flours. **Cereal Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 125–131, 1992.

GUPTA, R. B.; KHAN, K.; MACRITCHIE, F. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. **Journal of Cereal Science**, v. 18, n. 1, p. 23–41, 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521083710313>>.

GUPTA, R. B.; SHEPHERD, K. W.; MACRITCHIE, F. Genetic control and biochemical properties of some high molecular weight albumins in bread wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 13, n. 3, p. 221–235, 1991.

HO, M.-L.; LEU, S.-Z.; HSIEH, J.-F.; JIANG, S.-T. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptovercillium ladakanum*. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 1, p. 76–80, 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15959.x>>.

HUSSAIN, A.; LARSSON, H.; KUKTAITE, R.; PRIETO-LINDE, M. L.; JOHANSSON, E. Towards the understanding of bread-making quality in organically grown wheat: Dough mixing behaviour, protein polymerisation and structural properties. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 3, p. 659–666, 2012.

JOHANSSON, E.; MALIK, A. H.; HUSSAIN, A.; RASHEED, F.; NEWSON, W. R.; PLIVELIC, T.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; KUKTAITE, R. Wheat gluten polymer structures: The impact of genotype, environment, and processing on their functionality in various applications. **Cereal Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 367–376, 2013.

JOHANSSON, E.; PRIETO-LINDE, M. L.; JONSSON, J. O. Effects of wheat cultivar and nitrogen application on storage protein composition and breadmaking quality. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 19–25, 2001.

KAUSHIK, R.; KUMAR, N.; SIHAG, M. K.; RAY, A. Isolation, characterization of wheat gluten and its regeneration properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5930–5937, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13197-014-1690-2>>.

KAYSERILIOĞLU, B. Ş.; BAKIR, U.; YILMAZ, L.; AKKAŞ, N. Drying temperature and relative humidity effects on wheat gluten film properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 964–968, 2003. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0205817>>.

KHAN, K.; BUSHUK, W. Studies of glutenin. XIII. Gel filtration, isoelectric focusing and amino acid composition studies. **Cereal Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 505–512, 1979.

KHATKAR, B. S.; BELL, A. E.; SCHOFIELD, J. D. The dynamic rheological properties of gluteins and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 22, n. 1, p. 29–44, 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521005800050>>.

KHATKAR, B. S.; FIDO, R. J.; TATHAM, A. S.; SCHOFIELD, J. D. Functional properties of wheat gliadins. I. Effects on mixing characteristics and bread making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 35, n. 3, p. 299–306, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521001904291>>.

KIELISZEK, M.; MISIEWICZ, A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. **Folia microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 241–250, 2014.

KIM, Y. S.; HUANG, W.; DU, G.; PAN, Z.; CHUNG, O. Effects of trehalose, transglutaminase, and gum on rheological, fermentation, and baking properties of frozen dough. **Food Research International**, v. 41, n. 9, p. 903–908, 2008.

KUKTAITE, R.; LARSSON, H.; JOHANSSON, E. Variation in protein composition of wheat flour and its relationship to dough mixing behaviour. **Journal of Cereal Science**, v. 40, n. 1, p. 31–39, 2004.

KUKTAITE, R.; NEWSON, W. R.; RASHEED, F.; PLIVELIC, T. S.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Monitoring nanostructure dynamics and polymerization in glycerol plasticized wheat gliadin and glutenin films: Relation to mechanical properties. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 6, p. 2998–3007, 2016.

KUKTAITE, R.; PLIVELIC, T. S.; CERENIUS, Y.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; MARTTILA, S.; IGNELL, R.; POPINEAU, Y.; TRANQUET, O.; SHEWRY, P. R.; JOHANSSON, E. Structure and morphology of wheat gluten films: From polymeric protein aggregates toward superstructure arrangements. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1438–1448, 2011.

KURASHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSA, Y. Transglutaminase: its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v. 17, n. 2, p. 221–246, 2001. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/FRI-100001258>>.

LARRÉ, C.; DENERY-PAPINI, S.; POPINEAU, Y.; DESHAYES, G.; DESSERME, C.; LEFEBVRE, J. Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 121–127, 2000.

LÉTANG, C.; PIAU, M.; VERDIER, C. Characterization of wheat flour water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. **Journal of Food Engineering**, v. 41, n. 2, p. 121–132, 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877499000825>>.

LI, M.; WANG, Y.; MA, F.; ZENG, J.; CHANG, J.; CHEN, M.; LI, K.; YANG, G.; WANG, Y.; HE, G. Effect of extra cysteine residue of new mutant 1Ax1 subunit on the functional properties of common wheat. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7510, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-07541-w>>.

LORAND, L.; GRAHAM, R. M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 140–156, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm1014>>.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 618–626, 2007.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. A comparative biochemical characterization of microbial transglutaminases: commercial vs. a newly isolated enzyme from *Streptomyces* sp. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 308–314, 2010.

MACRITCHIE, F. Baking quality of wheat flours. **Advances in Food Research**, v. 29, p. 201–277, 1984. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065262808600580>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

MACRITCHIE, F.; SINGH, H. **Polymer Concepts Applied to Gluten Behaviour in Dough**. In: LAFIANDRA, Domenico; MASCI, S.; D'OVIDIO, R.. The Gluten Proteins. Gateshead: Athenaeum Press Ltd, 2004. p. 227-230.

MALIK, A. H.; KUKTAITE, R.; JOHANSSON, E. Combined effect of genetic and environmental factors on the accumulation of proteins in the wheat grain and their relationship to bread-making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 2, p. 170–174, mar. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2012.09.017>>.

MARINIELLO, L.; PORTA, R.; SORRENTINO, A.; GIOSAFATTO, C. V. L.; ROSSI MARQUEZ, G.; ESPOSITO, M.; DI PIERRO, P. Transglutaminase-mediated macromolecular assembly: Production of conjugates for food and pharmaceutical applications. **Amino Acids**, v. 46, n. 3, p. 767-776, 2014.

MASCI, S.; ROVELLI, L.; KASARDA, D. D.; VENSEL, W. H.; LAFIANDRA, D. Characterisation and chromosomal localisation of C-type low-molecular-weight glutenin subunits in the bread wheat cultivar Chinese Spring. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 2–3, p. 422–428, 2002.

MCDONALD, C. E.; PENCE, J. W. Wheat gliadin in foams for food products. **Food Technology**, p. 141–144, 1961.

MITA, T.; ISHIDA, E.; MATSUMOTO, H. Physicochemical studies on wheat protein foams. II. Relationship between bubble size and stability of foams prepared with gluten and gluten components. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 64, n. 1, p. 143–153, 1978.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 5, p. 204–210, 1998.

MUJOO, R.; NG, P. K. W. Identification of wheat protein components involved in polymer formation on incubation with transglutaminase. **Cereal Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 703–706, 2003.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 82–87, abr. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861707003736>>.

ORTOLAN, F.; CORRÊA, G. P.; CUNHA, R. L.; STEEL, C. J. Rheological properties of vital wheat glutens with water or sodium chloride. **LWT - Food Science And Technology**, v. 79, p.647-654, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.059>.

PAULY, A.; PAREYT, B.; DE BRIER, N.; FIERENS, E.; DELCOUR, J. A. Starch isolation method impacts soft wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Claire) starch puroindoline and lipid levels as well as its functional properties. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 2, p. 464–469, set. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521012001208>>.

PAYNE, P. I.; HOLT, L. M.; LAWRENCE, G. J. Detection of a novel high molecular weight subunit of glutenin in some Japanese hexaploid wheats. **Journal of Cereal Science**, v. 1, n. 1, p. 3–8, 1983.

PIROZI, M. R.; MARGIOTTA, B.; LAFIANDRA, D.; MACRITCHIE, F. Composition of polymeric proteins and bread-making quality of wheat lines with allelic HMW-GS differing in number of cysteines. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 1, p. 117–122, 2008.

PLÁCIDO, D.; FERNANDES, C. G.; ISIDRO, A.; CARRONDO, M. A.; HENRIQUES, A. O.; ARCHER, M. Auto-induction and purification of a *Bacillus subtilis*

transglutaminase (Tgl) and its preliminary crystallographic characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 59, n. 1, p. 1–8, 2008.

QIN, X. S.; SUN, Q. Q.; ZHAO, Y. Y.; ZHONG, X. Y.; MU, D. D.; JIANG, S. T.; LUO, S. Z.; ZHENG, Z. Transglutaminase-set colloidal properties of wheat gluten with ultrasound pretreatments. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 39, n. February, p. 137–143, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.04.027>>.

QUESTER, S.; DAHESH, M.; STREY, R. Microcellular foams made from gliadin. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, n. 9, p. 2385–2389, 2014.

QUESTER, S.; KLEMMER, H. F. M.; STREY, R. Towards gliadin nanofoams. **Colloid and Polymer Science**, v. 295, n. 1, p. 267–275, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00396-016-3995-3>>.

RASHEED, F. **Tailoring the Structure-Function Relationship in Wheat Gluten**. Swedish University of Agricultural Sciences, 2015.

RASHEED, F.; HEDENQVIST, M. S.; KUKTAITE, R.; PLIVELIC, T. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Mild gluten separation - A non-destructive approach to fine tune structure and mechanical behavior of wheat gluten films. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 90–98, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.007>>.

RASHEED, F.; NEWSON, W. R.; PLIVELIC, T. S.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Structural architecture and solubility of native and modified gliadin and glutenin proteins: non-crystalline molecular and atomic organization. **The Royal Society of Chemistry**, v. 15, n. 31, p. 13032–7, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817591>>.

RENZETTI, S.; DAL BELLO, F.; ARENDT, E. K. Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 1, p. 33–45, 2008.

RODRIGUEZ-MATEOS, A.; MILLAR, S. J.; BHANDARI, D. G.; FRAZIER, R. A. Formation of dityrosine cross-links during breadmaking. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2761–2766, 2006.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant cell**, v. 7, n. July, p. 945–956, 1995.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S.; LAZZERI, P. Biotechnology of wheat quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 73, n. 4, p. 397–406, 1997.

SINGH, H.; MACRITCHIE, F. Application of polymer science to properties of gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 33, n. 3, p. 231–243, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521000903606>>.

SINGH, R Paul; HELDMAN, Dennis. **Introduction to Food Engineering**. 5. ed. Ohio: Academic Press, 2014. 892 p.

SOARES, L. H.; ASSMANN, F.; ZÁCHIA AYUB, M. A. Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, n. Pt 3, p. 295–299, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529180>>.

SONG, Y.; ZHENG, Q. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 3, p. 132-138, 2007.

STEFFOLANI, M. E.; PÉREZ, G. T.; RIBOTTA, P. D.; PUPPO, M. C.; LEÓN, A. E. Effect of transglutaminase on properties of glutenin macropolymer and dough rheology. **Cereal Chemistry**, 2008.

STORCK, C. R.; DA ROSA ZAVAREZE, E.; GULARTE, M. A.; ELIAS, M. C.; ROSELL, C. M.; GUERRA DIAS, A. R. Protein enrichment and its effects on gluten-free bread characteristics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 346–354, 2013.

SUN, X. D.; ARNTFIELD, S. D. Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate catalyzed by microbial transglutaminase cross-linking. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 25–31, 2011.

SUZUKI, S.; IZAWA, Y.; KOBAYASHI, K.; ETO, Y.; YAMANAKA, S.; KUBOTA, K.; YOKOZEKI, K. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.64, n. 11, p. 2344-2351, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18249137>>.

TILLEY, K. A.; BENJAMIN, R. E.; BAGOROGOZA, K. E.; OKOT-KOTBER, B. M.; PRAKASH, O.; KWENA, H. Tyrosine cross-links: Molecular basis of gluten structure and function. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2627–2632, 2001.

VAN DER BORGHT, A.; GOESAERT, H.; VERAVERBEKE, W. S.; DELCOUR, J. A. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: Overview of the main processes and the factors involved. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 3, p. 221–237, 2005.

VERBERNE, P.; ZWITSERLOOT, W. A new hydrocyclone process for the separation of starch and gluten from wheat flour. **Starch - Stärke**, v. 30, n. 10, p. 337–338, 1978. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/star.19780301004>>.

WASHIZU, K.; ANDO, K.; KOIKEDA, S.; HIROSE, S.; MATSUURA, A.; TAKAGI, H.; MOTOKI, M.; TAKEUCHI, K. Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 1, p. 82–87, 1994. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1992/58/1/58_1_82/_pdf>.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 115–119, 2007.

WILSON, A. J. **Foams: Physics, Chemistry and Structure**. 1. ed. London: Springer London, 1989.

WRINGLEY, C. W. Giant proteins with flour power. **Nature**, v. 381, p. 738–739, 1996.

WU, Q.; LINDH, V. H.; JOHANSSON, E.; OLSSON, R. T.; HEDENQVIST, M. S. Freeze-dried wheat gluten biofoams; scaling up with water welding. **Industrial Crops and Products**, v. 97, n. March, p. 184–190, 2017.

YASUEDA, H.; KUMAZAWA, Y.; MOTOKI, M. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 11, p. 2041–2045, 1994.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 447–454, 2004.

YU, Y. J.; WU, S. C.; CHAN, H. H.; CHEN, Y. C.; CHEN, Z. Y.; YANG, M. Te. Overproduction of soluble recombinant transglutaminase from *Streptomyces netropsis* in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 523–532, 2008.

ZALM, E. E. J. van der; GOOT, A. J. van der; BOOM, R. M. Influence of process conditions on the separation behaviour of starch–gluten systems. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 4, p. 572–578, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877409002994>>.

ZHANG, L.; ZHANG, L.; YI, H.; DU, M.; MA, C.; HAN, X.; FENG, Z.; JIAO, Y.; ZHANG, Y. Enzymatic characterization of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 in high salt and effect of enzymatic cross-linking of yak milk proteins on functional properties of stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3559–3568, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030212003372>>.

CAPÍTULO 2

TRANSGLUTAMINASE PRODUZIDA POR *Streptomyces* SP. CBMAI 1617: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EM PROTEÍNAS DE MASSAS DE TRIGO

Artigo publicado na revista Food Chemistry (Anexo),
volume 241 em 15 de fevereiro de 2018, páginas 403-410.

Autoria de Elaine B. Ceresino, Ricardo R. de Melo, Ramune Kuktaite, Mikael S.
Hedenqvist, Tiago D. Zucchi, Eva Johansson, Hélia H. Sato.

Resumo

A popularidade da transglutaminase (TG) na indústria de alimentos e a variação na funcionalidade desta enzima em função da origem, motivaram a avaliação de uma TG obtida de uma nova fonte microbiana. A exploração potencial da TG produzida pela linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6) foi comparada com o desempenho de TG comercial produzida pelo micro-organismo *Streptomyces mobaraensis*. Estudos bioquímicos e de FT-IR indicaram diferenças entre a SB6 e a TG comercial (Biobond™ TG-M). Adições de TG em massas à base de farinha de trigo e de proteínas extraídas do glúten de trigo revelaram que as propriedades visco-elásticas da massa dependem da fração proteica do trigo, concentração da enzima e sua origem. Um maior grau de ligações cruzadas em gluteninas foi observado com o tratamento com SB6 comparada com a TG comercial. A SB6 também propiciou a inclusão de gliadinas nos polímeros. Assim, este estudo mostrou o potencial da SB6 em modular as propriedades de proteínas do trigo.

1. Introdução

A transglutaminase microbiana (TG, E.C. 2.3.2.13) é atualmente uma das enzimas mais aplicadas na formação de ligações cruzadas em proteínas. Esta enzima é amplamente utilizada pelas indústrias alimentícias na elaboração de produtos cárneos, lácteos e de panificação (KIELISZEK; MISIEWICZ, 2014). A TG promove a formação de ligações isopeptídicas intra e intermoleculares por meio da formação de ligações covalentes entre resíduos de lisina e glutamina de proteínas (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004).

O isolamento de uma linhagem bacteriana produtora de TG extracelular, *Streptomyces mobaraense* (WASHIZU et al., 1994), foi o primeiro passo para a extensa exploração comercial dessa enzima. Posteriormente, várias linhagens produtoras de TG como *Streptomyces lydicus* (FÆRGEMAND; QVIST, 1997), *Streptomyces cinnamoneum* CBS 683.68 (DURAN et al., 1998) e *Streptomyces* sp. CBMAI 837 (MACEDO; SETTE; SATO, 2007), foram isoladas. Porém, o rendimento e as características das TGs variam consideravelmente dependendo da linhagem. Novas linhagens bacterianas produtoras de TG tem sido isoladas de várias fontes ambientais com o objetivo de se alcançar um alto rendimento na produção de TG ou de se obter enzimas com diferentes funcionalidades (ZHANG; YANG; CHEN, 2009; KIELISZEK; MISIEWICZ, 2014).

A extensibilidade e força da massa de trigo são propriedades atribuídas às principais frações poliméricas das proteínas do glúten do trigo. A quantidade, o tipo e o tamanho das proteínas presentes na farinha de trigo desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da massa de trigo. Variações genéticas do trigo e ambientais podem influenciar as características das proteínas do trigo e, portanto, a complexidade e quantidade de polímeros formados durante o processamento do trigo. A complexidade do polímero é geralmente analisada via cromatografia por exclusão de tamanhos (SE-HPLC) e calculando-se a porcentagem de proteínas poliméricas não extraíveis em relação as proteínas poliméricas totais (% UPP) (HUSSAIN et al., 2012; MALIK; KUKTAITE; JOHANSSON, 2013). Os efeitos benéficos da TG comercial obtida de *Streptomyces mobaraensis* sobre o glúten em sistemas-modelo foram reportados na literatura anteriormente (LARRÉ et al., 2000; STEFFOLANI et al., 2008). No entanto, o desenvolvimento da massa e a qualidade dos produtos finais podem ser diferentemente impactados pelo uso de

TGs de várias origens e em diferentes concentrações. Para melhor compreender os efeitos de TGs de diferentes fontes nas proteínas do glúten, as características de solubilidade e polimerização podem ser avaliadas em frações proteicas ricas em gliadina, glutenina e sistema-modelo de massa de farinha de trigo na presença de TG. O objetivo do presente estudo foi avaliar as diferenças entre as propriedades funcionais da TG obtida de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 e a TG comercial com relação aos seus efeitos sobre o comportamento das proteínas e a capacidade de polimerização em massa de farinha de trigo e em massas-modelo das frações proteicas ricas em gliadina e glutenina de glúten de trigo.

2. Material e métodos

A composição química da farinha de trigo e do glúten em pó foram fornecidas pelos fabricantes Farina AB (Lilla Harrie, Suécia) e Lantmännen Reppe AB (Lidköping, Suécia), respectivamente. A farinha de trigo (Extra bagerivetemjöl) foi tratada com ácido ascórbico (30 mg/kg) pelo fabricante e continha 11,4% de proteína, 69% de amido, 1,4% de gordura e 2,9% de fibra. O glúten em pó continha 77,7% de proteína (N x 5,7) e 5,8% de amido. As frações de glúten, gliadina e glutenina, foram obtidas de acordo com BLOMFELDT et al. (2012).

A enzima comercial Biobond™ TG-M (designada como TG comercial) foi fornecida por Shangai Kinry Food Ingredients Co. (China) e apresentou atividade de $109,9 \text{ Ug}^{-1}$. N-carbobenzoxi-L-glutaminil-glicina (N-CBZ-Gln-Gly), ácido L-glutâmico- γ -monohidroxâmico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (Alemanha). Ureia e dodecilsulfato de sódio (SDS) foram adquiridos da Duchefa Biochemie (Holanda). Fosfato de sódio monobásico e ácido trifluoroacético (TFA) foram adquiridos da Merck (Alemanha) e acetonitrila de grau HPLC de VWR BDH Prolabo (VWR Chemicals, Suécia). O isopropanol foi fornecido pela Honeywell, na Alemanha. Todos os produtos químicos utilizados eram de grau analítico. A água foi purificada por um sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, EUA).

2.1. Fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 em frascos agitados e produção de TG

A linhagem de micro-organismo utilizada neste trabalho foi isolada por MELO (2013) a partir de solos brasileiros do Estado de Minas Gerais e faz parte da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Esta linhagem está depositada na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria sob código de registro CBMAI 1617. A linhagem foi identificada como tendo características morfológicas típicas de actinomicetos e a análise da região 16S rRNA a classificou na subclasse *Streptomyces* próximo a linhagem *Streptomyces angustmycinicus* NBRC 3934^T. A sequência da região 16S rRNA foi depositada no GenBank sob o número de acesso MF435929 (CERESINO et al., 2018). O micro-organismo foi conservado na forma de fragmentos do micélio em solução de glicerol 20% (v/v) a -20 °C ou em tubos inclinados contendo meio ágar ISP-2 composto de extrato de levedura (4,0 g/L), extrato de malte (10,0 g/L), glicose (4,0 g/L) e ágar (20,0 g/L) a 4 °C (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

O inóculo foi preparado inoculando-se o micro-organismo em placas de Petri contendo o meio ágar ISP-2 por 4 dias a 30 °C. Seis cilindros de 0,6 cm de diâmetro cobertos uniformemente com o micro-organismo foram cortados e utilizados para inocular o meio de cultivo. A produção da TG foi realizada por meio de fermentação submersa em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo otimizado por MELO et al. (2013) composto de 2,5% de amido de batata, 0,5% de glicose, 2,45% de peptona de caseína e 0,8% de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30 °C com agitação constante a 150 rpm durante 96 horas. Após o período de incubação o meio de cultura foi centrifugado a $16.500 \times g$ por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante livre de células foi usado como preparação bruta. A atividade da enzima foi determinada por meio do método do hidroxamato (FOLK; COLE, 1966) com pequenas modificações. A mistura de 200 μL de extrato enzimático; 75 μL de solução de CBZ-glutaminil-glicina (Sigma C6154-1G) 0,1 M; 25 μL de solução de hidroxilamina 0,1 M; 200 μL de tampão citrato 0,2M pH 6,0, foi incubada a 37°C por 1 hora. Após a incubação, foi adicionado 500 μL de reagente paralisante, composto de 1/3 de ácido tricloroacético 15%, 1/3 de HCl 2,5 M e 1/3 de solução de cloreto férrico 5% em HCl 0,1 M (v:v). A

mistura foi centrifugada por 1 minuto e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 525 nm contra o branco. A curva de calibração foi preparada com L-ácido glutâmico- γ -ácido monohidroxâmico (Sigma G2253). Uma unidade de atividade da TG foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 μ mol de ácido hidroxâmico por minuto a 37 °C.

A preparação enzimática bruta foi saturada com 40% de sulfato de amônio e permaneceu a 4°C por aproximadamente 12h. Após a centrifugação a 16.500 x g; 10 min, 4 °C (Hitachi Himac CR 21 GII, Japão), sulfato de amônio foi adicionado novamente ao sobrenadante até atingir 80% de saturação. A solução foi novamente centrifugada nas mesmas condições e em seguida o precipitado foi ressuspenso em água destilada, e dialisado contra água destilada por 48 h a 4 °C para a remoção do sal. Após ser recolhida, a preparação enzimática foi congelada a -20 °C por 24 h e liofilizada durante 48 h, sendo armazenada em sacos plásticos transparentes à vácuo a -20 °C até o momento das análises. A preparação enzimática parcialmente purificada liofilizada foi designada como SB6.

2.2. Efeitos do pH e da temperatura na atividade enzimática de SB6 e TG comercial

O efeito do pH na atividade enzimática foi avaliado a 37 °C utilizando os seguintes tampões 50 mM: citrato de sódio (pH 4,0 a 6,5), Tris-HCl (pH 7,0 - 9,0), Glicina-NaOH (pH 10,0-11,0) e solução de NaOH (pH 12,5). O efeito da temperatura na atividade enzimática foi testado na faixa de 4 a 70 °C em pH 6,0. Em ambos os casos, o período de incubação foi de 60 min em banho-maria. Para os cálculos de atividade relativa, a atividade máxima em determinado pH ou temperatura foi considerada 100%.

2.3. Estrutura secundária das enzimas SB6 e TG comercial determinada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

As preparações enzimáticas, SB6 e TG comercial, foram mantidas em um dessecador sobre um gel de sílica antes da análise. As varreduras (16 de cada amostra) foram registradas por meio do equipamento Spectrum 2000 FTIR (Perkin-Elmer Inc.) equipado com acessório ATR de reflexão única (Golden Gate, Speac Ltd., Inglaterra).

2.4. Extração das frações de gliadina e glutenina

Glúten em pó foi utilizado para obter as frações ricas em gliadina e glutenina (BLOMFELDT et al., 2012), dispersando-se 40 g de glúten em 500 mL de solução de 70% de etanol em água (v/v) sob agitação magnética. A mistura foi agitada durante 30 min a 300 rpm à temperatura ambiente seguida por centrifugação durante 10 min a 12.000 x g e 5°C (centrífuga Beckman J2.21, CA, EUA). O sobrenadante etanólico, contendo a fração rica em gliadina, foi concentrado em um evaporador rotativo (Buchi) e em seguida liofilizado (Edwards, Modulyo, Sussex, Reino Unido). O precipitado rico em glutenina foi lavado com água Millipore e liofilizado (Edwards, Modulyo, Sussex, Reino Unido).

2.5. Preparação dos sistemas-modelo de massa de farinha de trigo, gliadina e glutenina

As preparações enzimáticas, SB6 e TG comercial, foram dissolvidas em água ultrapura para obter 0 (controle), 0,55, 1,1 e 1,64 U/g de farinha de trigo, gliadina e glutenina. A farinha de trigo e as frações ricas em gliadina ou glutenina (10 g) foram misturadas com a solução de TG (6,9, 6,8 e 9,0 mL, respectivamente) em um mixógrafo a 26 °C (Bohlin Reologi AB, Lund, Suécia) de acordo com o método 54-40.02 da American Association of Cereal Chemists, AACC (1999). Quando o desenvolvimento completo da massa foi obtido, a massa foi congelada a -80 ° C. Posteriormente, as massas foram liofilizadas e moídas com o auxílio de um moinho analítico (Yellow line, A10, IKA-Werke, Staufen, Alemanha). As massas à base de farinha de trigo e aquelas das frações ricas em proteínas foram todas preparadas e avaliadas em triplicata.

2.6. Análise da distribuição de proteínas por tamanho avaliadas por SE-HPLC

A distribuição por tamanho das proteínas e sua quantidade foi determinada de acordo com RASHEED et al. (2014) nas proteínas extraídas das massas de farinha de trigo e das massas-modelos das frações ricas em gliadina e glutenina. Por meio deste método foi possível estimar o percentual de proteínas poliméricas não-extraíveis (% UPP). As proteínas consideradas não-extraíveis são

aquelas que não são solúveis em solução de SDS, mas somente após a aplicação de ultrassom (GUPTA; KHAN; MACRITCHIE, 1993). Primeiramente as proteínas, de 16,5 mg da amostra, foram extraídas com 1,4 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 6,9 contendo 0,5% (m/v) de SDS. Em seguida, cada amostra foi homogeneizada no vortex por 10 segundos com 1,4 mL do tampão de extração, incubada por 5 minutos em incubador rotatório a 2000 rpm e por último ultrasonicadas por 30 segundos na amplitude de 5 μ m e frequência de 23 KHz utilizando um sonicador de ponteira (Sanyo Soniprep. Tamro, Suécia). Assim, após recolher as proteínas extraíveis, as proteínas não extraíveis foram ressuspensas e extraídas por sonicação (amplitude de 5 μ m, 50 Hz, 45 s para massa de trigo, 45 + 30 s para massas-modelo de gliadina e glutenina) utilizando-se o mesmo sonicador.

A separação de proteínas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão por tamanho (SE-HPLC) em um módulo de separação Waters (modelo 2690) e detector de arranjo de diodos (Waters, modelo 996, Milford, EUA). As amostras foram injetadas em um sistema constituído de pré-coluna e uma coluna principal (SecurityGuard GFC 4000, Biosep-SEC-S 4000 de 300 mm x 4,5 mm, respectivamente, Phenomenex, Torrance, EUA). As proteínas foram separadas utilizando-se uma fase móvel composta de 50% acetonitrila contendo 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) e 50% água ultrapura também contendo 0,1% TFA com fluxo de 0,2 mL min⁻¹ em eluição isocrática, durante 30 min a temperatura ambiente (18°C). Os espectros foram obtidos a 210 nm. O espectro 3D resultante foi processado pelo software Millenium 32 (Waters, versão 4.00) (RASHEED et al., 2014).

Os cromatogramas foram divididos em 3 áreas arbitrárias: proteínas poliméricas de alta massa molecular (LPP; 8,8 - 12,0 min), proteínas poliméricas de baixa massa molecular (SPP; 12,0 - 14,0 min) e proteínas monoméricas (MP; 14-28 min). As proteínas poliméricas totais (PP) foram definidas como a soma de LPP + SPP. A percentagem de proteínas poliméricas não extraíveis (% UPP) foi calculada como $[100 \times \text{PP SDS não-extraível} / (\text{PP SDS extraível} + \text{PP SDS não-extraível})]$ (MALIK; KUKTAITE; JOHANSSON, 2013).

2.7. Solubilidade proteica determinada por RP-HPLC

A solubilidade das proteínas foi avaliada como descrito por RASHEED et al. (2014). Amostras de 50 mg de massa de farinha, gliadina e glutenina obtidas como descrito no item 2.5 foram tratadas com 1 mL de solução de 0,5 M de NaCl em tubos eppendorf para a extração de albuminas e globulinas. Em seguida as amostras foram extraídas com 1 mL de solvente, em série, nas condições descritas a seguir. A ordem e as condições de ensaio das etapas de extração em série foram: (1) etanol 70%, com agitação a 2.000 rpm durante 30 min à temperatura ambiente; (2) 50% de propanol, com agitação a 2.000 rpm durante 30 min à temperatura ambiente – 20 °C; (3) 50% de propanol, a 60 °C em estufa, 30 min; (4) SDS a 0,5%, 50% de propanol a 60 °C em estufa, 30 min; (5) 1% de ditioneitol (DTT), 50% de propanol, a 60 °C em estufa, 30 min (6) 1% de DTT e 0,5% de SDS em solução de ureia 6 M a 100 °C durante 5 min. A separação de proteínas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) (Waters, Milford, EUA), injetando-se 50 µL do sobrenadante em uma coluna C-8 (5 µm, 25 cm x 4,6 mm, Discovery Bio Wide, SUPELCO). A fase móvel inicial consistiu de 28% do solvente A (acetonitrila de grau cromatográfico contendo 0,1% de ácido trifluoroacético) e 72% do solvente B (água ultrapura contendo 0,1% de ácido trifluoroacético) alcançando 56% de A e 44% de B em 30 min, 90% de A e 10% de B em 35 min, e mantendo-se esta proporção até atingir 40 min. Após 45 min, o sistema foi re-equilibrado com as condições iniciais para a injeção automática das demais amostras. O tempo total de corrida foi de 45 min com fluxo constante de 0,8 mL/min.

A solubilidade das proteínas foi normalizada com base na solubilidade total (soma da solubilidade de todas as seis etapas de extração) de acordo com a amostra controle de cada sistema modelo (RASHEED et al., 2014).

2.8. Análise estatística

Para avaliar as diferenças na solubilidade e extractabilidade das proteínas, a análise de variância foi realizada e em seguida o cálculo de médias cujas significâncias foram diferenciadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) após ANOVA com auxílio do software Minitab express versão 1.4.0.

3. Resultados e discussão

3.1. Fermentação da linhagem *Streptomyces* sp CBMAI 1617 e produção de SB6

Na fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp CBMAI 1617 foi obtida atividade enzimática de 3,5 U mL⁻¹ de atividade enzimática. A preparação enzimática SB6 obtida por fracionamento do sobrenadante do meio de cultura com sulfato de amônio, diálise e liofilização apresentou 516,2 U g⁻¹ de atividade enzimática.

3.2. Caracterização bioquímica da TG e análise do espectro IR

A SB6 apresentou atividade máxima em pH 6,5, enquanto a TG comercial mostrou atividade ótima em pH 5,5 e 6,0 (Figura 2.1 a). O pH ótimo de atividade da SB6 é semelhante aos valores determinados de TGs de outros estreptomicetos (CUI et al., 2007; MACEDO; SETTE; SATO, 2007), embora a TG de *Bacillus circulans* BL32 apresente um ótimo pH ótimo de atividade de 7,2 (VOLKEN DE SOUZA et al., 2011). A faixa de pH ótimo de atividade da TG comercial (5,5-6,0) é mais ampla em relação a SB6, indicando que a TG comercial é menos sensível à variação do pH do que a SB6. Foi observada atividade de TG relativamente elevada a pH 9,0 e 11,0 para ambas as enzimas, bem como uma baixa atividade em pH 10. MACEDO; SETTE; SATO (2010) relataram que a TG comercial de *Streptomyces mobaraesis* e de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 apresentaram atividade ótima na faixa de pH 6,0 a 6,5 e também pico de atividade em pH alcalino indicando a presença de isoenzimas ou interferência do pH na atividade enzimática.

Quanto à influência da temperatura na atividade TG, observaram-se pequenas diferenças entre as enzimas, com uma atividade máxima observada de 40°C para TG comercial e entre 35 e 40 °C para SB6 (Figura 2.1 b). Ambas as enzimas sofreram uma queda rápida em suas atividades em temperaturas maiores que 40 °C. Esses resultados são consistentes com estudos de TGs obtidas de outros estreptomicetos como *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptomyces* sp. CBMAI 837 (CUI et al., 2007; MACEDO; SETTE; SATO, 2010). Os espectros de infravermelho (IR) mostraram diferenças entre as preparações de SB6 e TG comercial na região da banda de amida I (1600 - 1700 cm⁻¹). Os espectros de IR para SB6 indicaram um ombro largo a 1630 cm⁻¹ revelando um alto teor de folhas-β.

Em relação a TG comercial, observou-se um pico amplo a 1640 cm^{-1} , indicando um alto grau de estruturas desordenadas (BARTH, 2007). A intensidade de pico observada para o SB6 foi maior em comparação com a TG comercial. Os resultados dos espectros de dicroísmo circular da TG de *Streptomyces hygrosopicus* mostraram presença de regiões com alto teor de α -hélice e folhas- β nesta enzima (CUI et al., 2007). Estudos sobre a modificação de TG de *Streptomyces mobaraensis* mostraram que a substituição de um único aminoácido poderia levar a uma maior termoestabilidade ou ao aumento da sensibilidade ao calor (MARX; HERTEL; PIETZSCH, 2008). As diferenças entre TG provenientes de diferentes micro-organismos apontam para diferenças na especificidade do substrato, bem como nas taxas de reação (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004). Assim, a análise de espectroscopia no infravermelho de SB6 e TG comercial, indicou diferenças suficientes entre estas duas enzimas para permitir uma comparação de suas propriedades intrínsecas, bem como para dar suporte as respostas que são discutidas neste trabalho.

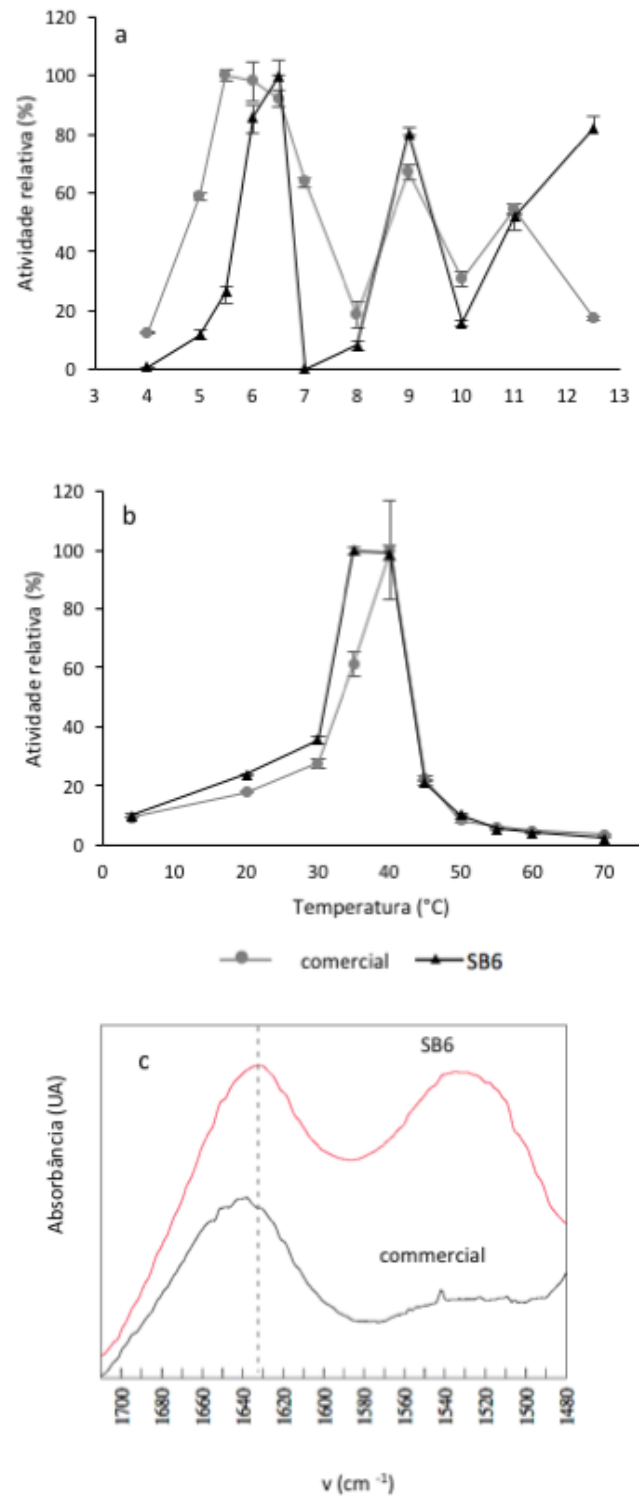


Figura 2.1- Características bioquímicas das transglutaminases. a) Efeito do pH na atividade enzimática; b) Efeito da temperatura na atividade enzimática e c) Espectro FT-IR da SB6 e TG comercial.

3.3. Comportamento de mistura de massa de trigo e de frações ricas em gliadina e glutenina

O comportamento de mistura variou nas amostras de massa de farinha de trigo dependendo do tipo de TG usado na concentração de 1,10 U/g (Figura 2.2). O tempo de desenvolvimento da massa foi maior nas massas à base de farinha de trigo com adição de TG comercial em relação às massas com adição de SB6 (4,1 e 2,5 minutos, respectivamente), sugerindo que força da massa é mais elevada na amostra tratada com TG comercial. Da mesma forma, a adição de 1,10 U/g de SB6 e TG comercial à massa, resultou em um torque máximo de 3,3 e 3,9 N•m no tempo ótimo de desenvolvimento da massa. O torque máximo mais baixo sugere menor resistência à mistura na massa (WIKSTRÖM; BOHLIN, 1996) para amostras de SB6 em comparação com amostras comerciais de TG, ou seja, contribuindo menos para aumentar a força do glúten.

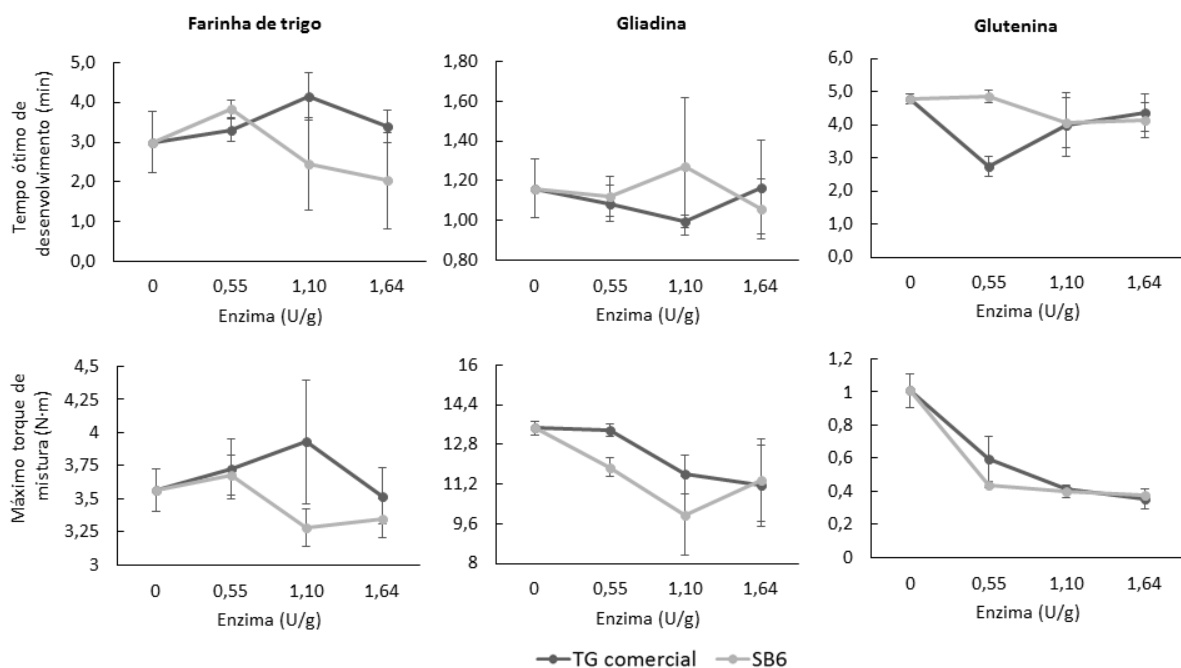


Figura 2.2 - Tempo de desenvolvimento ótimo e torque máximo registrado durante a preparação da massa de farinha de trigo, gliadina e glutenina com a adição de SB6 e TG comercial.

A adição de TG à massa é geralmente associada à perda de extensibilidade e ao aumento dos parâmetros de força da massa (AUTIO et al., 2005). No entanto, como observado na Figura 2.2, o impacto de TG no

comportamento do desenvolvimento da massa também pode variar devido à fonte da enzima.

Na massa à base de glutenina o efeito da TG sobre o máximo torque de mistura foi mais evidente do que nas massas à base de farinha de trigo. Para a massa obtida da fração rica em glutenina, observou-se que quando TG foi adicionada em qualquer concentração, em relação a massa sem adição de TG, ocorreu a diminuição da altura de desenvolvimento (Figura 2.2; conforme mostrado pelas barras de desvio padrão). Estudos anteriores mostraram que TGs induzem ligações cruzadas entre as subunidades de glutenina (especialmente entre a HMW-GS) em um grau mais alto do que entre outros tipos de proteína de trigo (LARRÉ et al., 2000; STEFFOLANI et al., 2008). Sabe-se que um reforço considerável nas ligações cruzadas pode estar associada a diminuição da extensibilidade da massa (BAGAGLI et al., 2014)

O tipo de preparação de TG não influenciou significativamente o tempo de desenvolvimento das massas preparadas com a fração rica em gliadina em todas as concentrações de TG adicionadas. No entanto, a adição de 0,55 U/g e 1,10 U/g de enzima resultou em um torque máximo inferior no tempo ótimo de desenvolvimento para SB6 do que para a TG comercial, indicando uma massa mais fraca à base de gliadina, quando tratada com SB6. Também se observou que o maior valor de torque alcançado (13,5 N•m) foi observado em massas modelos de gliadina em comparação às massas de glutenina e trigo. Interessante notar que a maior altura de desenvolvimento alcançado foi observada para a massa à base de gliadina, em comparação com farinha de trigo e massa de glutenina. Este fato sugere que, a massa de gliadina possui a maior resistência à mistura (WIKSTRÖM; BOHLIN, 1996) decorrente, provavelmente, da hidratação das proteínas e sua natureza viscosa, em oposição ao que ocorre na massa à base de glutenina (XU; BIETZ; CARRIERE, 2007).

3.4. Estudo da polimerização de proteínas de trigo avaliada por SE-HPLC

A adição de ambas as preparações enzimáticas, TG comercial e SB6, nas concentrações estudadas (exceto 1,64 U/g TG comercial) foi associada com o aumento da % UPP e % UPP de alta massa molecular (Figura 2.3) em massas de farinha de trigo. No entanto, neste estudo, a adição de SB6 às massas de farinha de

trigo resultou em maiores valores de % UPP total e % UPP de alta massa molecular do que com a enzima comercial, o que sugere que a SB6 é mais eficaz na polimerização das proteínas do glúten por meio de ligações isopeptídicas (Figura 2.3). Na amostra tratada com 1,64 U/g TG comercial, sugere-se que o aumento drástico das ligações covalentes leva ao aumento da concentração de proteínas no resíduo (BAUER et al., 2003). A explicação para a variação no impacto na polimerização de proteínas no tempo ótimo de desenvolvimento sob a ação de diferentes TGs sugere diferenças bioquímicas entre as TGs, também reveladas pelos resultados de espectroscopia no infravermelho. Nenhum efeito significativo na % UPP foi observado para massas de frações ricas em gliadina para adição de TG, independente da enzima aplicada ou da concentração (Figura 2.3). No entanto, adições de TG à massa preparada com glutenina, apresentaram comportamento semelhante com relação %UPP e % UPP de alta massa molecular às massas de farinha de trigo (Figuras 2.3 a, 2.3 c; com exceção da TG comercial). No entanto, a polimerização da proteína, devido à adição de TG, foi mais evidente na massa à base de farinha de trigo do que naquela com base na fração rica em glutenina. Essas diferenças na polimerização podem ser o resultado de um alto grau de ligações cruzadas já estabelecidas na fração rica em glutenina, que se originou no processo de fracionamento do glúten. O impacto dos procedimentos de fracionamento sobre a capacidade das proteínas do glúten para formar ligações foi recentemente reportado na literatura (RASHEED et al., 2014, 2016). A observação de que o aumento de concentração de SB6 não alterou o grau de polimerização de proteínas na massa de farinha de trigo, bem como na massa com as frações proteicas, é de interesse para a aplicabilidade da TG no setor alimentar. Os resultados obtidos indicam que mesmo uma baixa concentração da enzima adicionada pode promover ligações cruzadas na massa e também que uma eventual variação de concentração durante a formulação não afeta significativamente a padronização do produto.

A qualidade e composição da proteína do trigo é conhecida por ser sazonal (JOHANSSON et al., 2005), e desta forma a TG é uma enzima de relevância significativa para aplicação em farinha de trigo e formação de ligações cruzadas.

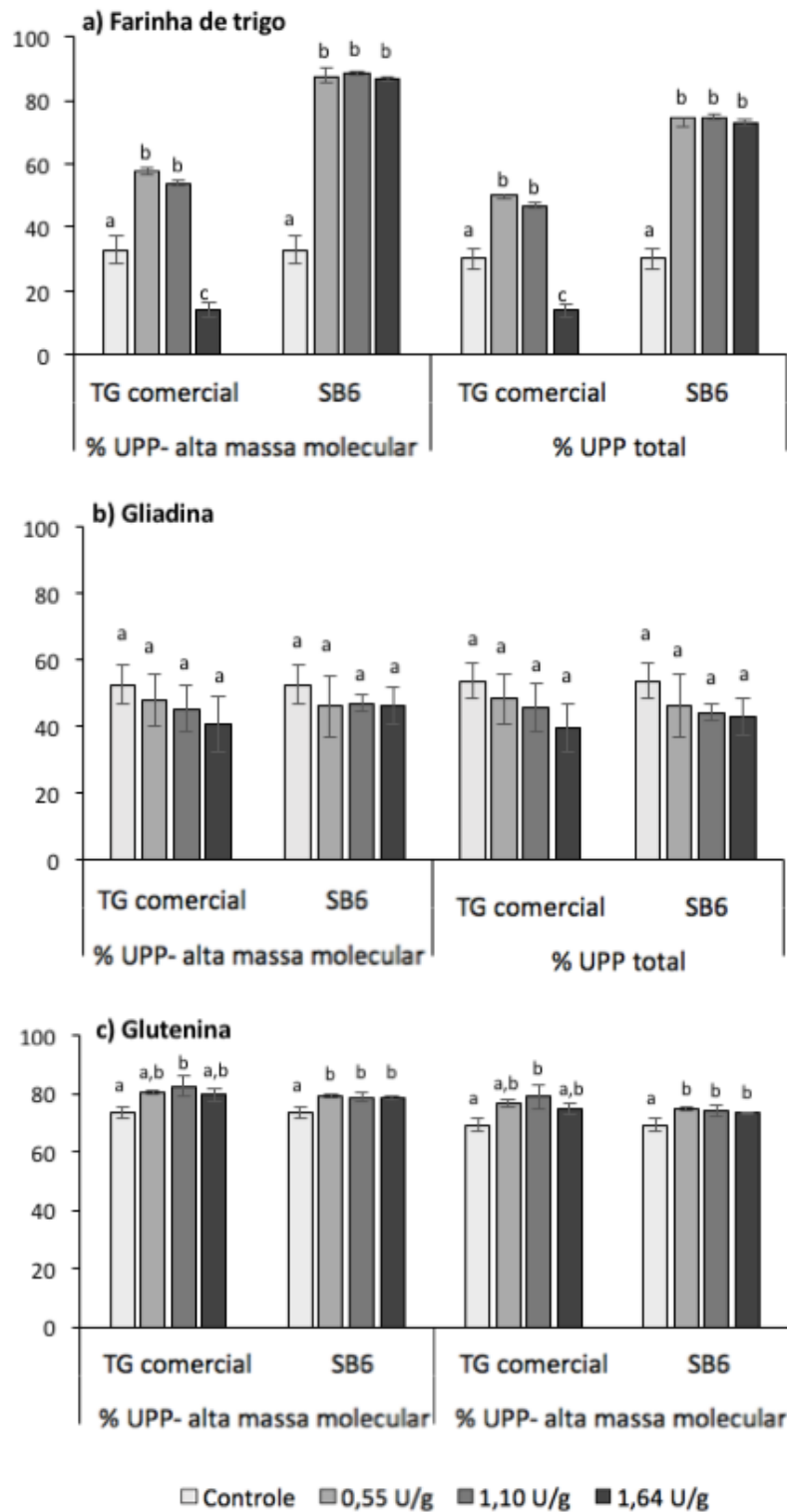


Figura 2.3 - Porcentagem de proteínas poliméricas extraíveis após sonicação.

As médias foram comparadas por one-way ANOVA, considerando-se $p < 0,05$ como nível de significância.

3.5. Estudo da solubilidade das proteínas de trigo

Estudos realizados com base na separação de diferentes frações de proteínas de acordo com a sua solubilidade em vários solventes e condições de ensaio foram utilizados para elucidar o comportamento das proteínas e aspectos do mecanismo da polimerização com TG (KUKTAITE et al., 2016). Neste estudo, o perfil de solubilidade analisado por RP-HPLC mostrou diferenças específicas para as massas à base de farinha de trigo com adição de TG comercial e SB6.

Etanol 70% e isopropanol 50% (extrações 1-3) foram capazes de extrair uma grande proporção de proteínas das massas à base de farinha de trigo tratada tanto com TG comercial quanto com SB6. Assim, estes resultados indicam que uma grande quantidade de proteínas da massa não foi polimerizada pela adição de TG. Os resultados da análise de RP-HPLC bem como os resultados da análise de SE-HPLC mostraram que as gliadinas (proteínas solúveis em álcoois) não se polimerizaram apesar da adição de TG, embora se saiba que as gliadinas tem a capacidade de se polimerizar sob certas condições (JOHANSSON et al., 2013). No entanto, apesar do fato de que uma grande parte das proteínas terem sido extraídas pelos álcoois utilizados, observou-se uma taxa de extração significativamente maior para a massa à base de farinha de trigo sem adição de TG do que naquelas com TG. Este resultado sugere a inclusão ou aprisionamento de uma pequena parte das proteínas extraíveis em álcoois nos grandes conglomerados proteicos devido à adição de TG.

Em geral, uma maior solubilidade das proteínas foi observada nas etapas de extração 1 a 4 (álcoois e SDS) para massas à base de farinha de trigo devido à adição de TG comercial quando comparado com a adição de SB6, indicando um maior grau de polimerização de proteínas solúveis em álcoois e em SDS devido à ação dessa última enzima. Além disso, as crescentes concentrações de SB6 reduziram a extração das proteínas das massas de farinha de trigo nas etapas de extração 1-4, indicando uma maior polimerização das proteínas com aumento da concentração de enzima (Figura 2.4). A adição de DTT à solução tampão extratora (extração 5) aumentou a extração de proteínas a partir de massas à base de farinha de trigo com adição de SB6 que foi mais elevada em comparação com amostras sem SB6 ou com TG comercial. Uma grande quantidade de proteínas extraídas com DTT sugere uma considerável clivagem de ligações dissulfeto (RASHEED et al.,

2015b). No entanto, a extractabilidade total de proteínas mais baixa nas massas de farinha de trigo com SB6, especialmente naquelas com altas concentrações de SB6, indicou a ocorrência ligações irreversíveis, muito provavelmente devido à formação de ligações isopeptídicas.

As ligações irreversíveis de isopeptídeos também foram sugeridas como uma explicação para a baixa solubilidade da proteína nos sistemas de glúten (RASHEED et al., 2015b). A capacidade da TG de introduzir novas ligações isopeptídicas entre a glutenina de alta massa molecular produzindo grandes polímeros foi previamente relatada na literatura (STEFFOLANI et al., 2008). Além disso, altas concentrações de TG podem contribuir para a formação de polímeros que são insolúveis e também conduzem à distribuição desigual dos agregados proteicos (AUTIO et al., 2005).

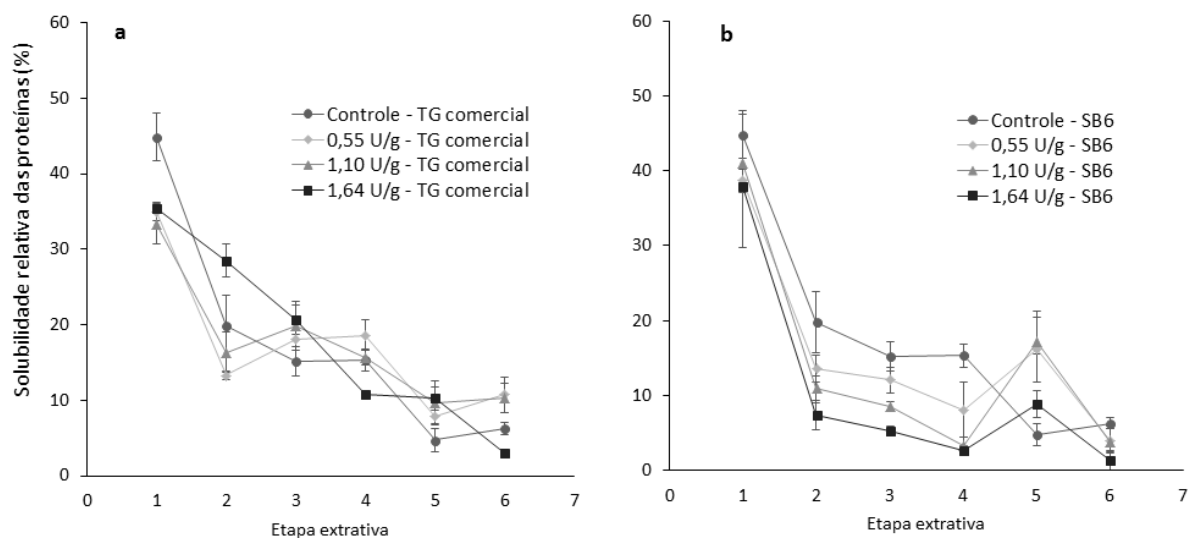


Figura 2.4 – Efeitos de diferentes métodos de extração na solubilidade proteica de massas de farinha de trigo tratadas enzimaticamente com (a) TG comercial e (b) SB6. As condições utilizadas para a extração foram: (1) 70% de etanol, com agitação a 2.000 rpm durante 30 min à temperatura ambiente; (2) 50% de propanol, com agitação a 2.000 rpm durante 30 min à temperatura ambiente; (3) 50% de propanol, a 60 °C no forno, 30 min; (4) SDS a 0,5%, 50% de propanol a 60 °C, 30 min; (5) 1% de ditiotretitol (DTT), 50% de propanol, a 60 °C, 30 min (6) 1% de DTT e 0,5% de SDS em solução de ureia 6 M a 100 °C durante 5 min.

4. Conclusão

TG de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6) mostrou maior habilidade de contribuir para a formação de ligações cruzadas entre proteínas em massas do que a TG comercial. As ligações cruzadas presentes foram principalmente do tipo dissulfeto entre a gluteninas. Ligações isopeptídicas também foram formadas muito provavelmente devido a ação da TG. Além disso, SB6 mostrou contribuir para a polimerização proteica mesmo em baixas concentrações. As propriedades desta enzima obtida de uma nova e promissora fonte bacteriana são atraentes para a indústria de alimentos.

5. Referências bibliográficas

AACC International. Approved methods of analysis. Method 54-40.02. Mixograph methods. Approved November 3, 1999(11th Ed.). St. Paul, MN, U.S.A.: AACC International. <http://dx.doi.org/10.1094/AACCIntMethod-54-40.02>, 1999.

AUTIO, K.; KRUUS, K.; KNAAPILA, A.; GERBER, N.; FLANDER, L.; BUCHERT, J. Kinetics of transglutaminase-induced cross-linking of wheat proteins in dough. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1039–1045, 2005.

BAGAGLI, M. P.; JAZAERI, S.; BOCK, J. E.; SEETHARAMAN, K.; SATO, H. H. Effect of transglutaminase, citrate buffer, and temperature on a soft wheat flour dough system. **Cereal Chemistry**, v. 91, n. 5, p. 460–465, 2014.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2007.

BAUER, N.; KOEHLER, P.; WIESER, H.; SCHIEBERLE, P. Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat . I . Biochemical analysis. **Cereal Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 781–786, 2003.

BLOMFELDT, T. O. J.; KUKTAITE, R.; PLIVELIC, T. S.; RASHEED, F.; JOHANSSON, E.; HEDENQVIST, M. S. Novel freeze-dried foams from glutenin- and gliadin-rich fractions. **RSC Advances**, v. 2, n. 16, p. 6617, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ra20946b>>.

CERESINO, E. B.; DE MELO, R. R.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M. S.; ZUCCHI, T. D.; JOHANSSON, E.; SATO, H. H. Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. **Food Chemistry**, v. 241, p. 403–410, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617314668>>. Acesso em: 12 set. 2017.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 612–618, 2007.

DURAN, R.; JUNQUA, M.; SCHMITTER, J. M.; GANCET, C.; GOULAS, P. Purification, characterization, and gene cloning of transglutaminase from *Streptoverticillium cinnamoneum* CBS 683.68. **Biochimie**, v. 80, n. 4, p. 313–319, 1998.

FÆRGEMAND, M.; QVIST, K. B. Transglutaminase: effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 3, p. 287–292, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X97800586>>.

FOLK, J. E.; COLE, P. W. Transglutaminase: mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 122, n. 2, p. 244–264, 1966.

GUPTA, R. B.; KHAN, K.; MACRITCHIE, F. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. **Journal of Cereal Science**, v. 18, n. 1, p. 23–41, 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521083710313>>.

HUSSAIN, A.; LARSSON, H.; KUKTAITE, R.; PRIETO-LINDE, M. L.; JOHANSSON, E. Towards the understanding of bread-making quality in organically grown wheat: Dough mixing behaviour, protein polymerisation and structural properties. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 3, p. 659–666, 2012.

JOHANSSON, E.; KUKTAITE, R.; ANDERSSON, A.; PRIETO-LINDE, M. L. Protein polymer build-up during wheat grain development: Influences of temperature and nitrogen timing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2005.

JOHANSSON, E.; MALIK, A. H.; HUSSAIN, A.; RASHEED, F.; NEWSON, W. R.; PLIVELIC, T.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; KUKTAITE, R. Wheat gluten polymer structures: The impact of genotype, environment, and processing on their functionality in various applications. **Cereal Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 367–376, 2013.

KIELISZEK, M.; MISIEWICZ, A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. **Folia Microbiologica**, v.59, n.3, p. 241-250, 2014.

KUKTAITE, R.; NEWSON, W. R.; RASHEED, F.; PLIVELIC, T. S.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Monitoring nanostructure dynamics and polymerization in glycerol plasticized wheat gliadin and glutenin films: relation to mechanical properties. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 6, p. 2998–3007, 2016.

LARRÉ, C.; DENERY-PAPINI, S.; POPINEAU, Y.; DESHAYES, G.; DESSERME, C.; LEFEBVRE, J. Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 121–127, 2000.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 618–626, 2007.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. A comparative biochemical characterization of microbial transglutaminases: Commercial vs. a newly isolated enzyme from *Streptomyces* sp. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 308–314, 2010.

MALIK, A. H.; KUKTAITE, R.; JOHANSSON, E. Combined effect of genetic and environmental factors on the accumulation of proteins in the wheat grain and their relationship to bread-making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 2, p. 170–174, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2012.09.017>>.

MELO, R. R. de. **Produção e caracterização bioquímica de uma nova transglutaminase microbiana**. Faculdade de Universidade Estadual de Campinas, 2013.

MARX, C. K.; HERTEL, T. C.; PIETZSCH, M. Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat-sensitive variants. **Journal of Biotechnology**, v. 136, n. 3–4, p. 156–162, 2008.

RASHEED, F.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; PLIVELIC, T. S.; JOHANSSON, E. The use of plants as a “green factory” to produce high strength gluten-based materials. **Green Chemistry**, v. 18, 2016. Disponível em: <www.rsc.org/greenchem>.

RASHEED, F.; NEWSON, W. R.; PLIVELIC, T. S.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Structural architecture and solubility of native and modified gliadin and glutenin proteins: non-crystalline molecular and atomic organization. **The Royal Society of Chemistry**, v. 15, n. 31, p. 13032–7, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817591>>.

RASHEED, F.; NEWSON, W. R.; PLIVELIC, T. S.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Macromolecular changes and nano-structural arrangements in gliadin and glutenin films upon chemical modification. Relation to functionality. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 151–159, 2015b.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 313–340, 1966.

STEFFOLANI, M. E.; PÉREZ, G. T.; RIBOTTA, P. D.; PUPPO, M. C.; LEÓN, A. E. Effect of transglutaminase on properties of glutenin macropolymer and dough rheology. **Cereal Chemistry**, v. 85, n.1, p. 39-43, 2008.

VOLKEN DE SOUZA, C. F.; GUIMARÃES VENZKE, J.; HICKMANN FLÔRES, S.; ZÁCHIA AYUB, M. A. 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, 2011.

WASHIZU, K.; ANDO, K.; KOIKEDA, S.; HIROSE, S.; MATSUURA, A.; TAKAGI, H.; MOTOKI, M.; TAKEUCHI, K. Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 1, p. 82–87, 1994. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1992/58/1/58_1_82/_pdf>.

WIKSTRÖM, K.; BOHLIN, L. Multivariate analysis as a tool to predict bread volume from mixogram parameters. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 686–690, 1996.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 447–454, 2004.

ZHANG, D.; YANG, Z. H. U.; CHEN, J. Microbial transglutaminase production: Understanding the mechanism. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 26, n. January, p. 205–222, 2009. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77749268141&partnerID=40&md5=76486551615f94b81437a22e4f3afac9>>.

CAPÍTULO 3**IMPACTO DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO DO GLÚTEN E DA FONTE DE
TRANSGLUTAMINASE NAS PROPRIEDADES DA MASSA DE GLÚTEN**

Artigo a ser submetido para publicação na revista Food Hydrocolloids de autoria de
Elaine Berger Ceresino, Ramune Kuktaite, Hélia Harumi Sato,
Mikael S. Hedenqvist, Eva Johansson.

Resumo

A produção de glúten de trigo com o objetivo de obter diferentes materiais proteicos tem aumentado. No entanto, o procedimento de separação do glúten pode ser um fator impactante da qualidade deste na elaboração de subprodutos. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do processo de separação do glúten de trigo na qualidade de massas à base de glúten considerando (1) a extração branda (EB) ou (2) a extração severa (ES) do glúten, da fonte e da concentração da enzima TG nas propriedades de mistura da massa, estrutura proteica e solubilidade. Condições brandas de separação do glúten, ou seja, lavagem manual da massa e secagem por liofilização, resultaram em melhores propriedades de desenvolvimento da massa. Apesar da separação do glúten em condições severas, em que se utilizam temperaturas mais elevadas de secagem, resultar na aglomeração das proteínas, ambos os tipos de glúten apresentaram o mesmo grau de polimerização no tempo ótimo de desenvolvimento. O processo de mistura promoveu rearranjos entre as ligações dissulfeto pré-existentes possibilitando que eventuais restrições ao estabelecimento de novas interações fossem superadas. O grau de polimerização nas massas preparadas com o glúten obtido do processo brando aumentou devido a presença das TGs, sendo mais pronunciado em massas tratadas com SB6. Este estudo mostrou que além da fonte de TG, o processo de separação do glúten pode direcionar diferentes funcionalidades nas massas.

1. Introdução

O glúten é definido como um material visco-elástico obtido após a lavagem branda do amido e outros componentes solúveis da farinha de trigo sob uma corrente de água em condições não industriais, ou seja, manualmente. O glúten é composto principalmente de duas proteínas de armazenamento do trigo, a glutenina e a gliadina, que estão presentes em quantidades similares e determinam a força e extensibilidade da massa (SHEWRY et al., 2002; WIESER, 2007). O glúten pode ser obtido industrialmente por diferentes métodos de extração que consistem, geralmente, em uma etapa úmida de separação da farinha de trigo em amido e glúten, sendo que o processo é concluído com a etapa de secagem (VAN DER BORGHT et al., 2005). Na produção industrial de glúten, elevadas forças de cisalhamento e baixos valores de pH são condições severas que normalmente são utilizadas para se obter o glúten em pó e podem limitar a posterior polimerização proteica quando aplicada em alimentos (RASHEED et al., 2015a). As etapas de secagem são consideradas as mais críticas devido a dois fatores: (i) desnaturação proteica em temperaturas elevadas utilizadas durante a secagem e (ii) deterioração do glúten quando hidratado como resultado da ação de enzimas proteolíticas (ORTOLAN et al., 2017). Portanto, é de interesse da indústria de alimentos minimizar condições severas de processamento para se garantir as propriedades visco-elásticas adequadas do glúten de trigo em diversas aplicações.

As propriedades dos polímeros de glúten são determinantes para o comportamento da mistura da massa e qualidade do pão e são responsáveis por interessantes propriedades tecnológicas. As proteínas do glúten interagem e reorganizam-se em um polímero quando são misturadas com água e submetidas ao processo de mistura (JOHANSSON et al., 2013). As proteínas interagem através da formação de ligações dissulfeto e outras ligações não covalentes que proporcionam as propriedades viscoelásticas únicas da massa (KUKTAITE; LARSSON; JOHANSSON, 2004). No tempo ótimo de desenvolvimento da massa, encontra-se estabelecida uma complexa rede proteica entre as cadeias de proteínas do glúten (SHEWRY et al., 2002). Em várias aplicações, o aumento da polimerização é desejável e está positivamente correlacionado com melhores propriedades

mecânicas e funcionais dos produtos (RASHEED et al., 2015a; BRUYNINCKX et al., 2016).

A transglutaminase (TG, E.C. 2.3.2.13) catalisa a reação entre um grupo γ -carboxiamida de uma glutamina e o grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina, resultando numa ligação isopeptídica, ϵ -(γ -glutamil)lisina. Diversos estudos mostram que as TGs podem eficazmente ligar proteínas em uma variedade de alimentos, destacando-se sua utilização em substratos como caseínas e lactoglobulinas, globulinas de soja, proteínas miofibrilares entre outras. Desta forma, o uso da TG para modificar produtos cárneos, lácteos e cereais tem se consolidado na indústria de alimentos (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004; GASPAR; DE GÓES-FAVONI, 2015). A adição de transglutaminase de *Streptomyces mobaraensis* em farinha de trigo cresceu em popularidade por promover a formação de ligações cruzadas entre cadeias proteicas do glúten e conseqüentemente, melhorar as propriedades de produtos de panificação (BASMAN; KÖKSEL; NG, 2002; STEFFOLANI et al., 2010). Desde 1989, novas linhagens bacterianas produtoras de TG do gênero *Streptomyces* foram isoladas ou modificadas, produzindo TGs com características diversas. As novas TGs melhoram, por exemplo, as propriedades de produtos como bacon (JIN et al., 2016), sistemas de caseinato de sódio (MACEDO et al., 2010), massas de farinha de trigo e foram utilizadas para unir as cadeias de glutenina do trigo em um sistema-modelo de massa de glutenina (CERESINO et al., 2018). A possibilidade de melhorar o rendimento na produção de TGs via processos fermentativos, e a obtenção de TGs com variadas funcionalidades (KIELISZEK; MISIEWICZ, 2014) revelaram o potencial desta enzima em oferecer possíveis soluções para processos industriais já existentes. A capacidade da TG de formar ligações cruzadas entre proteínas pode ser influenciada por modificações dos resíduos de glutamina e lisina do glúten do trigo durante o processamento (WANG et al., 2007; BAGAGLI et al., 2014), portanto é de interesse investigar como o pré-processamento do glúten de trigo pode limitar o acesso aos aminoácidos envolvidos nas ligações isopeptídicas catalisadas pelas TG (RASHEED et al., 2015a) uma vez que os trabalhos na literatura que considerem estes aspectos são escassos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da severidade do tratamento da separação do glúten na força da massa, e em suas propriedades químicas e estruturais; e também analisar o efeito das TGs de duas diferentes

linhagens de estreptomicetos em diferentes concentrações nas funcionalidades da massa de glúten obtidos por ambos os processos.

2. Material e Métodos

A TG comercial, Biobond™ TG-M (TG comercial), foi gentilmente fornecida pela Shanghai Kinry Food Ingredients Co. (China) e apresentou uma atividade de $109,9 \text{ U g}^{-1}$. A SB6 apresentou atividade enzimática de $516,2 \text{ U g}^{-1}$ e sua obtenção foi realizada conforme descrito por CERESINO et al. (2018). As atividades enzimáticas foram determinadas segundo o teste do hidroxamato (FOLK; COLE, 1966) com pequenas modificações (MACEDO; SETTE; SATO, 2007).

Fosfato monobásico de sódio e ácido trifluoroacético (TFA) foram adquiridos da Merck (Alemanha). A ureia e o dodecilsulfato de sódio (SDS) foram fornecidos pela Duchefa Biochemie (Holanda). O isopropanol foi adquirido da Honeywell, Alemanha. Todos os produtos químicos utilizados eram de grau analítico. A água foi purificada por um sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, EUA). Acetonitrila de grau cromatográfico foi adquirida da VWR BDH Prolabo (VWR Chemicals, Suécia), assim como ditioneitol (DTT).

O efeito de duas preparações de transglutaminase, TG comercial e SB6, em diferentes concentrações foram avaliados como aditivos na massa à base de glúten de trigo. A massa de glúten de trigo foi preparada a partir de dois tipos de glúten, extração branda (EB) e severa (ES) em referência a severidade do tratamento aplicado na separação do glúten, de acordo com RASHEED et al. (2015).

A farinha de trigo (Extrabagerivetemjöl) foi adquirida da Farina AB (Lilla Harrie, Suécia) e o glúten EB foi extraído aplicando o procedimento de lavagem da farinha de trigo para retirada do amido segundo o procedimento da AACCC (38-10) modificado for RASHEED et al. (2015). Assim, a farinha de trigo (~ 30 g) foi envolvida em um pano e lavada sob uma corrente de água destilada a temperatura ambiente de aproximadamente $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o tempo necessário para a remoção do amido. O glúten ES (RASHEED et al., 2015a) foi adquirido da Lantmännen Reppe AB (Lidköping, Suécia). No processo industrial, um secador em anel com temperatura de saída de aproximadamente $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ foi utilizado, de acordo com informações do fabricante. Ambos os tipos de glúten foram congelados a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizados (Cool Safe™, Scanvae, Dinamarca), moídos em um moinho analítico

(IKA A10, IKA-Werke) e mantidos sobre gel de sílica em um dessecador antes das análises.

2.1. Preparo das massas de glúten e propriedades reológicas das massas.

As massas de glúten EB e ES foram preparadas utilizando um equipamento ReoZmixer (Bohlin Reologi AB, Lund, Suécia), com duas hélices co-rotativas como elementos de mistura (Figura 3.1 a, indicado pela seta).

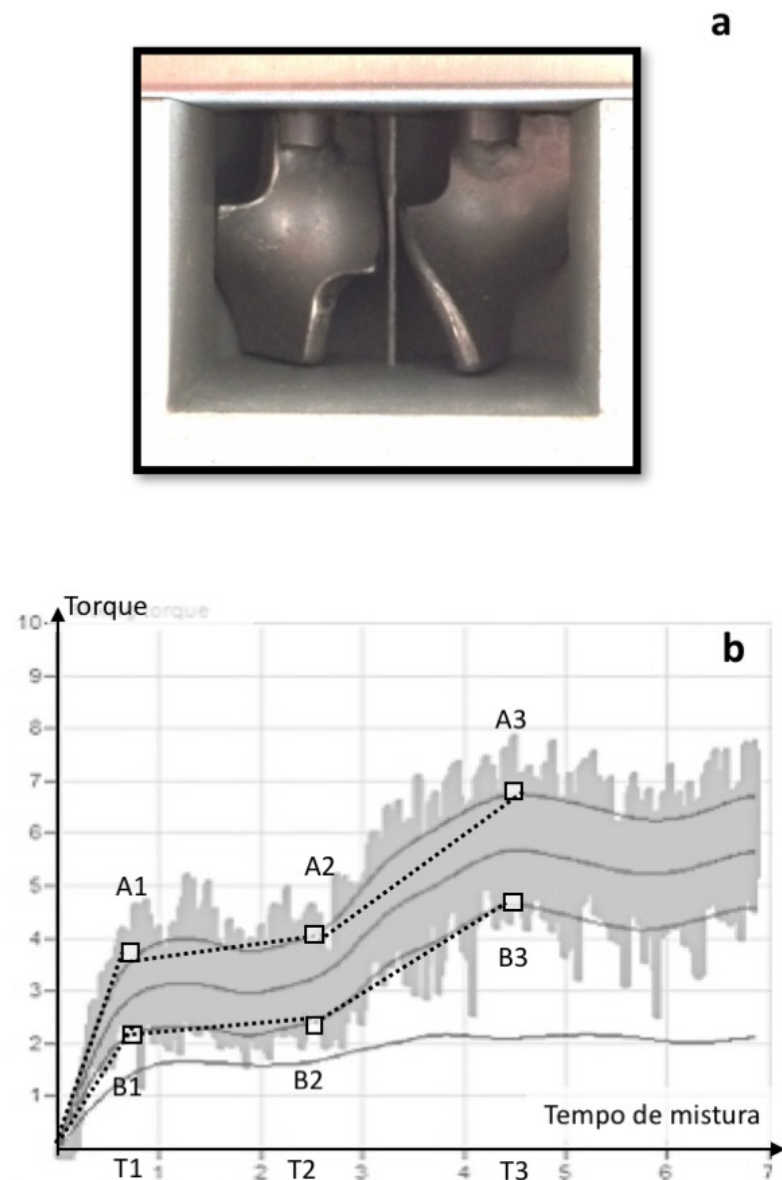


Figura 3.1 - (a) Unidade de mistura do ReoZmixer para glúten de trigo, (b) curva mixográfica

Tabela 3.1 – Parâmetros de mistura para massas de glúten de trigo adaptados do mixógrafo para farinha.

Parâmetros	Definição
<i>IHTP</i>	Área sob a curva
<i>initial slope</i>	A1/T1
<i>initial build up</i>	A2-A1
<i>initial width</i>	A1-B1
<i>time 1-2</i>	T2-T1
<i>build-up</i>	A3-A2
<i>peak time</i>	T3
<i>peak width</i>	A3-B3
<i>peak height</i>	A3

A TG dissolvida em 6,4 mL de água ultrapura foi adicionada a cada tipo de glúten (4,5 g) nas seguintes concentrações, 0 (controle), 0,87 e 1,73 U g⁻¹. A mistura da massa de glúten foi realizada a 63 rpm, 26 °C até o tempo ótimo de desenvolvimento da massa, isto é, o tempo necessário para que a curva do mixógrafo alcance a altura máxima (MARTINANT et al., 1998; WIESER; KIEFFER, 2001). As amostras de massa resultante foram imediatamente transferidas para um ultracongelador (-80 °C). As amostras foram liofilizadas durante aproximadamente 72 h (Cool Safe™, Scanvae, Dinamarca) e moídas usando um moedor analítico (linha amarela, A10, IKA-Werke, Staufen, Alemanha) e utilizado nas análises posteriores.

O total de 9 parâmetros foram selecionados a partir da curva do mixógrafo e utilizados para avaliar o desenvolvimento do glúten: *IHTP*, *initial slope*, *initial build up*, *initial width*, *time 1-2*, *build-up*, *peak time*, *peak width* and *peak height*, de acordo com as recomendações do fabricante do ReoZmixer (Bohlin Reologi AB, Lund, Suécia) calculados conforme indicado na Figura 3.1. Uma curva típica obtida com ReoZmixer são mostradas na Tabela 3.1. Por convenção, os termos referentes aos parâmetros avaliados segundo WIKSTRÖM e BOHLIN (1996) terão sua nomenclatura usual em inglês utilizada ao longo deste trabalho, exceto os termos

peak time e *peak height* traduzidos segundo GUARIENTI (1993) como tempo (ótimo) de desenvolvimento e altura de desenvolvimento, respectivamente.

2.2. Análise da distribuição proteica por tamanho por SE-HPLC (exclusão por tamanho)

A quantificação das proteínas do glúten e sua distribuição por tamanho foram estudadas por meio de SE-HPLC de acordo com RASHEED et al., (2015a) com pequenas modificações. A extração das proteínas das massas à base de glúten em microtubos de 2 mL contendo 16,5 mg de amostra foi realizada adicionando-se 1,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,9 e contendo 0,5% SDS (m/v), seguindo três etapas sequenciais. Na primeira etapa, as proteínas solúveis em tampão de fosfato/SDS foram extraídas agitando as amostras durante 10 s em vortex (Labassco, Whirli VIB 2), seguido de agitação durante 5 min a 2.000 rpm (IKA-VIBRAX VXR, Staufen, Alemanha) e centrifugação dos tubos por 30 min a 12.500 rpm (Sorvall, Legend Micro 17, Thermo Scientific, Alemanha). O sobrenadante foi recolhido para a análise em SE-HPLC (Ex1), e as proteínas presentes no precipitado foram extraídas após a sonicação (amplitude de 5 μ m, 23 KHz, 30 s) por meio de um sonicador de haste Sanyo Soniprep (Tamro, Suécia) (Ex2). A sonicação foi repetida no terceiro passo com tempo adicional (30 + 45 s) (Ex3). Os sobrenadantes foram submetidos à análise em sistema de HPLC (módulo de separação Waters 2690) com detector de arranjo de diodos, Waters 996, (Waters, EUA). A separação foi realizada em coluna de exclusão molecular (Biosep-SEC-S 4000, Phenomenex, EUA) utilizando como fase móvel 50% acetonitrila, 0,1% TFA; 50% H₂O, 0,1% de TFA, com fluxo isocrático e injeção automática de 20 μ L da amostra. A vazão foi ajustada em 0,2 mL/min. A resposta do detector foi registrada a 210 nm. O cromatograma foi dividido em duas regiões que foram integradas em dois grupos arbitrários de acordo com o tempo de eluição das proteínas (Empower Pro, Waters, EUA). As proteínas que eluíram entre 9 a 14 min foram designadas como proteínas poliméricas (PP) e entre 14-20 min foram denominadas proteínas monoméricas (MP). As áreas de cada cromatograma foram normalizadas de acordo com cada tipo de glúten.

2.3 Análise da solubilidade proteica por RP-HPLC (fase reversa)

As massas à base de glúten foram analisadas quanto à hidrofobicidade proteica como descrito por KUKTAITE et al. (2016). Para a análise, 40 mg de cada amostra foram tratadas com 1 mL de solvente. As primeiras três extrações alcoólicas, (1) 70% etanol, agitação a 2.000 rpm em agitador de tubos (IKA-VIBRAX VXR, Staufen, Alemanha) durante 30 min à temperatura ambiente; (2) 50% propanol, agitação a 2.000 rpm durante 30 min no mesmo agitador, temperatura ambiente; (3) 50% propanol, mantido estático em um forno a 60 °C durante 30 min; visaram extrair proteínas monoméricas e poliméricas não ligadas. A adição de SDS à solução nº 4 (0,5% de SDS, 50% de propanol, 30 min, 60 °C, estático) visaram romper as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e as interações hidrofóbicas. A extração nº 5 (DTT 1%, propanol 50%, extraído a 60 °C durante 30 min, estático) e a extração nº 6 (DTT 1%, SDS 0,5%, solução de ureia 6 M, 100 °C durante 5 min, estático) visaram a redução das ligações dissulfeto intra e intermoleculares. Cada etapa de extração foi seguida de centrifugação (15.000 x g; 30 min; Sorvall Legend Micro 17 Centrifuge, Thermo Scientific, Alemanha) e os sobrenadantes foram recolhidos para análise por RP-HPLC.

A separação de proteínas foi conduzida em um módulo de separação Waters (modelo 2690) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) Waters (modelo 996) em um sistema RP-HPLC equipado com uma pré-coluna (5 µm, 2 cm × 4,0 mm, Discovery Bio Wide, Supelco), coluna C8 (5 µm 25 cm × 4,6 mm, Discovery Bio Wide, Supelco) mantida a 70 °C.

Para a eluição das proteínas foram utilizados dois solventes de eluição; um gradiente de 28-72% em 25 min (acetonitrila – 0,1% ácido trifluoroacético e água ultrapura – 0,1% ácido trifluoroacético) a um fluxo de 0,8 mL/min foi utilizado para a eluição das proteínas. A fase móvel inicial consistindo de 28% do solvente A (acetonitrila de grau cromatográfico contendo 0,1% de ácido trifluoroacético) e 72% do solvente B (água ultrapura contendo 0,1% de ácido trifluoroacético) foi programada para alcançar 56% de A e 44% de B em 30 min, 90% de A e 10% de B em 35 min, e manter esta proporção até atingir 40 min. Após 45 min, o sistema foi re-equilibrado com as condições iniciais e todas as amostras foram injetadas automaticamente. Os cromatogramas foram adquiridos e processados a 210 nm.

2.4. Estrutura secundária das proteínas presentes nas massas de glúten determinada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

As amostras de glúten liofilizadas foram mantidas em um dessecador sobre um gel de sílica durante 48 horas. Dezesesseis varreduras de cada amostra foram registradas usando o espectrômetro Spectrum 2000 FTIR (Perkin-Elmer Inc. USA) equipado com acessório ATR de reflexão única (Golden Gate, Speac Ltd., Inglaterra). Os resultados foram analisados na faixa entre 1580 e 1700 cm^{-1} .

2.5. Análises estatísticas

O sistema de análise estatística v. 8 (SAS Institute, Cary, NC) foi utilizado para análises de dados. Os dados foram avaliados utilizando desvios padrão, análise de correlação de classificação de Spearman, análise de variância (ANOVA) e análise de componentes principais (PCA). O modelo linear geral (GLM) foi realizado para revelar diferenças entre as amostras após a análise SE-HPLC. As diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste Duncan Post-Hoc ($p < 0,05$). Para explicar a proporção da contribuição de variação pelo tipo de glúten usado, tipo de preparação enzimática e quantidade de enzima nos parâmetros de mixografia avaliados, foram realizadas análises de regressão (MALIK; KUKTAITE; JOHANSSON, 2013; MOREIRA-ASCARRUNZ et al., 2016).

3. Resultados e discussão

3.1 Efeito do tipo de glúten na qualidade funcional da massa – força, polimerização e solubilidade

O tipo de glúten extraído por condições brandas (EB) ou severa (ES), representou mais de 40% da variação para cada um dos parâmetros avaliados pelo mixógrafo (Tabela 3.2). O tempo e a altura de desenvolvimento da massa são os dois parâmetros do mixógrafo mais usados para avaliar a força do glúten (MARTINANT et al., 1998; WIESER; KIEFFER, 2001), sendo que 45,1% e 40,6% da variação dos parâmetros tempo (*peak time*), e altura de desenvolvimento (*peak width*) podem ser explicados pelo tipo de glúten obtido por extração branda (EB) ou

severa (ES). Com base nos resultados de desenvolvimento da massa, os resultados sugerem que as condições de extração branda ou severa afetam de forma significativa as propriedades de mistura do glúten.

Tabela 3.2 - Porcentagem de explicação (coeficiente de determinação da regressão linear simples) dos parâmetros de mistura.

	Tipo de glúten	Fonte de enzima	Concentração de enzima	Tratamento
<i>IHTP</i>	41,2	14,4	20,7	62,3
<i>inithslope</i>	65,4	17,8	9,37	83,5
<i>Initial build up</i>	55,0	9,54	7,92	64
<i>Initial width</i>	66,1	18,5	8,99	84,8
<i>time 1-2</i>	45,2	9,84	19,1	60,6
<i>Buildup</i>	47,7	9,03	10	59,2
tempo (ótimo) de desenvolvimento	45,1	9,81	18,4	60,2
<i>Peak width</i>	78,2	2,54	0,01	70
altura de desenvolvimento	40,6	19,2	13,3	63,9

O glúten EB apresentou valores médios mais altos para todos os parâmetros de qualidade do glúten (Tabela 3.3), exceto para *initial build up* em comparação com o glúten ES indicando que os pontos de hidratação no glúten extraído em condição severa estão menos expostos para interagir com a água.

Tabela 3.3- Médias dos valores dos parâmetros de qualidade do glúten de acordo com o (A) tipo de glúten, (B) fonte de enzima e (C) concentração enzimática

	<i>IHTP</i>	<i>initial slope</i>	<i>initial build up</i>	<i>initial width</i>	<i>time 1-2</i>	<i>Build up</i>	Tempo desenv.	<i>peak width</i>	Altura desenv.
A. Tipo de glúten									
EB	21,9a	7,29a	0,00b	1,24a	2,79a	3,72a	6,08a	2,34a	6,20a
ES	16,9b	4,78b	1,45a	0,76b	2,33b	2,71b	5,17b	2,05b	5,52b
B. Fonte de enzima									
Comercial	20,6a	6,57a	1,09a	1,10a	2,65a	3,40a	5,80a	2,21a	6,05a
SB6	17,6b	5,24b	0,48b	0,84b	2,43b	2,95b	5,36b	2,16a	5,58b
C. Conc. de enzima (U/g)									
0	22,7a	6,70a	0,42b	1,11a	2,83a	3,56a	6,15a	2,20a	6,23a
0,87	19,5b	6,26a	0,51b	1,05a	2,58b	3,31a b	5,65b	2,19a	5,85b
1,73	17,7b	5,48b	1,09a	0,89b	2,42b	2,95b	5,34b	2,19a	5,68b

Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças significativas a $p < 0,05$ pelo teste de Duncan.

A análise dos componentes principais (PCA) (Figura 3.2) também evidenciou que o tipo de glúten é determinante nas diferenças observadas entre os parâmetros avaliados pelo mixógrafo. Valores mais elevados em todos os parâmetros da curva mixográfica, com exceção do parâmetro *initial build up*, obtidos durante a mistura de EB, direcionou a separação do escores. Dentro do PCA, os dois primeiros componentes explicaram 67,5% (PC1 explicou 44,1%, PC2 explicou 23,4%) da variação total, com o tipo de glúten, bem como parâmetros de mixografia, diferenciados ao longo do primeiro componente principal. As amostras de glúten brando (Figura 3.2a) permaneceram no lado positivo do PC1, juntamente com os parâmetros do mixógrafo, exceto o parâmetro *initial build up* (Figura 3.2b). As amostras de glúten ES (Figura 3.2a) e a *initial build up* (Figura 3.2b) foram, em vez disso, deslocadas no sentido inverso ao longo da PC1. Além disso, a correlação de Spearman (ANEXO A) mostrou uma correlação significativa e positiva entre todos os parâmetros do mixógrafo, exceto para a *initial build up*, que se mostrou negativamente correlacionado com os demais parâmetros ($p < 0,01$).

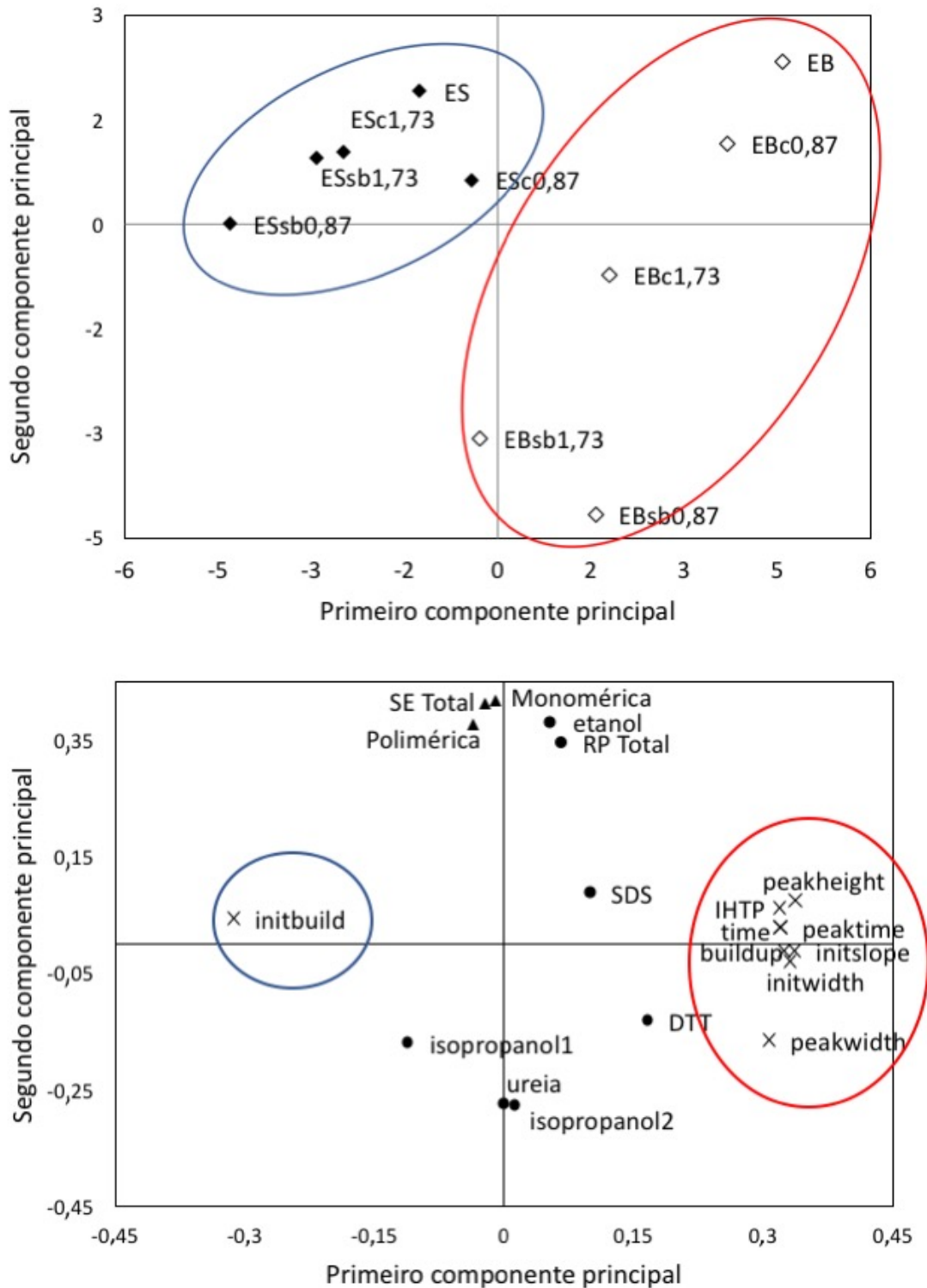


Figura 3.2 – Plotagem do gráfico de escores (A) e do gráfico de *loadings* (B) dos dois primeiros componentes principais (PC) para as amostras de massa de glúten: ◆, massa de glúten ES; ◇, massa de glúten EB; c: ●, solventes utilizados na solubilização das amostras e proteínas totais determinada por RP-HPLC; ▲, parâmetros avaliados e quantificação proteica por SE-HPLC; ×, parâmetros obtidos da curva mixográfica registrada durante a mistura no ReoZmixer. Sb: preparação enzimática SB6; c: TG comercial.

Estudos anteriores (RASHEED et al., 2015a) mostraram diferenças nas propriedades entre o glúten obtido por condições branda e severa. Ao contrário do glúten EB, foi relatada uma agregação substancial de proteínas no glúten ES. Essa agregação limitou a formação e intercâmbio de ligações dissulfeto e, portanto, contribuiu para a diminuição da possibilidade de interações proteína-proteína.

O presente estudo mostrou que as diferenças no material inicial (tipo de glúten) resultaram em diferentes requisitos de mistura para obter uma massa com propriedades adequadas. As diferenças significativas obtidas nos parâmetros de desenvolvimento da massa para os dois tipos de glúten são provavelmente devido aos pontos de hidratação estarem menos acessíveis no glúten extraído em condição severa, uma vez que este se encontra mais agregado. Uma hidratação mais fácil, em conjunto com uma maior disponibilidade dos aminoácidos para promover intercâmbios proteína-proteína, são fatores essenciais para possibilitar o desenvolvimento adequado da massa durante a mistura (NAWROCKA et al., 2017). O glúten obtido após a extração, que ainda é capaz de formar uma rede com propriedades visco-elásticas é definido como "glúten vital", o que implica que ainda possui funcionalidade. Por outro lado, o fracionamento severo de grãos inteiros muitas vezes "desvitaliza" o glúten (VAN DER BORGHT et al., 2005). Assim, os aminoácidos facilmente acessíveis no glúten separado da farinha de trigo por um processo brando favorecem o estabelecimento de uma estrutura proteica vital, ou seja, menos agregada e mais disponível para a interação entre os grupos funcionais da proteína, resultando em valores de tempo e altura de desenvolvimento mais elevados (Tabela 3.3).

Uma vez que o tamanho e a complexidade dos polímeros de proteína de glúten medidos por SE-HPLC estão correlacionados com a resistência do glúten à mistura (GUPTA; KHAN; MACRITCHIE, 1993; RAM et al., 2005), os resultados ilustrados na Figura 3.3 a-c (sem enzima) indicam que no tempo ótimo de mistura da massa, não foram encontradas diferenças significativas na distribuição de tamanho entre os dois tipos de massa à base de glúten. O fato de os dois tipos de glúten se comportarem de forma diferente durante o desenvolvimento da massa, mas apresentarem quantidade e tamanho de proteínas equivalentes no tempo ótimo de mistura, revelam o papel importante da mistura na promoção de rearranjos adequados de moléculas de proteínas. Os resultados indicam que diferentes tipos

de glúten como material inicial têm potencial para formar uma matriz de glúten com uma rede de proteína semelhante após ser submetida às forças de cisalhamento proporcionados pelo processamento. A mistura de massa é bem conhecida por mudar a estrutura do polímero de proteína de glúten por meio de rearranjos intra e intermoleculares (VAN DER BORGHT et al., 2005; JOHANSSON et al., 2013).

Diferentemente do presente estudo, mostrando que diferentes tipos de glúten podem resultar em propriedades similares após a mistura, um estudo anterior (RASHEED et al., 2015a) mostrou que a moldagem por compressão de filmes dos diferentes tipos de glúten resultou em filmes com propriedades muito distintas. Assim, o processo de mistura, contribuindo com a hidratação proteica, com a formação de ligações cruzadas e o desenvolvimento da rede visco-elástica, tem a capacidade de superar as limitações de qualidade do glúten extraído em condições severas já pré-polimerizado, durante a separação industrial.

3.2. Efeito da fonte de enzima nas propriedades da massa

Neste estudo 3-19% da variação encontrada entre os parâmetros do mixógrafo (por exemplo, altura de desenvolvimento 19,2%, *initial slope* 17,8% e IHTP 14,4%; Tabela 3.2) pode ser explicada pelo tipo de TG (TG comercial ou SB6). Entretanto, a adição de TG comercial resultou em valores significativamente mais elevados (exceto *peak width*) quando comparado com o efeito da SB6 (Tabela 3.2). Os dados registrados no mixograma são resultado da interação entre a massa e as forças exercidas pelo equipamento durante a mistura (BRABEC; SHOGREN; ROUSSER, 2002) e, conseqüentemente, valores mais elevados nos parâmetros mixográficos são considerados uma indicação de uma massa mais forte (BRABEC; SHOGREN; ROUSSER, 2002; KUKTAITE; LARSSON; JOHANSSON, 2004; LI et al., 2017). Assim, neste estudo, adições de TG comercial resultaram em uma massa mais forte do que a adição de SB6, embora as diferenças na rede proteica pareçam desaparecer quando as massas foram misturadas até o tempo ótimo de desenvolvimento conforme indicado pelos valores semelhantes de *peak width*. Os resultados de SE-HPLC mostraram que a extractabilidade das proteínas das massas de glúten EB foi reduzida devido à adição da enzima, especificamente da SB6, enquanto não foi observada diferença significativa no glúten ES (Figura 3.3).

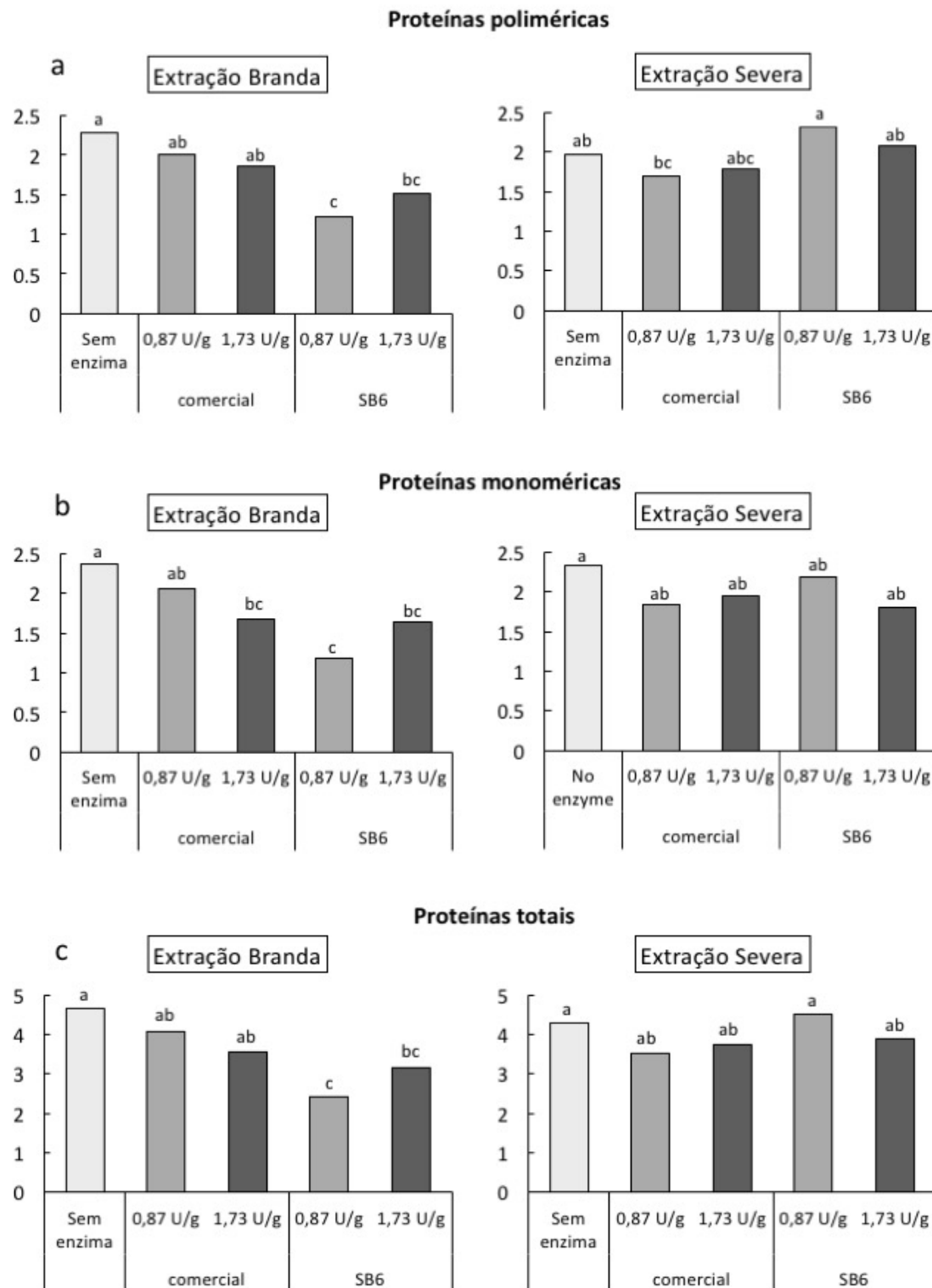


Figura 3.3 - Distribuição das proteínas das massas do glúten extraídas em condições branda (EB) e severa (ES) tratadas com TG comercial e SB6; separadas por tamanho após três extrações por SE-HPLC: (a) Proteínas poliméricas, (b) proteínas monoméricas, (c) proteínas totais. Valores com diferentes letras são significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$).

A redução da extractabilidade devido à adição da TG, especificamente SB6, em glúten EB sugere o desenvolvimento de uma rede proteica mais reticulada do que ocorre nos outros tratamentos. O fato de a TG não influenciar a extractabilidade das proteínas no glúten ES é, provavelmente, devido à existência de uma estrutura pré-reticulada no material de origem, restringindo o acesso da TG à estrutura proteica durante os estágios iniciais da mistura da massa à base de glúten de trigo. A importância da disponibilidade dos aminoácidos glutamina e lisina para a TG, foi previamente discutida mostrando que o resíduo de lisina nas subunidades de glutenina de baixa massa molecular está localizado próximo ao carbono terminal da cadeia polipeptídica. O resíduo de cisteína próximo a lisina pode bloquear este resíduo para a catálise pela TG devido a ligações dissulfeto intramoleculares que se formam nesta região. Além disto, nas condições de baixas concentrações de lisina ou sua ausência, ácido glutâmico é formado após a ação da TG nas reações de desaminação dos grupos carboxiamida na glutamina (BRZOZOWSKI, 2016).

A combinação dos resultados do mixógrafo e os dados obtidos por meio das análises de SE-HPLC, indicam que a adição de TGs modificam significativamente o desenvolvimento da rede proteica no glúten EB. SB6 contribui menos intensamente no início da mistura da massa do que a enzima comercial, entretanto, no tempo ótimo de desenvolvimento a SB6 apresenta o maior efeito conforme demonstrado pela polimerização mais elevada. A perda de extensibilidade e aumento dos valores dos parâmetros de força foram descritos anteriormente (AUTIO et al., 2005).

Os resultados de RP-HPLC mostraram um decréscimo na extração das proteínas (valor de proteínas totais) bem como nas proteínas extraídas na etapa 1 (etanol 70%) e 2 (isopropanol 50%) na massa de glúten EB com adição de SB6 quando comparado ao perfil de solubilidade das demais amostras. As extrações alcoólicas são conhecidas por solubilizar as proteínas monoméricas que não estão covalentemente ligadas a outras moléculas de proteínas (HERSKOVITS; GADEGBEKU; JAILLET, 1970; KUKTAITE et al., 2016). Assim, a diminuição da quantidade de proteínas extraídas nas etapas 1 e 2 nas amostras de glúten EB com SB6 indicam que as proteínas monoméricas (gliadinas) estão incorporadas na rede polimérica juntamente com as gluteninas. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostram que a SB6 é responsável por aumentar a inclusão de gliadinas no polímero de glúten (CERESINO et al., 2018). Assim, a incorporação

de gliadinas, por terem um efeito plasticizante nas propriedades visco-elásticas das massas quando presentes nos polímeros de glutenina, pode ser um dos fatores que diferenciam o impacto de diferentes TGs nas propriedades da massa. Entretanto, a diminuição na extractabilidade total das proteínas também indicam a formação de ligações isopeptídicas ou irreversíveis nas massas de glúten EB tratadas com SB6. A formação de tais ligações em estudos anteriores mostrou contribuir negativamente para a qualidade e força de filmes à base de glúten (KUKTAITE et al., 2016).

3.3 Efeito da concentração de enzima TG nas propriedades da massa

Cerca de 20% da variação nos diversos parâmetros do mixógrafo avaliados pode ser explicado pela quantidade de enzima adicionada nas massas a base de glúten, como por exemplo 20,7% para IHTP, 18,4% para o tempo de desenvolvimento e 19,1% para *time 1-2* (Tabela 3.2). Desta forma, a magnitude do impacto da concentração de enzima foi semelhante a fonte da enzima, apesar de a importância da fonte e concentração de TG ter variado entre os parâmetros avaliados. A correlação entre os parâmetros mixográficos e as variáveis avaliadas variou para cada parâmetro, sendo positiva para alguns e negativa para outros (Tabela 3.3). A extractabilidade proteica medida tanto por SE-HPLC quanto por RP-HPLC mostrou que a concentração da enzima TG teve efeito limitado. Entretanto, a menor concentração (0,87 U/g) de SB6 em glúten EB parece ter resultado na menor extractabilidade de proteínas quando analisadas por SE-HPLC e a menor extractabilidade nas etapas 1 e 2 da extração alcoólica, indicando o maior nível de incorporação de gliadinas na rede proteica do glúten presente na massa (Figuras 3.2 e 3.3). Assim, a adição de uma concentração mais baixa de SB6 em glúten EB indica ser o tratamento mais benéfico quando uma complexa rede polimérica com a incorporação de gliadinas é desejável. Entretanto, este tratamento também resultou em maior quantidade de ligações irreversíveis. Assim, o impacto da TG na massa de trigo e na qualidade dos produtos de panificação devem ser avaliadas caso a caso para a completa elucidação dos efeitos nos diversos sistemas a base de glúten.

3.4 Análise do espectro IR para determinação da estrutura secundária

O espectro FTIR mostrado na Figura 3.4 foi avaliado na região da amida I ($1580-1700\text{ cm}^{-1}$) da qual foram extraídas as informações relativas as estruturas secundárias das proteínas das amostras avaliadas.

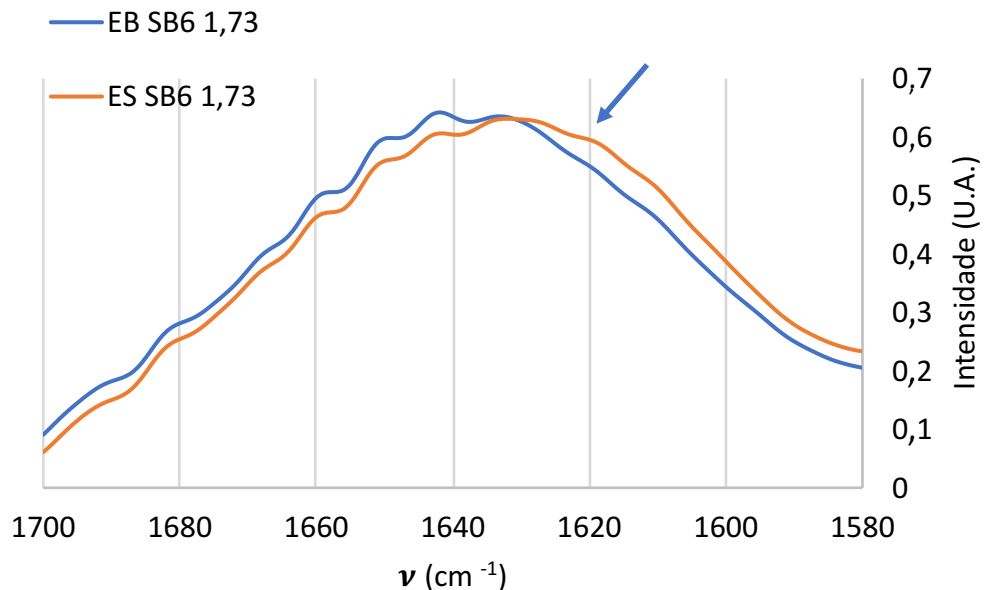


Figura 3.4 - Espectro FT-IR das massas à base de glúten extraído em condições brandas (EB) e severas (ES) tratadas com 1,73 U/g de SB6. A seta aponta para a diferença em intensidades na região de absorção a 1620 cm^{-1} (folhas- β de interação forte) entre as amostras de glúten.

A Figura 3.5 mostra os resultados obtidos da análise de componentes principais (PCA) das amostras de massa de glúten. Na representação gráfica (Fig. 3.5), cerca de 70% da variância entre as amostras foi explicada, sendo que o primeiro componente principal (PC1) explica 39,7% e o segundo componente principal PC2 explica 30,3%. A combinação dos gráficos de *loadings* e escores da PCA sugerem a separação de três grupos. Conforme mostrado na Figura 3.5, a massa de glúten ES tratada com a concentração mais elevada de SB6 está distante das demais amostras devido ao teor mais elevado de folhas- β de interação forte (1620 cm^{-1}). Esta transição estrutural com a formação de folhas- β sugere que esta preparação enzimática atuou como coadjuvante dos efeitos de temperatura e

cisalhamento (MUNEER et al., 2015) na promoção de organização estrutural. Não obstante, o segundo grupo observado é formado pelas demais amostras de massa de glúten ES e as massas de glúten EB tratadas com SB6, enquanto o terceiro grupo é formado pelas amostras de glúten EB não-tratada enzimaticamente ou tratadas com a TG comercial. Esses resultados indicam, que o efeito da SB6 nas amostras de glúten brando tem como característica promover a formação de agregados com estruturas proteicas que tendem a ser equivalentes aos efeitos do tratamento industrial ou podem acentuá-los. As amostras foram caracterizadas por uma predominância de folhas- β de interação fraca, ou seja, parcialmente dobrada (SHIVU et al., 2013), (1633 cm^{-1}) correspondendo a $57,8 \pm 1,8\%$ das estruturas presentes, seguido de voltas- β como a segunda estrutura mais abundantemente detectada (1666 cm^{-1}), representada por $19,2 \pm 1,9\%$. α -hélices e estruturas randômicas detectadas a 1651 cm^{-1} representaram apenas $4,1 \pm 0,4\%$ das estruturas secundárias apresentadas (MUNEER et al., 2016).

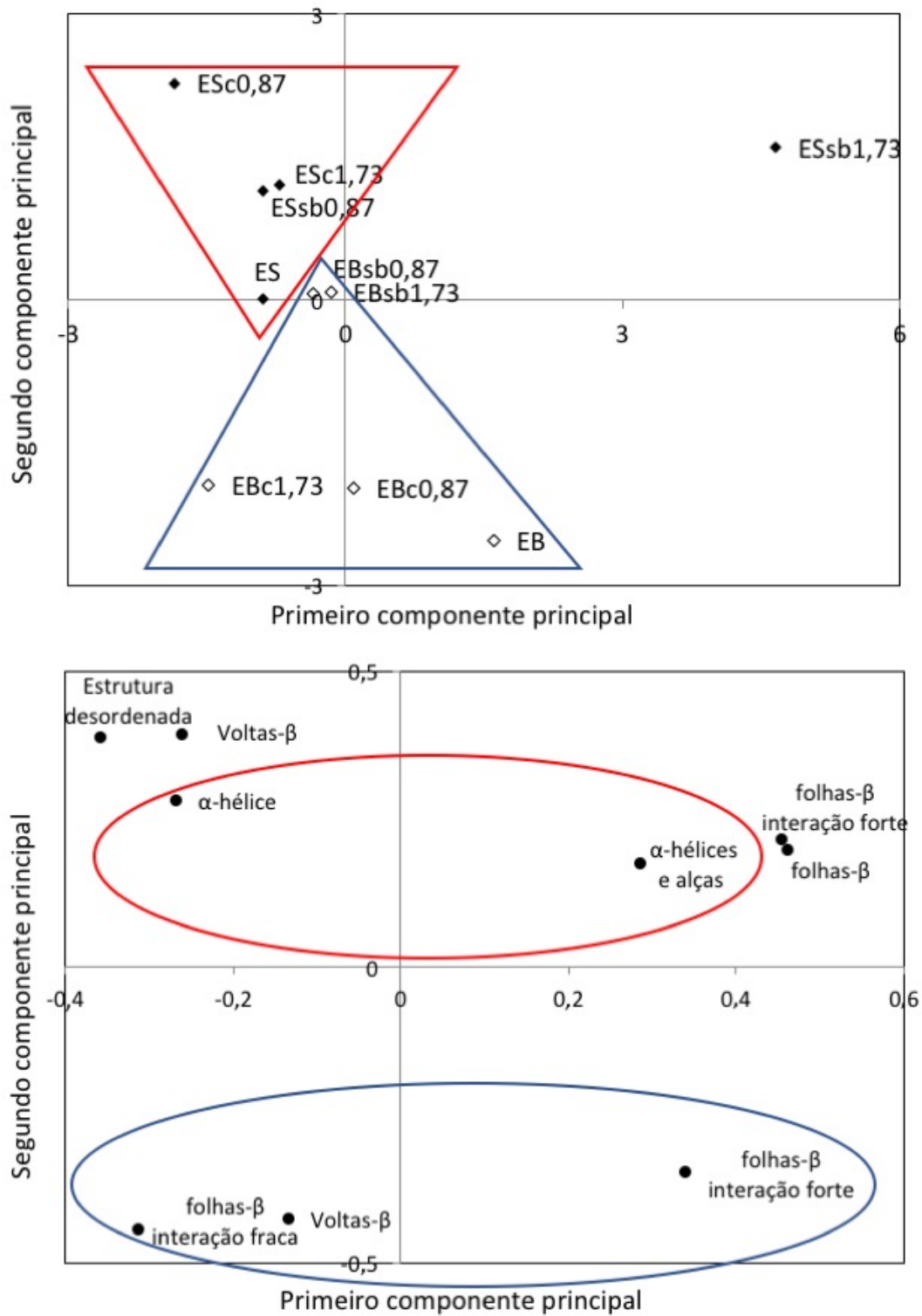


Figura 3.5 - Plotagem do gráfico de escores (A) e do gráfico de *loadings* (B) dos dois primeiros componentes principais (PC) para as amostras de massa de glúten: ◆, amostras de massa de glúten analisadas; ●, estruturas de proteína secundária detectadas por FT-IR. Sb: preparação enzimática SB6; c: TG comercial.

4. Conclusão

As etapas de desenvolvimento da massa de glúten e o efeito das TGs sobre a polimerização proteica foram significativamente afetadas pelo processo de separação do glúten. As massas preparadas com glúten EB apresentaram melhor desenvolvimento e foram mais susceptíveis a ação das TGs, indicando que a estrutura previamente reticulada do glúten ES pode ser limitante nas interações entre as cadeias proteicas. No entanto, as ramificações presentes no glúten ES foram parcialmente rompidas durante a mistura, indicando que este processo pode promover eficazmente o rearranjo e a formação de ligações cruzadas em ambos os tipos de glúten. Com relação ao tipo de TG, a SB6 foi mais eficaz em promover a polimerização proteica em uma faixa mais ampla de concentrações. Além da presença de ligações dissulfeto formadas do processo de mistura, a adição de SB6 também possibilitou a formação de ligações cruzadas covalentes estáveis como as ligações isopeptídicas. Este estudo mostrou que quando condições mais brandas de processamento do glúten de trigo são utilizadas, o desenvolvimento da massa ocorre de maneira adequada e as possibilidades de modificação proteica via TG são potencializadas. Uma vez que a importância tecnológica destas variáveis foi demonstrada neste estudo, o pré-processamento do glúten de trigo e a origem da TG devem ser consideradas em diversas aplicações do glúten de trigo na indústria de alimentos.

5. Referências bibliográficas

AACC International. Approved methods of analysis. Method 54-40.02. Mixograph methods. Approved November 3, 1999(11th Ed.). St. Paul, MN, U.S.A.: AACC International. <http://dx.doi.org/10.1094/AACCIntMethod-54-40.02>, 1999.

AUTIO, K.; KRUUS, K.; KNAAPILA, A.; GERBER, N.; FLANDER, L.; BUCHERT, J. Kinetics of transglutaminase-induced cross-linking of wheat proteins in dough. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1039–1045, 2005.

BAGAGLI, M. P.; JAZAERI, S.; BOCK, J. E.; SEETHARAMAN, K.; SATO, H. H. Effect of transglutaminase, citrate buffer, and temperature on a soft wheat flour dough system. **Cereal Chemistry**, v. 91, n. 5, p. 460–465, 2014.

BASMAN, A.; KÖKSEL, H.; NG, P. K. Effects of increasing levels of transglutaminase on the rheological properties and bread quality characteristics of two wheat flours.

European Food Research and Technology, v. 215, n. 5, p. 419–424, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-002-0573-3>>.

BRABEC, D. L.; SHOGREN, M. D.; ROUSSER, R. Mixogram analysis based on mixograph dynamics. **Cereal Foods World**, v. 47, n. 3, p. 98–104, 2002.

BRUYNINCKX, K.; JANSSENS, K. J. A.; DELCOUR, J. A.; SMET, M. The effect of cross-linking additives on the structure and properties of glassy wheat gluten material. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 38–48, 2016.

BRZOZOWSKI, B. Immunoreactivity of wheat proteins modified by hydrolysis and polymerisation. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 7, p. 1025–1040, 2016.

CERESINO, E. B.; DE MELO, R. R.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M. S.; ZUCCHI, T. D.; JOHANSSON, E.; SATO, H. H. Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. **Food Chemistry**, v. 241, p. 403–410, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617314668>>. Acesso em: 12 set. 2017.

FOLK, J. E.; COLE, P. W. Transglutaminase: mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 122, n. 2, p. 244–264, 1966.

GASPAR, A. L. C.; DE GÓES-FAVONI, S. P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. **Food Chemistry**, v. 171, p. 315–322, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.019>>.

GUARIENTI, E. M. **Qualidade industrial de trigo**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 27 p. (Embrapa-CNPT. Documentos, 8)

GUPTA, R. B.; KHAN, K.; MACRITCHIE, F. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. **Journal of Cereal Science**, v. 18, n. 1, p. 23–41, jul. 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521083710313>>.

HERSKOVITS, T. T.; GADEGBEKU, B.; JAILLET, H. On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 10, p. 2588–2598, 1970.

JIN, M.; HUANG, J.; PEI, Z.; HUANG, J.; GAO, H.; CHANG, Z. Purification and characterization of a high-salt-resistant microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 6–11, 2016.

JOHANSSON, E.; MALIK, A. H.; HUSSAIN, A.; RASHEED, F.; NEWSON, W. R.; PLIVELIC, T.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; KUKTAITE, R. Wheat gluten

polymer structures: The impact of genotype, environment, and processing on their functionality in various applications. **Cereal Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 367–376, 2013.

KIELISZEK, M.; MISIEWICZ, A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. **Folia Microbiologica**, v.59, n.3, p. 241-250, 2014.

KUKTAITE, R.; LARSSON, H.; JOHANSSON, E. Variation in protein composition of wheat flour and its relationship to dough mixing behaviour. **Journal of Cereal Science**, v. 40, n. 1, p. 31–39, 2004.

KUKTAITE, R.; NEWSON, W. R.; RASHEED, F.; PLIVELIC, T. S.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Monitoring nanostructure dynamics and polymerization in glycerol plasticized wheat gliadin and glutenin films: Relation to mechanical properties. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 6, p. 2998–3007, 2016.

LI, M.; WANG, Y.; MA, F.; ZENG, J.; CHANG, J.; CHEN, M.; LI, K.; YANG, G.; WANG, Y.; HE, G. Effect of extra cysteine residue of new mutant 1Ax1 subunit on the functional properties of common wheat. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7510, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-07541-w>>.

MACEDO, J. A.; FAZANI CAVALLIERI, A. L.; LOPES DA CUNHA, R.; SATO, H. H. The effect of transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 10, p. 673–679, 2010.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 618–626, 2007.

MALIK, A. H.; KUKTAITE, R.; JOHANSSON, E. Combined effect of genetic and environmental factors on the accumulation of proteins in the wheat grain and their relationship to bread-making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 2, p. 170–174, mar. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2012.09.017>>.

MARTINANT, J. P.; NICOLAS, Y.; BOUGUENNEC, A.; POPINEAU, Y.; SOULNIER, L.; BRANLARD, G. Relationships between Mixograph parameters and indices of wheat grain quality. **Journal of Cereal Science**, v. 27, n. 2, p. 179–189, 1998. Disponível em: <isi:000073039200008>.

MOREIRA-ASCARRUNZ, S.; LARSSON, H.; PRIETO-LINDE, M.; JOHANSSON, E. Mineral nutritional yield and nutrient density of locally adapted wheat genotypes under organic production. **Foods**, v. 5, n. 4, p. 89, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2304-8158/5/4/89>>.

MUNEER, F.; ANDERSSON, M.; KOCH, K.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; PLIVELIC, T. S.; MENZEL, C.; RHAZI, L.; KUKTAITE, R. Innovative gliadin/glutenin and modified potato starch green composites: Chemistry, structure, and functionality induced by processing. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 12, p.

6332–6343, 2016. Disponível em:
<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssuschemeng.6b00892>>.

MUNEER, F.; ANDERSSON, M.; KOCH, K.; MENZEL, C.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; PLIVELIC, T. S.; KUKTAITE, R. Nanostructural morphology of plasticized wheat gluten and modified potato starch composites: Relationship to mechanical and barrier properties. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 3, p. 695–705, 2015.

NAWROCKA, A.; SZYMASKA-CHARGOT, M.; MI, A.; WILCZEWSKA, A. Z.; MARKIEWICZ, K. H. Aggregation of gluten proteins in model dough after fibre polysaccharide addition. **Food Chemistry**, v. 231, p. 51–60, 2017.

RAM, S.; DAWAR, V.; SINGH, R. P.; SHORAN, J. Application of solvent retention capacity tests for the prediction of mixing properties of wheat flour. **Journal of Cereal Science**, v. 42, n. 2, p. 261–266, 2005.

RASHEED, F.; HEDENQVIST, M. S.; KUKTAITE, R.; PLIVELIC, T. S.; GALLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Mild gluten separation - A non-destructive approach to fine tune structure and mechanical behavior of wheat gluten films. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 90–98, 2015a. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.007>>.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.; BELTON, P. S.; TATHAM, A. S. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1418, p. 133–142, 2002. Disponível em:
<<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2001.1024>>.

SHIVU, B.; SESHADRI, S.; LI, J.; OBERG, K. A.; UVERSKY, V. N.; FINK, A. L. Distinct β -sheet structure in protein aggregates determined by ATR–FTIR spectroscopy. **Biochemistry**, v. 52, n. 31, p. 5176–5183, 6 ago. 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi400625v>>.

STEFFOLANI, M. E.; RIBOTTA, P. D.; PÉREZ, G. T.; LEÓN, A. E. Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 366–373, 2010.

VAN DER BORGHT, A.; GOESAERT, H.; VERAVERBEKE, W. S.; DELCOUR, J. A. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: Overview of the main processes and the factors involved. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 3, p. 221–237, 2005.

WANG, J. S.; ZHAO, M. M.; YANG, X. Q.; JIANG, Y. M.; CHUN, C. Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 2, p. 174–179, 2007.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 115–119, 2007.

WIESER, H.; KIEFFER, R. Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. **Journal of Cereal Science**, v. 34, n. 1, p. 19–27, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521000903850>>.

WIKSTRÖM, K.; BOHLIN, L. Multivariate analysis as a tool to predict bread volume from mixogram parameters. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 686–690, 1996.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 447–454, 2004.

CAPÍTULO 4

EFEITO DA ADIÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE DE *Streptomyces* SP. CBMAI 1617 E OUTROS ADITIVOS NA ESTRUTURA DE ESPUMAS FORMULADAS COM GLIADINA

Artigo a ser submetido para publicação na revista Food Research International –
de autoria de Elaine Berger Ceresino,
Eva Johansson, Hélia Harumi Sato, Stephen A. Hall, Ramune Kuktaite.

Resumo

A capacidade de formação de espumas preparadas com glúten de trigo é atribuída predominantemente à presença de gliadinas. Aditivos que promovem a formação de ligações cruzadas, tais como a transglutaminase (TG), melhoraram as propriedades de espuma em glúten de trigo. Nos capítulos anteriores foi demonstrado que a TG obtida de uma nova linhagem microbiana não-comercial, *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6), promoveu eficazmente a polimerização proteica em massas à base de glúten. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da SB6 em espumas preparadas utilizando a fração proteica rica em gliadina extraída do glúten de trigo. A porosidade, medida a partir da imagem tridimensional da estrutura interna das espumas, aumentou de 88,3 para 93,6% após adição de 2,4% de SB6. Estudos de distribuição da área da seção circular das células mostraram que estas se expandiram com o aumento da polimerização proteica que foi promovida pela adição da TG. Na amostra não-tratada enzimaticamente, análises de microscopia eletrônica e tomografia de raio-X revelaram áreas da região lamelar onde havia acúmulo de agregados proteicos. Os resultados sugerem que após a adição de SB6, estes agregados deram origem a filamentos conectores entre as células da espuma. A inclusão dos plasticizantes glicerol (hidrofílico) e ácido linoleico (hidrofóbico) são recomendados na literatura, porém não influenciaram positivamente a estrutura celular das espumas.

1. Introdução

Uma das características mais interessantes das proteínas do trigo são sua viscoelasticidade e capacidade de formação de espuma (KUKTAITE; LARSSON; JOHANSSON, 2004; WU et al., 2014). A fase gasosa em massas de trigo é determinante na qualidade e estrutura de pães, uma vez que até 70% do volume final do pão é resultado das variações de tamanho, formato e número das células formadas no pão. O potencial de formação de bolhas em massas de trigo é atribuída a presença de moléculas anfifílicas (WILDE, 2012). Assim, a formação de espumas na massa de trigo está relacionada com as propriedades moleculares das proteínas do trigo, outros surfactantes e lipídeos (HAYMAN et al., 1998; SALT et al., 2018). O glúten tem se mostrado como uma fonte promissora na substituição de ingredientes tradicionalmente utilizados para formar produtos aerados, como clara de ovos (FOEGEDING; LUCK; DAVIS, 2006; RASHEED et al., 2016; WOUTERS et al., 2017). Os efeitos específicos das gliadinas nas propriedades de espuma do glúten ainda não foram totalmente elucidados, provavelmente devido à complexidade da composição das frações de gliadina (ÖRNEBRO et al., 2003; THEWISSEN et al., 2011). Adições de gliadina (5 e 10%) diminuíram a força da massa de trigo e quando adicionadas a massa à base de glúten de trigo promoveram a formação de estruturas de aspecto esponjoso reduzindo a compactação do glúten (KHATKAR; BARAK; MUDGIL, 2013).

Agentes químicos capazes de promover a reticulação proteica são geralmente escolhidos com o intuito de ampliar a aplicabilidade de espumas à base de glúten, o que pode comprometer em muitos aspectos a sustentabilidade da produção de produtos derivados de glúten (BLOMFELDT et al., 2012; RASHEED et al., 2016). Uma das formas emergentes de formar ligações cruzadas em proteínas é utilizar preparações enzimáticas de transglutaminase (TG) de origem microbiana. Ao formar ligações covalentes intra e intermoleculares entre proteínas, a TG demonstrou melhorar as propriedades físico-químicas e funcionais de diversas matrizes proteicas consideradas co-produtos, tais como proteínas do glúten e do soro de leite, sem causar efeitos negativos na qualidade nutricional ou sensorial dos alimentos (BAUER et al., 2003; GAUCHE; BARRETO; BORDIGNON-LUIZ, 2010; TAGHI GHARIBZAHEDI et al., 2017).

As propriedades de formação de espuma de hidrolisados de glúten em condições semelhantes as encontradas no processamento de alimentos, i.e, 55 °C, 1h; 5 °C, 18 h, foram melhoradas com o tratamento utilizando a TG comercial. Este estudo mostrou que a TG induziu mudanças funcionais nos peptídeos de glúten acentuando a natureza anfifílica das proteínas (AGYARE; ADDO; XIONG, 2009). A capacidade de formação de espuma de soluções de gliadina também foram melhoradas após a adição de TG de porquinho da Índia (LARRE et al., 1993).

Devido a especificidade de TGs de origens distintas, novas funcionalidades em produtos proteicos podem ser alcançadas utilizando-se diferentes preparações dessa enzima (CERESINO et al., 2018). Por isso, estudos aplicando TGs de fontes recentemente isoladas permitem que a aplicabilidade de matérias-primas existentes seja ampliada.

As espumas de gliadinas estudadas até o momento apresentam aspecto quebradiço e são consideradas higroscópicas, sendo sugerido na literatura a adição de plasticizantes. O efeito plasticizante de glicerol em espumas a base de glúten melhorou suas propriedades mecânicas, quando adicionada na concentração de 20% (BLOMFELDT et al., 2012). Plasticizantes hidrofóbicos como o ácido linoleico mostraram reduzir a absorção de vapor de água em filmes elaborados com proteínas do milho (SANTOSA; PADUA, 1999).

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da enzima transglutaminase SB6 sobre a capacidade de formação de espuma da gliadina e analisar as estruturas celulares formadas após a liofilização. Além do impacto da adição de TG, a interferência da inclusão de outros aditivos, i.e. glicerol e ácido linoleico, também foi estudada. Para alcançar os objetivos descritos, análises tridimensionais das espumas à base de gliadina foram utilizadas pela primeira vez neste material.

2. Material e métodos

2.1. Preparo das espumas à base de gliadina

Gliadina em pó foi extraída de acordo com CERESINO et al. (2018) dispersando-se 40 g de glúten em 500 mL de solução de 70% de etanol em água (v/v) sob agitação magnética. A mistura foi agitada durante 30 min a 300 rpm à temperatura ambiente seguida por centrifugação durante 10 min a 12.000 rpm e 5°C (centrífuga Beckman J2.21, CA, EUA). O sobrenadante etanólico, contendo a fração rica em gliadina, foi concentrado em um evaporador rotativo (Buchi) e em seguida liofilizado (Edwards, Modulyo, Sussex, Reino Unido).

A gliadina em pó foi dispersa em água utilizando um homogeneizador Ultra-Turrax TP18/10 com elemento de dispersão S25–18G na velocidade média por 30 s (Janke and Kunkel, IKA-Werk, D7813 Staufen, Germany) seguindo as formulações apresentadas na Tabela 4.1. Uma alíquota de 2,7 g de gliadina em pó foi dispersa em um tubo cônico de 50 mL contendo 0; 1,2 ou 2,4% (m/m em relação à quantidade de gliadina) de SB6 solubilizadas em 15 mL de água. Também foi testada em cada concentração de SB6, o efeito da adição de glicerol (Gly) e ácido linoleico (AL) na proporção de 80:20 (glia:gly ou glia:AL, m:m) respectivamente. Após a dispersão dos componentes, a espuma foi imediatamente transferida para placas de petri de 60 x 15 mm e congeladas a -80°C. A mistura congelada foi liofilizada por 48 h e cortada em cubos de aproximadamente 1 cm³ utilizando um bisturi.

Tabela 4.1 - Formulação de espumas liofilizadas de gliadina

Amostra	% TG (m/m) ^a	% Glicerol (m/m) ^a	% Ácido linoleico (m/m) ^a
0-Glia	-		
0-Glia-Gly	-	20	
0-Glia-AL	-		20
1-Glia-TG	1,2		
1-Glia-Gly-SB6	1,2	20	
1-Glia-AL- SB6	1,2		20
2-Glia- SB6	2,4		
2-Glia-Gly- SB6	2,4	20	
2-Glia-AL- SB6	2,4		20

^aPorcentagens são relativas ao conteúdo de gliadina.

2.2. Análise da morfologia das espumas de gliadina por microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das amostras de espumas 0-Glia, 2-Glia-TG, 2-Glia-Gly-SB6, 2-Glia-AL-SB6 foi estudada por meio de microscopia eletrônica de varredura (Hitachi SU3500, Japão) no Departamento de Biologia, *Lund University*, Suécia. Até serem analisadas as amostras foram mantidas em um dessecador contendo sílica gel. As peças foram cortadas transversalmente com um bisturi e fixadas em suportes de alumínio utilizando-se uma fita adesiva dupla-face. Antes da aquisição das imagens, as espumas foram recobertas com ouro por 55 s (Cressington Sputter Coater 108 auto).

2.3. Tomografia de raios-X das espumas de gliadina

A aquisição das imagens volumétricas 3D das espumas de gliadina 0-Glia, 2-Glia-SB6, 2-Glia-Gly-SB6, 2-Glia-AL-SB6 foram realizadas à temperatura ambiente utilizando um tomógrafo de raio-X Zeiss XRadia XRM520 na Divisão de Mecânica dos Sólidos, Universidade de Lund, Suécia. Foi utilizada a voltagem de 40kV e corrente de 75 μ A, no tubo de raio X. As radiografias foram adquiridas pela rotação em 360° da espuma. A resolução de 1500 nm foi utilizada para todas as amostras. A imagem cilíndrica da secção interna com diâmetro e altura de 1000 voxels foi reconstruída pela sobreposição de 950 a 1002 imagens. A reconstrução tomográfica foi realizada utilizando o software Zeiss reconstructor. O software Fiji (<https://imagej.net/Fiji>) foi utilizado para medir a área das bolhas e a porosidade do material. A porosidade foi determinada como a razão entre voxels do primeiro plano da imagem dividido pelo total de voxels na imagem, sendo que voxel é um pixel volumétrico que representa o volume elementar de uma imagem (DEMIRKESEN et al., 2014).

2.4. Análise das proteínas por SE-HPLC

O procedimento de extração proteica consistiu em três etapas sequenciais que foram utilizadas para medir a distribuição de proteínas de acordo com seu tamanho. O tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6,9 contendo 0,5% (m/v) SDS foi utilizado em todas as etapas de extração. As três extrações em série foram

realizadas utilizando-se 1,4 mL do solvente. As proteínas solúveis em SDS foram recuperadas na primeira etapa após vigorosa agitação dos microtubos de 2 mL contendo 40 mg da amostra em agitador a 2.000 rpm. Após a centrifugação a 12.500 rpm por 10 min, o solvente extrator foi novamente adicionado e o sistema foi sonicado por 30 s, enquanto na terceira extração a sonicação foi repetida por 45 + 30 s com intervalo para resfriamento das amostras (amplitude de 5 μ m, 23 KHz, Sanyo Soniprep, Tamro, Suécia).

A separação das proteínas e processamento da análise foi realizado no mesmo equipamento e acessórios descritos por (CERESINO et al., 2018). O software Empower pro (Waters) foi utilizado nas análises e integração dos cromatogramas dividindo-os em duas áreas arbitrárias: proteínas poliméricas (PP) (9-14 min) e proteínas monoméricas (MP) (14-20 min). As extrações de cada etapa foram somadas separadamente.

2.5. Análises estatísticas

As análises de cromatografia líquida foram realizadas em triplicata. As barras de desvios padrões das análises de SE-HPLC e distribuição de frequências das áreas médias das seções transversais de 100 células das estruturas visualizadas por meio de tomografia foram calculadas utilizando-se o software Microsoft Excel v.2010.

3. Resultados e discussão

3.1. Efeito da adição de SB6 nas propriedades de espumas à base de gliadina

Imagens circulares (2-D) da região interna (1,5 mm de diâmetro, 1000 voxels) das espumas à base de gliadina foram obtidas por meio de análises de tomografia de raios-X (Figura 4.1) e reconstruídas para formar uma imagem cilíndrica tridimensional ilustrando a estrutura interna das amostras (Figura 4.2). A análise qualitativa destas imagens mostra uma estrutura bifásica constituída de células que possuem formato esférico. Ao contrário de imagens de microtomografia de raios-X de espumas líquidas à base de gelatina, a progressão do formato esférico das células para o formato poliédrico não foi observada (LAMBERT et al., 2005), provavelmente por causa do rápido congelamento das espumas a -80 °C.

As imagens de tomografia de raios-X também mostraram diferenças entre as características do filme lamelar e dos canais de Plateau das espumas. A amostra controle (0-Glia) apresentou áreas de maior densidade proteica nas regiões dos canais de Plateau (Figura 4.1a; indicado pela seta), enquanto a amostra tratada com SB6 foi caracterizada pela presença de cadeias poliméricas que formaram filamentos que conectaram as células (Figura 4.1b; indicado pela seta). As imagens de microscopia eletrônica de varredura confirmaram os resultados encontrados nas análises tomográficas. A Figura 4.3a da espuma 0-Glia expõe em mais detalhes os aglomerados proteicos presentes entre as estruturas celulares da amostra. Adicionalmente, as micrografias revelaram que na espuma 2-Glia-TG a expansão do filme durante a incorporação de ar ocorreu às custas de pequenas rupturas no filme lamelar (Figura 4.1b, apontado pela seta) causadas, provavelmente, pela difusão do ar entre as bolhas.

A Figura 4.4 mostra os resultados quantitativos obtidos da análise SE-HPLC, e revelam que as amostras tratadas com 2,4 % de SB6 apresentaram o maior índice de polimerização e que a adição da SB6 resultou no aumento da proporção de polímeros de alta massa molecular.

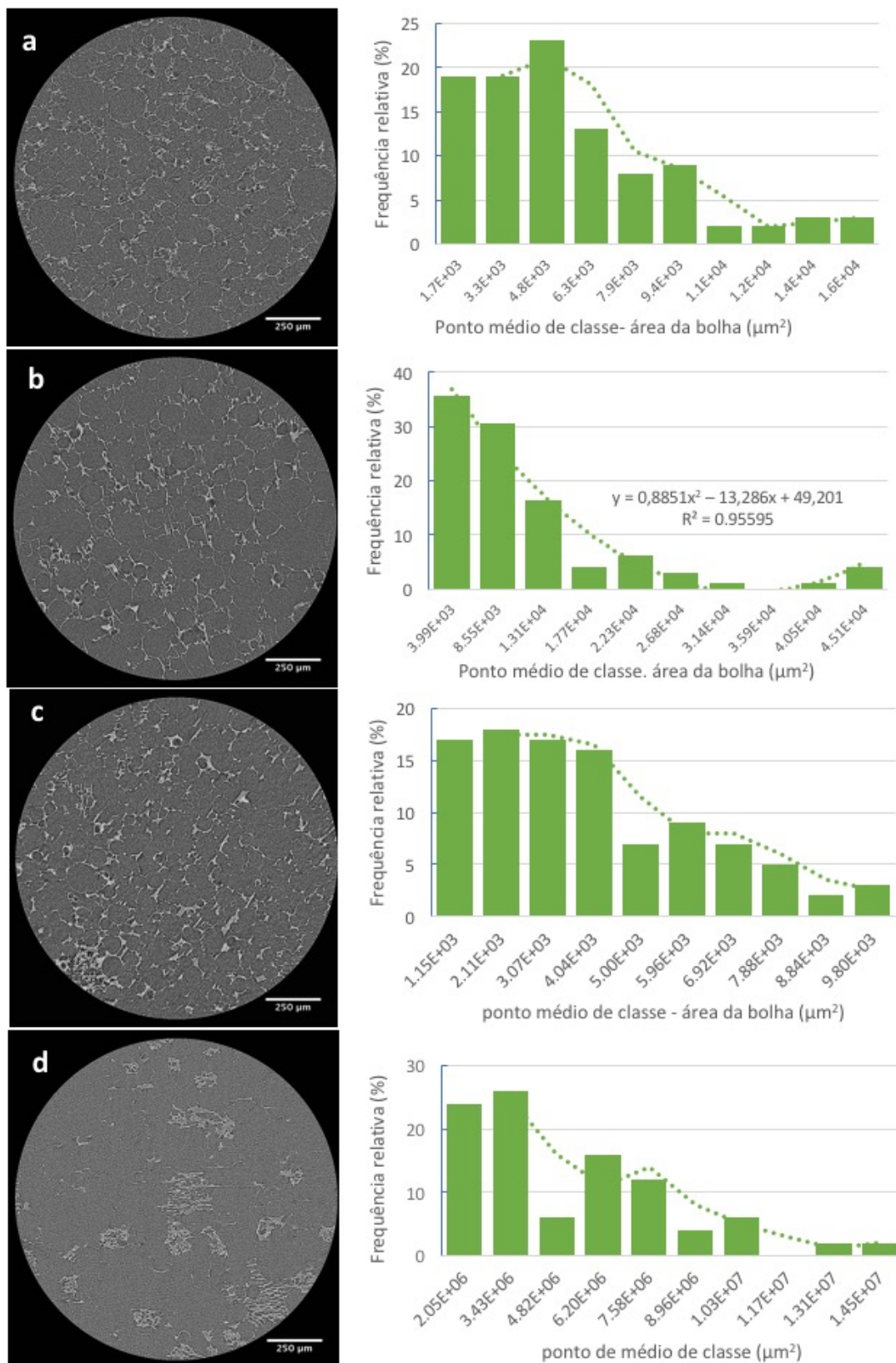


Figura 4.1 – Imagens obtidas por tomografia de raios-X e distribuição do tamanho das estruturas celulares das espumas à base de gliadina: a) 0-Glia, (b) 2-Glia-SB6, (c) 2-Glia-Gly-SB6, (d) 2-Glia-AL-SB6.

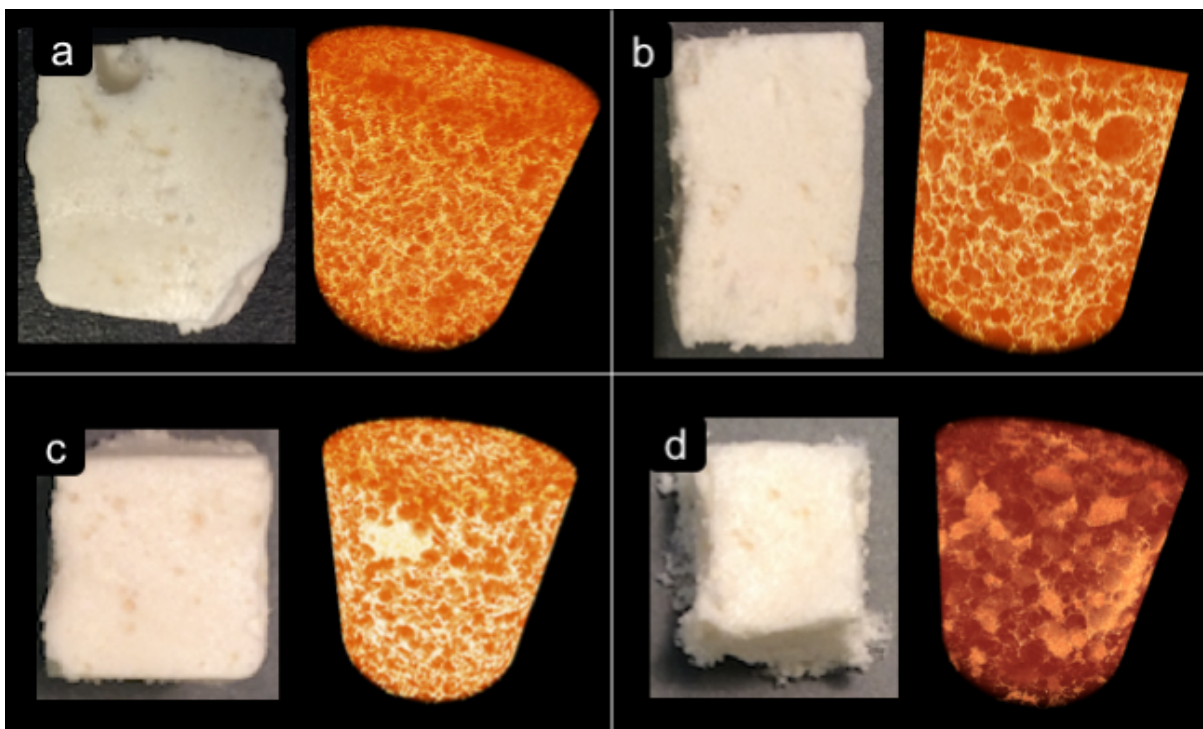


Figura 4.2 – Imagens da superfície das espumas e das reconstruções 3-D obtidas por tomografia representativa da estrutura interna das espumas à base de gliadina a) 0-Glia, (b) 2-Glia-SB6, (c) 2-Glia-Gly-SB6, (d) 2-Glia-AL-SB6.

A abordagem quantitativa das imagens tomográficas (Figura 4.1) revelaram ainda que a adição de SB6 (amostra 2-Glia-TG) favoreceu a expansão radial dos poros da espuma à base de gliadina. Análises estatísticas de distribuição de frequência ($n=100$) do tamanho interno das células (para o cálculo não foram consideradas as células das bordas da espuma), realizado a partir das imagens 2-D de tomografia, mostrou que a área média transversal de 66,3% das células analisadas da amostra 2-Glia-SB6 foi de aproximadamente $6,27 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (Figura 4.1 b), seguindo uma equação de segunda ordem (Eq. 1). A área transversal de 61% das células da espuma formada sem a adição de SB6 (0-Glia) foi de aproximadamente $3,3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (Figura 4.1 a). Ou seja, os resultados indicam que a adição de SB6 favoreceu o aumento consistente da área da seção transversal das bolhas em quase duas vezes quando comparada com a área da seção circular das células da espuma sem adição de enzima.

$$y = 0,88x^2 - 13,29x + 49,20; R^2 = 0,95$$

Eq. (1)

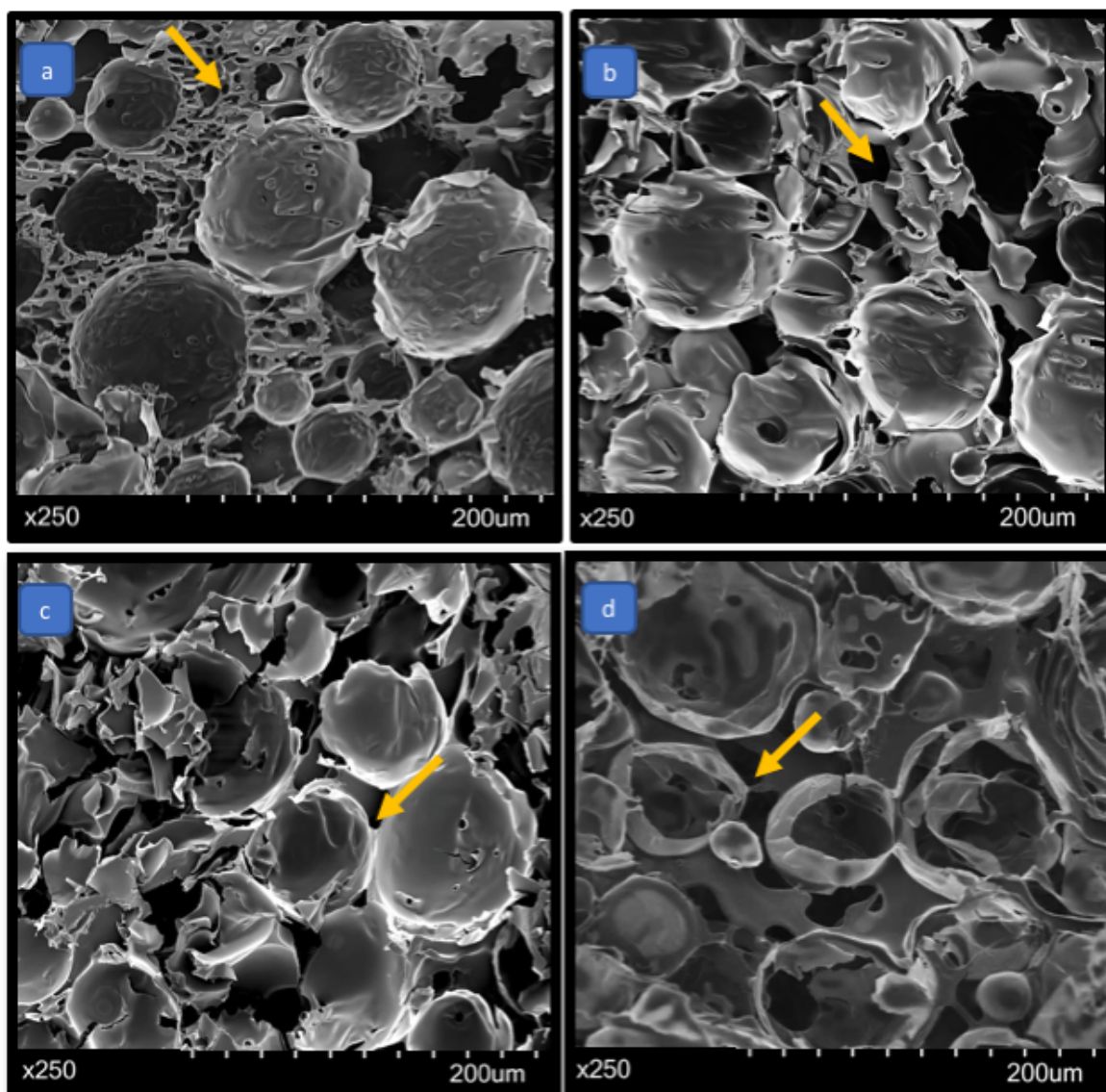


Figura 4.3- Microscopia eletrônica de varredura das amostras a) 0-Glia, (b) 2-Glia- SB6, (c) 2-Glia-Gly-SB6, (d) 2-Glia-AL-SB6.

Estes resultados também estão em conformidade com os resultados da análise de porosidade das espumas. As imagens 3-D de tomografia (Figura 4.2) que foram reconstruídas pela sobreposição das imagens tomográficas bidimensionais foram utilizadas para o cálculo de porosidade. A espuma não-tratada com a SB6 foi a mais densa entre as amostras analisadas. Esta amostra e a espuma 2-Glia-TG apresentaram porosidade de 88,3% e 93,6%, respectivamente.

As características da estrutura celular formada durante o batimento da solução proteica podem ser melhor entendidas por meio da alteração da solubilidade das proteínas (WU et al., 2014). O maior índice de % UPP para as proteínas de alta massa molecular e proteínas totais foi obtido quando 2,4 % de SB6 foram incluídos

na formulação, indicando que provavelmente ligações isopeptídicas foram formadas (GUPTA; KHAN; MACRITCHIE, 1993; BAUER et al., 2003; JOHANSSON et al., 2013). Na concentração de 1,2% de SB6, diferenças estatísticas não foram observadas. A formação de peptídeos de maior massa molecular em espumas de glúten proporcionada pela ação da TG estão associadas com melhor capacidade de formação de espuma, enquanto peptídeos de menor massa molecular não possuem a mesma capacidade (DRAGO; GONZÁLEZ, 2001; WOUTERS et al., 2016).

O aumento da hidrofobicidade das gliadinas decorrente do processo de polimerização proteica, que ocorre sob condições especiais, favorece sua adsorção na interface ar-líquido em hidrocolóides. Portanto, este é provavelmente um dos mecanismos pelos quais a SB6 favorece a formação de espumas e que poderiam ser analisados sob novos estudos de hidrofobicidade por meio de cromatografia líquida utilizando colunas de fase reversa. Estudos também mostram que a interação eletrostática é importante para a estabilidade do filme interfacial que forma a estrutura das espumas e portanto, a desaminação dos resíduos de glutamina promovida pela TG também mostrou estar associada ao aumento da capacidade de formação de espumas (YU; DAMODARAN, 1991; AGYARE; ADDO; XIONG, 2009). LARRE et al., (1993) estudou a capacidade de formação de espumas de gliadinas modificadas pela TG extraída de porquinhos da Índia. Nesse estudo, a TG promoveu a polimerização entre os resíduos de lisina, que é o substrato limitante, e os resíduos de glutamina. Foi demonstrado que até 36% dos resíduos de glutamina que não participaram das ligações cruzadas sofreram desaminação catalisada pela TG e este resultado foi associado a melhorias nas propriedades de coesão do filme interfacial.

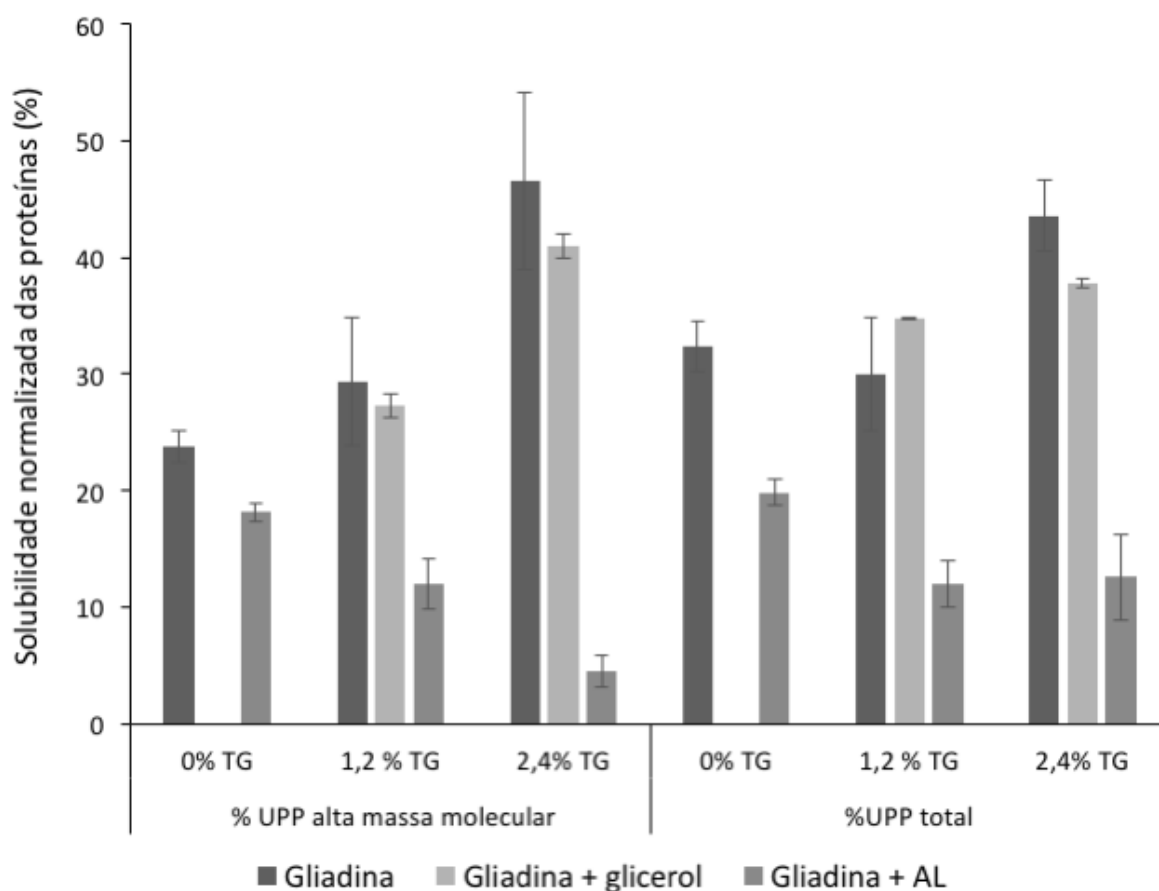


Figura 4.4- Porcentagem de proteínas poliméricas extraíveis de espumas à base de gliadina, após sonicação.

3.2. Efeito da adição de glicerol e ácido linoleico em espumas formuladas à base de gliadina e modificadas por meio da preparação enzimática de SB6

As células da espuma contendo glicerol e SB6 (Figura 4.1 c) apresentaram um perfil de distribuição de área transversal semelhante ao da espuma obtida pela dispersão da gliadina em água sem a presença de aditivos. Ambas as espumas apresentaram uma área transversal de até $4,8 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ em aproximadamente 70% das bolhas amostradas. A inclusão de glicerol nas amostras tratadas com SB6 não alterou significativamente a %UPP das proteínas de alta massa molecular, embora estudos anteriores tenham demonstrado que a polimerização das gliadinas em filmes foi favorecida pelo glicerol (KUKTAITE et al., 2016). A polimerização proteica promovida pela adição de SB6 foi eficaz tanto na presença quanto na ausência de glicerol, como mostram os resultados na Figura

4.4. Entretanto, a imagem de microscopia da amostra 2-Glia-Gly-TG (Figura 4.3 c) mostra regiões escuras e aponta células unidas pelas bordas, sugerindo que o glicerol tenha prejudicado as propriedades interfaciais dos filmes. Este resultado é evidenciado pelas imagens 2-D (Figura 4.1 c), onde também não foi possível detectar as bordas das células individuais em determinadas regiões, como na área em destaque. Embora em outros estudos o glicerol tenha proporcionado efeitos positivos nas espumas a base de glúten (BLOMFELDT et al., 2011), os resultados deste estudo sugerem que esses defeitos podem ter sido causados pela interferência do glicerol nas interações intermoleculares das proteínas, prejudicando a capacidade dos polímeros adsorvidos na região interfacial de restabelecer uma tensão de equilíbrio (FIGUEREDO; RIBEIRO; SABADINI, 1999; RASHEED et al., 2015a; KUKTAITE et al., 2016).

O desenvolvimento de espumas liofilizadas de glúten de trigo foi iniciada por BLOMFELDT et al. (2011). Neste estudo a presença de glicerol melhorou as propriedades mecânicas da espuma e contribuiu para o aumento da massa molecular dos polímeros. No entanto, o papel das frações proteicas do glúten na capacidade de formação de espumas não havia sido estudado até o momento. Assim, em seu trabalho realizado em sequência, BLOMFELDT et al. (2012) avaliaram a importância da proporção de gliadinas e gluteninas na formação das espumas liofilizadas e concluíram que o aumento na concentração de gliadinas resultou em espumas de menor densidade. Uma vez que a inclusão de glicerol não favoreceu as propriedades da espuma na presente pesquisa, sugere-se que trabalhos futuros comparem os efeitos do glicerol em espumas a base de glutenina e gliadina separadamente.

As proteínas do glúten permitem a geração de novas micro e nano espumas que apresentem excelentes propriedades quando um agente plasticizante é adicionado (QUESTER; DAHESH; STREY, 2014). Com base em sugestões da literatura (BERTAN et al., 2005; ANDREUCCETTI; CARVALHO; GROSSO, 2009; QUESTER; KLEMMER; STREY, 2017), a adição de ácido linoleico foi avaliada neste estudo. A combinação dos resultados mostrou que a inclusão do ácido linoleico resultou no colapso das estruturas internas da espuma. Embora, a aparência externa seja semelhante às demais formulações, internamente áreas de deposição de material proteico e oleoso foram observadas (Figura 4.2 d; Figura 4.3 d). A análise de SE-HPLC, mostrou uma menor polimerização proteica para esta amostra

em comparação com as demais. As imagens revelam ainda que as bordas das células são pouco visíveis (Figura 4.1 d) indicando que as proteínas não se desenvolveram adequadamente na interface, e por isso não foi possível calcular com precisão a distribuição de tamanho das células. Uma vez que o ácido linoleico é altamente hidrofóbico, as forças de dispersão direcionam o escoamento das monocamadas lipídicas formadas durante a homogeneização de forma atrativa para o mesmo local, o que causa a ruptura da lamela. Quando forças repulsivas de natureza não-eletrostática são predominantes, estas contribuem para a repulsão mútua entre as interfaces e levam ao colapso da espuma (FIGUEREDO; RIBEIRO; SABADINI, 1999; SANTOSA; PADUA, 1999). Portanto nas condições estudadas, o glicerol e o ácido linoleico não exerceram efeito positivo nas espumas de gliadina. A adição de SB6 contribuiu intensificando a capacidade de formação de espuma da gliadina e promoveu o aumento da porosidade, que é uma característica desejável em determinados produtos como *snacks* proteicos.

4. Conclusão

A capacidade de formação de espuma em espumas à base de gliadina podem ser modificadas pela ação da SB6, uma transglutaminase obtida de uma nova fonte microbiana. Quando a SB6 foi adicionada na concentração de 2,4%, o volume intracelular das espumas foi expandido. A adição de SB6 contribuiu para o aumento da % UPP de proteínas de alta massa molecular. As espumas não-tratadas com SB6 apresentaram-se menos polimerizadas, porém aglomerados proteicos na região dos canais de Plateau foram detectados. Portanto, a morfologia e o tamanho das células formadas podem ser considerados como uma combinação das propriedades de formação de espuma das gliadinas, a presença de novas ligações cruzadas e a desaminação dos resíduos de glutamina promovidas pela SB6. Adições de glicerol e ácido linoleico modificaram a estrutura interna característica das espumas à base de gliadina. Portanto, em formulações à base de gliadina em que se desejam o aumento da porosidade, como em *snacks* proteicos, recomenda-se o uso da SB6, mas a adição de ácido linoleico deve ser evitada.

5. Referências Bibliográficas

AGYARE, K. K.; ADDO, K.; XIONG, Y. L. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 72–81, 2009.

ANDREUCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1113–1121, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.010>>.

BAUER, N.; KOEHLER, P.; WIESER, H.; SCHIEBERLE, P. Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat . I . Biochemical Analysis. **Cereal Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 781–786, 2003.

BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Effect of fatty acids and “Brazilian elemi” on composite films based on gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 73–82, 2005.

BLOMFELDT, T. O. J.; KUKTAITE, R.; JOHANSSON, E.; HEDENQVIST, M. S. Mechanical properties and network structure of wheat gluten foams. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1707–1715, 2011.

BLOMFELDT, T. O. J.; KUKTAITE, R.; PLIVELIC, T. S.; RASHEED, F.; JOHANSSON, E.; HEDENQVIST, M. S. Novel freeze-dried foams from glutenin- and gliadin-rich fractions. **RSC Advances**, v. 2, n. 16, p. 6617, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ra20946b>>.

CERESINO, E. B.; DE MELO, R. R.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M. S.; ZUCCHI, T. D.; JOHANSSON, E.; SATO, H. H. Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. **Food Chemistry**, v. 241, p. 403–410, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617314668>>. Acesso em: 12 set. 2017.

DEMIRKESEN, I.; KELKAR, S.; CAMPANELLA, O. H.; SUMNU, G.; SAHIN, S.; OKOS, M. Characterization of structure of gluten-free breads by using X-ray microtomography. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 37–44, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.002>>.

DRAGO, S. R.; GONZÁLEZ, R. J. Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, n. 4, p. 269–273, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856400000345>>.

FIGUEREDO, R. C. R.; RIBEIRO, F. A. L.; SABADINI, E. Ciência de espumas - aplicação na extinção de incêndios. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 126–130, 1999.

FOEGEDING, E. A.; LUCK, P. J.; DAVIS, J. P. Factors determining the physical properties of protein foams. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2–3 SPEC. ISS., p. 284–292, 2006.

GUPTA, R. B.; KHAN, K.; MACRITCHIE, F. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. **Journal of Cereal Science**, v. 18, n. 1, p. 23–41, jul. 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521083710313>>.

HAYMAN, D.; SIPES, K.; HOSENEY, R. C.; FAUBION, J. M. Factors controlling gas cell failure in bread dough. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 585–589, 1998.

JOHANSSON, E.; MALIK, A. H.; HUSSAIN, A.; RASHEED, F.; NEWSON, W. R.; PLIVELIC, T.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; KUKTAITE, R. Wheat gluten polymer structures: The impact of genotype, environment, and processing on their functionality in various applications. **Cereal Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 367–376, 2013.

KHATKAR, B. S.; BARAK, S.; MUDGIL, D. Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 53, p. 38–41, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.002>

KUKTAITE, R.; LARSSON, H.; JOHANSSON, E. Variation in protein composition of wheat flour and its relationship to dough mixing behaviour. **Journal of Cereal Science**, v. 40, n. 1, p. 31–39, 2004.

KUKTAITE, R.; NEWSON, W. R.; RASHEED, F.; PLIVELIC, T. S.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Monitoring nanostructure dynamics and polymerization in glycerol plasticized wheat gliadin and glutenin films: Relation to mechanical properties. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 6, p. 2998–3007, 2016.

LAMBERT, J.; CANTAT, I.; DELANNAY, R.; RENAULT, A.; GRANER, F.; GLAZIER, J. A.; VERETENNIKOV, I.; CLOETENS, P. Extraction of relevant physical parameters from 3D images of foams obtained by X-ray tomography. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 263, n. 1–3 SPEC. ISS., p. 295–302, 2005.

LARRE, C.; CHIARELLO, M.; BLANLOEIL, Y.; CHENU, M.; GUEGUEN, J. Gliadin modifications catalyzed by guinea pig liver transglutaminase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 17, n. 4, p. 267–282, 1993.

ÖRNEBRO, J.; NYLANDER, T.; ELIASSON, A. C.; SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S.; GILBERT, S. M. The behaviour of the high molecular-weight glutenin subunit 1Dx5, the 58 kDa central repetitive domain and α -gliadins at the air-aqueous interface. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 2, p. 147–156, 2003.

QUESTER, S.; DAHESH, M.; STREY, R. Microcellular foams made from gliadin. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, n. 9, p. 2385–2389, 2014.

QUESTER, S.; KLEMMER, H. F. M.; STREY, R. Towards gliadin nanofoams. **Colloid and Polymer Science**, v. 295, n. 1, p. 267–275, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00396-016-3995-3>>.

RASHEED, F.; HEDENQVIST, M. S.; KUKTAITE, R.; PLIVELIC, T. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Mild gluten separation - A non-destructive approach to fine tune structure and mechanical behavior of wheat gluten films. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 90–98, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.007>>.

RASHEED, F.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; PLIVELIC, T. S.; JOHANSSON, E. The use of plants as a “green factory” to produce high strength gluten-based materials. **Green Chemistry**, v. 18, 2016. Disponível em: <www.rsc.org/greenchem>.

SALT, L. J.; GONZÁLEZ-THUILLIER, I.; CHOPE, G.; PENSON, S.; TOSI, P.; HASLAM, R. P.; SKEGGS, P. K.; SHEWRY, P. R.; WILDE, P. J. Intrinsic wheat lipid composition effects the interfacial and foaming properties of dough liquor. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 211–222, fev. 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X17302369>>.

SANTOSA, F. X. B.; PADUA, G. W. Tensile properties and water adsorption of zein sheets plasticized with oleic and linoleic acids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 2070–2074, 1999.

TAGHI GHARIBZAHEDI, S. M.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; GREINER, R.; GEORGE, S.; ROOHINEJAD, S. Recent advances in the application of microbial transglutaminase crosslinking in cheese and ice cream products: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107 B, p. 2364-2374, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017328489>>.

THEWISSEN, B. G.; CELUS, I.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. Foaming properties of wheat gliadin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 1370–5, 2011. Disponível em: <<http://www.mendeley.com/research/foaming-properties-wheat-gliadin/>>.

WILDE, P. Foam formation in dough and bread quality. In: **Breadmaking**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 370–399.

WOUTERS, A. G. B.; ROMBOUTS, I.; FIERENS, E.; BRIJS, K.; BLECKER, C.; DELCOUR, J. A.; MURRAY, B. S. Foaming and air-water interfacial characteristics of solutions containing both gluten hydrolysate and egg white protein. **Food Hydrocolloids**, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X17312997>>.

WOUTERS, A. G. B.; ROMBOUTS, I.; LEGEIN, M.; FIERENS, E.; BRIJS, K.; BLECKER, C.; DELCOUR, J. A. Food hydrocolloids air e water interfacial properties of enzymatic wheat gluten hydrolyzates determine their foaming behavior. v. 55, p. 155–162, 2016.

WU, Q.; ANDERSSON, R. L.; HOLGATE, T.; JOHANSSON, E.; GEDDE, U. W.; OLSSON, R. T.; HEDENQVIST, M. S. Highly porous flame-retardant and sustainable biofoams based on wheat gluten and in situ polymerized silica. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 48, p. 20996–21009, 2014. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TA04787G>>.

YU, M. A.; DAMODARAN, S. Kinetics of destabilization of soy protein foams. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, n.9, pp. 1563-1567, 1991.

DISCUSSÃO GERAL

Diversos aspectos referentes à modificação das propriedades físico-químicas e moleculares do glúten pela ação de uma transglutaminase obtida de uma nova fonte microbiana foram discutidas neste trabalho. As proteínas do glúten são responsáveis pela viscoelasticidade em massas ou formação de bolhas de ar no pão. Por isso, estes sistemas foram escolhidos para avaliar o potencial da SB6 de melhorar a funcionalidade das proteínas do glúten.

A caracterização das enzimas mostrou que estas possuem propriedades bioquímicas distintas. A TG comercial apresentou atividade ótima a 40°C e entre os valores de pH 5,5 e 6,0. A SB6 apresentou atividade ótima entre 35 e 40 °C e pH 6,5. Estudo de espectrofotometria na região do infravermelho também mostraram diferenças estruturais entre as enzimas, com SB6 apresentando maior teor de folhas- β . O impacto da TG comercial e da SB6 foram comparativamente estudados em massas de farinha de trigo, à base de gliadina e de glutenina. As propriedades de mistura mostraram que a adição de 1,10 U/g de TG comercial aumentou a força das massas, mas o mesmo não foi observado para a SB6. A influência das TGs foi mais evidente nas massas preparadas com a fração rica em glutenina do que em massas de farinha de trigo. As respostas dos experimentos mostram que o efeito da TG nas propriedades das proteínas do trigo nestes sistemas variou em função da concentração de enzima e da fonte. Porém, massas obtidas das frações ricas em gliadina não sofreram influência significativa das TGs ($p > 0,05$).

A severidade do procedimento de separação do glúten também mostrou ter grande impacto sobre a qualidade da massa à base de glúten de trigo. A comparação das características das massas à base de glúten, sem e com a adição da TG comercial e SB6 mostrou que condições de processamento podem limitar a polimerização promovida pela TG. Os parâmetros que descrevem o desenvolvimento do glúten mostram que a estrutura proteica do glúten EB está mais susceptível a hidratação e conseqüentemente, desenvolvimento adequado da massa. Os resultados de HPLC e da curva mixográfica foram combinados na análise de componentes principais que mostraram que o tipo de preparação enzimática utilizada influenciou no desenvolvimento da estrutura polimérica. A massa contendo TG comercial mostrou ser mais forte que a massa adicionada de SB6, porém a adição de SB6 resultou na inclusão de moléculas de gliadina em uma rede proteica

mais complexa em massas de glúten obtido pelo processo brando de separação. A adição de TG não teve efeito sobre a polimerização da massa à base de glúten obtido industrialmente.

Espumas à base de glúten têm sido recentemente estudadas sob diversos aspectos devido ao potencial que possuem como substitutos de diversos ingredientes na indústria de alimentos. Em trabalhos anteriores com glúten de trigo foi ressaltada a importância da gliadina na capacidade de formação de espuma. Com o intuito de explorar novas funcionalidades, o tratamento com TG produzida por *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6) foi estudado e comparado a um controle. Além disso, são escassos os trabalhos que mostrem a estrutura 3-D interna de espumas à base de gliadina. Como sugerido por outros autores, a adição de plasticizantes foi explorada e seu efeito avaliado na polimerização proteica e modificação da morfologia das espumas. Os resultados mostram que na concentração de 2,4% a SB6 polimerizou eficazmente as proteínas, o que contribuiu para a expansão do volume interno das células. Para melhor entender a uniformidade das espumas, as áreas das seções transversais das células foram avaliadas em termos de distribuição de frequência. Os resultados mostraram que a área média transversal de 66,3% das células analisadas da amostra 2-Glia-TG foi de aproximadamente $6,27 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, que é aproximadamente o dobro do tamanho das células de espumas não-tratadas enzimaticamente. A adição de SB6 também aumentou a porosidade das espumas tratadas, além de resultar em uma região lamelar aparentemente mais fina e frágil que nas espumas não-tratadas com a enzima TG. Desta forma o mecanismo sugerido para o efeito da SB6 neste sistema se baseia na intensificação das propriedades anfífilas das proteínas. A polimerização tem por característica reduzir a solubilidade das proteínas do glúten. Paralelamente, a TG catalisa a desaminação dos resíduos de glutamina devido ao baixo conteúdo de lisina das gliadinas, intensificando a repulsão eletrostática e a desnaturação proteica na região interfásica.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo, pela primeira vez, foi demonstrada a capacidade da SB6 em formar ligações cruzadas nas proteínas do glúten de trigo quando processadas em diferentes tipos de matrizes. Uma vez que o Brasil é detentor de uma extensa biodiversidade, os resultados obtidos representam um importante avanço no conhecimento da aplicabilidade de enzimas produzidas por micro-organismos isolados de solos brasileiros. Foi demonstrado que a preparação enzimática SB6 obtida de *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 é bioquimicamente diferente da TG comercial, contribuindo eficazmente para a polimerização de proteínas em massas de trigo. O impacto das TGs estudadas variou em função da fração proteica do trigo, concentração e fonte da enzima. A SB6 aumentou eficazmente o teor de proteínas não-extraíveis nos sistemas analisados. Massas de glúten de trigo obtido por um processo industrial não são significativamente influenciadas pelas TGs. Proteínas em massas de glúten de trigo obtido por um processo brando de extração são eficazmente polimerizadas pela SB6. O tratamento com SB6 melhorou as propriedades de espuma da gliadina, promovendo a expansão do espaço intracelular. Pode-se afirmar que este estudo contribuiu para demonstrar que a SB6 é uma enzima com potencial para ser explorada comercialmente dentro do contexto da indústria de panificação. Em trabalhos futuros, a investigação da capacidade da SB6 em polimerizar proteínas em outros sistemas alimentícios, como cárneos e lácteos, pode ser relevante para ampliar e determinar o espectro de aplicabilidade da enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALAMI, M.; LEELAVATHI, K. Effect of microbial transglutaminase on spaghetti quality. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. C306–C312, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2008.00741.x>>.

AGYARE, K. K.; ADDO, K.; XIONG, Y. L. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 72–81, 2009.

ALLEONI CARRARO, A. C. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. **Sciencia Agricola**, v. 63, n. 3, p. 291–298, 2006.

ANDREUCCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1113–1121, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.010>>.

ANVISA. Resolução RDC nº 53, de 07 de outubro de 2014. **Anvisa**, v. 2014, 2014.

AUTIO, K.; KRUIUS, K.; KNAAPILA, A.; GERBER, N.; FLANDER, L.; BUCHERT, J. Kinetics of transglutaminase-induced cross-linking of wheat proteins in dough. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1039–1045, 2005.

BAGAGLI, M. P.; JAZAERI, S.; BOCK, J. E.; SEETHARAMAN, K.; SATO, H. H. Effect of transglutaminase, citrate buffer, and temperature on a soft wheat flour dough system. **Cereal Chemistry**, v. 91, n. 5, p. 460–465, 2014.

BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 211–217, abr. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381200391X>>.

BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Biochemical and functional properties of wheat gliadins: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 357–368, 23 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2012.654863>>.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2007.

BASMAN, A.; KÖKSEL, H.; NG, P. K. Effects of increasing levels of transglutaminase on the rheological properties and bread quality characteristics of two wheat flours. **European Food Research and Technology**, v. 215, n. 5, p. 419–424, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-002-0573-3>>.

BAUER, N.; KOEHLER, P.; WIESER, H.; SCHIEBERLE, P. Studies on effects of

microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat . I . **Biochemical Analysis**. v. 80, n. 6, p. 781–786, 2003.

BECK, M.; JEKLE, M.; SELMAIR, P. L.; KOEHLER, P.; BECKER, T. Rheological properties and baking performance of rye dough as affected by transglutaminase. **Journal of Cereal Science**, v. 54, n. 1, p. 29–36, 2011.

BELTON, P. S. Mini review: on the elasticity of wheat gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 29, n. 2, p. 103–107, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521098902272>>.

BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Effect of fatty acids and “Brazilian elemi” on composite films based on gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 73–82, 2005.

BLOMFELDT, T. O. J.; KUKTAITE, R.; JOHANSSON, E.; HEDENQVIST, M. S. Mechanical properties and network structure of wheat gluten foams. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1707–1715, 2011.

BLOMFELDT, T. O. J.; KUKTAITE, R.; PLIVELIC, T. S.; RASHEED, F.; JOHANSSON, E.; HEDENQVIST, M. S. Novel freeze-dried foams from glutenin- and gliadin-rich fractions. **RSC Advances**, v. 2, n. 16, p. 6617, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ra20946b>>.

BOS, M. A.; DUNNEWIND, B.; VAN VLIET, T. Foams and surface rheological properties of β -casein, gliadin and glycinin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, n. 1–4, p. 95–105, 2003.

BRABEC, D. L.; SHOGREN, M. D.; ROUSSER, R. Mixogram analysis based on mixograph dynamics. **Cereal Foods World**, v. 47, n. 3, p. 98–104, 2002.

BRUYNINCKX, K.; JANSSENS, K. J. A.; DELCOUR, J. A.; SMET, M. The effect of cross-linking additives on the structure and properties of glassy wheat gluten material. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 38–48, 2016.

BRZOZOWSKI, B. Immunoreactivity of wheat proteins modified by hydrolysis and polymerisation. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 7, p. 1025–1040, 2016.

CABALLERO, P. A.; GÓMEZ, M.; ROSELL, C. M. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 42–53, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877406006376>>.

CERESINO, E. B.; DE MELO, R. R.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M. S.; ZUCCHI, T. D.; JOHANSSON, E.; SATO, H. H. Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. **Food Chemistry**, v. 241, p. 403–410, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617314668>>. Acesso em:

12 set. 2017.

CHANG, Y. H.; SHIAU, S. Y.; CHEN, F. B.; LIN, F. R. Effect of microbial transglutaminase on the rheological and textural characteristics of black soybean packed tofu coagulating with agar. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 1107–1112, 2011.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 612–618, 2007.

CUI, L.; YUAN, J.; WANG, P.; SUN, H.; FAN, X.; WANG, Q. Facilitation of α -polylysine in TGase-mediated crosslinking modification for gluten and its effect on properties of gluten films. **Journal of Cereal Science**, v. 73, p. 108–115, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521016302399>>.

DAY, L.; AUGUSTIN, M. A.; BATEY, I. L.; WRIGLEY, C. W. Wheat-gluten uses and industry needs. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 2, p. 82–90, 2006.

DELCOUR, J. A.; JOYE, I. J.; PAREYT, B.; WILDERJANS, E.; BRIJS, K.; LAGRAIN, B. Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 469–492, 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-022811-101303>>.

DEMIRKESEN, I.; KELKAR, S.; CAMPANELLA, O. H.; SUMNU, G.; SAHIN, S.; OKOS, M. Characterization of structure of gluten-free breads by using X-ray microtomography. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 37–44, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.002>>.

DRAGO, S. R.; GONZÁLEZ, R. J. Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, n. 4, p. 269–273, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856400000345>>.

DUBE, M.; SCHÄFER, C.; NEIDHART, S.; CARLE, R. Texturisation and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 2, p. 287–299, 2 maio 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00217-006-0401-2>>.

DURAN, R.; JUNQUA, M.; SCHMITTER, J. M.; GANCET, C.; GOULAS, P. Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from *Streptoverticillium cinnamoneum* CBS 683.68. **Biochimie**, v. 80, n. 4, p. 313–319, 1998.

EWART, J. A. D. Glutenin structure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, n. 5, p. 482–492, 1979.

FÆRGEMAND, M.; QVIST, K. B. Transglutaminase: effect on rheological properties,

microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 3, p. 287–292, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X97800586>>.

FALCONE, P.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; DEL DUCA, S. Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 265–273, 1993.

FAO. FAO Statistical Yearbook 2012. **FAO Statistical Yearbook 2012. World Food and Agriculture**, p. 18–31, 2012.

FIGUEREDO, R. C. R.; RIBEIRO, F. A. L.; SABADINI, E. Ciência de espumas - aplicação na extinção de incêndios. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 126–130, 1999.

FOEGEDING, E. A.; LUCK, P. J.; DAVIS, J. P. Factors determining the physical properties of protein foams. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2–3 SPEC. ISS., p. 284–292, 2006.

FOLK, J. E. Structure and catalytic properties of hepatic transglutaminase. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 202, n. 1, p. 59–76, 1972.

FOLK, J. E.; COLE, P. W. Transglutaminase: mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. **Biochimica et biophysica acta**, v. 122, n. 2, p. 244–264, 1966.

GASPAR, A. L. C.; DE GÓES-FAVONI, S. P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. **Food Chemistry**, v. 171, p. 315–322, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.019>>.

GAUCHE, C.; BARRETO, P. L. M.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Effect of thermal treatment on whey protein polymerization by transglutaminase: Implications for functionality in processed dairy foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 214–219, 2010.

GAUCHE, C.; TOMAZI, T.; BARRETO, P. L. M.; OGLIARI, P. J.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 239–243, 2009.

GERRARD, J. A. Protein-protein crosslinking in food: Methods, consequences, applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n.12, 2002.

GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W. S.; COURTIN, C. M.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 12–30, 2005.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids - water-vapor permeability and other physical-properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 39–50,

1994. Disponível em: <http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=54&SID=Z1gk1JRTrw3X1tkSpeg&page=1&doc=1>.

GRIFFIN, M.; CASADIO, R.; BERGAMINI, C. M. Transglutaminases: Nature's biological glues. **Biochemical Journal**, v. 368, n. 2, p. 377–396, 2002. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj20021234>>.

GUARIENTI, E. M. **Qualidade industrial de trigo**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 27 p. (Embrapa-CNPT. Documentos, 8)

GUERRA-RODRÍGUEZ, E.; VÁZQUEZ, M. Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 4, p. 784–791, 2014.

GUPTA, R. B.; BATEY, I. L.; MACRITCHIE, F. Relationships between protein-composition and functional-properties of wheat flours. **Cereal Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 125–131, 1992.

GUPTA, R. B.; KHAN, K.; MACRITCHIE, F. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. **Journal of Cereal Science**, v. 18, n. 1, p. 23–41, jul. 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521083710313>>.

GUPTA, R. B.; SHEPHERD, K. W.; MACRITCHIE, F. Genetic control and biochemical properties of some high molecular weight albumins in bread wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 13, n. 3, p. 221–235, 1991.

HAYMAN, D.; SIPES, K.; HOSENEY, R. C.; FAUBION, J. M. Factors controlling gas cell failure in bread dough. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 585–589, 1998.

HERSKOVITS, T. T.; GADEGBEKU, B.; JAILLET, H. On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 10, p. 2588–2598, 1970.

HO, M.-L.; LEU, S.-Z.; HSIEH, J.-F.; JIANG, S.-T. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptoverticillium ladakanum*. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 1, p. 76–80, 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15959.x>>.

HUSSAIN, A.; LARSSON, H.; KUKTAITE, R.; PRIETO-LINDE, M. L.; JOHANSSON, E. Towards the understanding of bread-making quality in organically grown wheat: Dough mixing behaviour, protein polymerisation and structural properties. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 3, p. 659–666, 2012.

JIN, M.; HUANG, J.; PEI, Z.; HUANG, J.; GAO, H.; CHANG, Z. Purification and characterization of a high-salt-resistant microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 6–11, 2016.

JOHANSSON, E. Quality evaluation of D-zone omega gliadins in wheat. **Plant Breeding**, v. 115, n. 1, p. 57–62, 1996. Disponível em: <<http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030463307&partnerID=40>>.

JOHANSSON, E.; KUKTAITE, R.; ANDERSSON, A.; PRIETO-LINDE, M. L. Protein polymer build-up during wheat grain development: Influences of temperature and nitrogen timing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2005.

JOHANSSON, E.; MALIK, A. H.; HUSSAIN, A.; RASHEED, F.; NEWSON, W. R.; PLIVELIC, T.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; KUKTAITE, R. Wheat gluten polymer structures: The impact of genotype, environment, and processing on their functionality in various applications. **Cereal Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 367–376, 2013.

JOHANSSON, E.; PRIETO-LINDE, M. L.; JONSSON, J. O. Effects of wheat cultivar and nitrogen application on storage protein composition and breadmaking quality. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 19–25, 2001.

KAUSHIK, R.; KUMAR, N.; SIHAG, M. K.; RAY, A. Isolation, characterization of wheat gluten and its regeneration properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5930–5937, 27 set. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13197-014-1690-2>>.

KAYSERILIOĞLU, B. Ş.; BAKIR, U.; YILMAZ, L.; AKKAŞ, N. Drying temperature and relative humidity effects on wheat gluten film properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 964–968, fev. 2003. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0205817>>.

KHAN, K.; BUSHUK, W. Studies of glutenin. XIII. Gel filtration, isoelectric focusing and amino acid composition studies. **Cereal Chem**, v. 56, n. 6, p. 505–512, 1979.

KHATKAR, B. S.; BARAK, S.; MUDGIL, D. Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 53, p. 38–41, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.002>>.

KHATKAR, B. S.; BELL, A. E.; SCHOFIELD, J. D. The dynamic rheological properties of gluteins and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 22, n. 1, p. 29–44, jul. 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521005800050>>.

KHATKAR, B. S.; FIDO, R. J.; TATHAM, A. S.; SCHOFIELD, J. D. Functional properties of wheat gliadins. I. Effects on mixing characteristics and bread making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 35, n. 3, p. 299–306, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521001904291>>.

KIELISZEK, M.; MISIEWICZ, A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. **Folia microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 241–250, 2014.

KIM, Y. S.; HUANG, W.; DU, G.; PAN, Z.; CHUNG, O. Effects of trehalose, transglutaminase, and gum on rheological, fermentation, and baking properties of frozen dough. **Food Research International**, v. 41, n. 9, p. 903–908, 2008.

KUKTAITE, R.; LARSSON, H.; JOHANSSON, E. Variation in protein composition of wheat flour and its relationship to dough mixing behaviour. **Journal of Cereal Science**, v. 40, n. 1, p. 31–39, 2004.

KUKTAITE, R.; NEWSON, W. R.; RASHEED, F.; PLIVELIC, T. S.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Monitoring nanostructure dynamics and polymerization in glycerol plasticized wheat gliadin and glutenin films: relation to mechanical properties. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 6, p. 2998–3007, 2016.

KUKTAITE, R.; PLIVELIC, T. S.; CERENIUS, Y.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; MARTTILA, S.; IGNELL, R.; POPINEAU, Y.; TRANQUET, O.; SHEWRY, P. R.; JOHANSSON, E. Structure and morphology of wheat gluten films: From polymeric protein aggregates toward superstructure arrangements. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1438–1448, 2011.

KURASHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSU, Y. Transglutaminase: its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v. 17, n. 2, p. 221–246, 2001. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/FRI-100001258>>.

LAMBERT, J.; CANTAT, I.; DELANNAY, R.; RENAULT, A.; GRANER, F.; GLAZIER, J. A.; VERETENNIKOV, I.; CLOETENS, P. Extraction of relevant physical parameters from 3D images of foams obtained by X-ray tomography. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 263, n. 1–3 SPEC. ISS., p. 295–302, 2005.

LARRE, C.; CHIARELLO, M.; BLANLOEIL, Y.; CHENU, M.; GUEGUEN, J. Gliadin modifications catalyzed by guinea pig liver transglutaminase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 17, n. 4, p. 267–282, 1993.

LARRÉ, C.; DENERY-PAPINI, S.; POPINEAU, Y.; DESHAYES, G.; DESSERME, C.; LEFEBVRE, J. Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 121–127, 2000.

LÉTANG, C.; PIAU, M.; VERDIER, C. Characterization of wheat flour water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. **Journal of Food Engineering**, v. 41, n. 2, p. 121–132, 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877499000825>>.

LI, M.; WANG, Y.; MA, F.; ZENG, J.; CHANG, J.; CHEN, M.; LI, K.; YANG, G.; WANG, Y.; HE, G. Effect of extra cysteine residue of new mutant 1Ax1 subunit on the functional properties of common wheat. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7510, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-07541-w>>.

LORAND, L.; GRAHAM, R. M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 140–

156, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm1014>>.

MACEDO, J. A.; FAZANI CAVALLIERI, A. L.; LOPES DA CUNHA, R.; SATO, H. H. The effect of transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 10, p. 673–679, 2010.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 618–626, 2007.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. A comparative biochemical characterization of microbial transglutaminases: commercial vs. a newly isolated enzyme from *Streptomyces* sp. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 308–314, 2010.

MACRITCHIE, F. Baking quality of wheat flours. **Advances in Food Research**, v. 29, p. 201–277, 1984.

MACRITCHIE, F.; SINGH, H. **Polymer Concepts Applied to Gluten Behaviour in Dough**. In: LAFIANDRA, Domenico; MASCI, S.; D'OVIDIO, R.. The Gluten Proteins. Gateshead: Athenaeum Press Ltd, 2004. p. 227-230.

MALIK, A. H.; KUKTAITE, R.; JOHANSSON, E. Combined effect of genetic and environmental factors on the accumulation of proteins in the wheat grain and their relationship to bread-making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 2, p. 170–174, mar. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2012.09.017>>.

MARINIELLO, L.; PORTA, R.; SORRENTINO, A.; GIOSAFATTO, C. V. L.; ROSSI MARQUEZ, G.; ESPOSITO, M.; DI PIERRO, P. Transglutaminase-mediated macromolecular assembly: Production of conjugates for food and pharmaceutical applications. **Amino Acids**, v. 46, n. 3, p. 767-776, 2014.

MARTINANT, J. P.; NICOLAS, Y.; BOUGUENNEC, A.; POPINEAU, Y.; SOULNIER, L.; BRANLARD, G. Relationships between Mixograph parameters and indices of wheat grain quality. **Journal of Cereal Science**, v. 27, n. 2, p. 179–189, 1998. Disponível em: <isi:000073039200008>.

MARX, C. K.; HERTEL, T. C.; PIETZSCH, M. Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat-sensitive variants. **Journal of Biotechnology**, v. 136, n. 3–4, p. 156–162, 2008.

MASCI, S.; ROVELLI, L.; KASARDA, D. D.; VENSEL, W. H.; LAFIANDRA, D. Characterisation and chromosomal localisation of C-type low-molecular-weight glutenin subunits in the bread wheat cultivar Chinese Spring. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 2–3, p. 422–428, 2002.

MCDONALD, C. E.; PENCE, J. W. Wheat gliadin in foams for food products. **Food Technology**, p. 141–144, 1961.

MELO, R. R. de. **Produção e caracterização bioquímica de uma nova transglutaminase microbiana**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2013.

MITA, T.; ISHIDA, E.; MATSUMOTO, H. Physicochemical studies on wheat protein foams. II. Relationship between bubble size and stability of foams prepared with gluten and gluten components. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 64, n. 1, p. 143–153, 1978.

MOREIRA-ASCARRUNZ, S.; LARSSON, H.; PRIETO-LINDE, M.; JOHANSSON, E. Mineral nutritional yield and nutrient density of locally adapted wheat genotypes under organic production. **Foods**, v. 5, n. 4, p. 89, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2304-8158/5/4/89>>.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 5, p. 204–210, 1998.

MUJOO, R.; NG, P. K. W. Identification of wheat protein components involved in polymer formation on incubation with transglutaminase. **Cereal Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 703–706, 2003.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 82–87, abr. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861707003736>>.

MUNEER, F.; ANDERSSON, M.; KOCH, K.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; PLIVELIC, T. S.; MENZEL, C.; RHAZI, L.; KUKTAITE, R. Innovative gliadin/glutenin and modified potato starch green composites: chemistry, structure, and functionality induced by processing. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 12, p. 6332–6343, 2016. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssuschemeng.6b00892>>.

MUNEER, F.; ANDERSSON, M.; KOCH, K.; MENZEL, C.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; PLIVELIC, T. S.; KUKTAITE, R. Nanostructural morphology of plasticized wheat gluten and modified potato starch composites: relationship to mechanical and barrier properties. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 3, p. 695–705, 2015.

NAWROCKA, A.; SZYMASKA-CHARGOT, M.; MIS, A.; WILCZEWSKA, A. Z.; MARKIEWICZ, K. H. Aggregation of gluten proteins in model dough after fibre polysaccharide addition. **Food Chemistry**, v. 231, p. 51–60, 2017.

ÖRNEBRO, J.; NYLANDER, T.; ELIASSON, A. C.; SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S.; GILBERT, S. M. The behaviour of the high molecular-weight glutenin subunit 1Dx5, the 58 kDa central repetitive domain and α -gliadins at the air-aqueous interface. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 2, p. 147–156, 2003.

PAULY, A.; PAREYT, B.; DE BRIER, N.; FIERENS, E.; DELCOUR, J. A. Starch

isolation method impacts soft wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Claire) starch puroindoline and lipid levels as well as its functional properties. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 2, p. 464–469, set. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521012001208>>.

PAYNE, P. I.; HOLT, L. M.; LAWRENCE, G. J. Detection of a novel high molecular weight subunit of glutenin in some Japanese hexaploid wheats. **Journal of Cereal Science**, v. 1, n. 1, p. 3–8, 1983.

PIROZI, M. R.; MARGIOTTA, B.; LAFIANDRA, D.; MACRITCHIE, F. Composition of polymeric proteins and bread-making quality of wheat lines with allelic HMW-GS differing in number of cysteines. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 1, p. 117–122, 2008.

PLÁCIDO, D.; FERNANDES, C. G.; ISIDRO, A.; CARRONDO, M. A.; HENRIQUES, A. O.; ARCHER, M. Auto-induction and purification of a *Bacillus subtilis* transglutaminase (Tgl) and its preliminary crystallographic characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 59, n. 1, p. 1–8, 2008.

QIN, X. S.; SUN, Q. Q.; ZHAO, Y. Y.; ZHONG, X. Y.; MU, D. D.; JIANG, S. T.; LUO, S. Z.; ZHENG, Z. Transglutaminase-set colloidal properties of wheat gluten with ultrasound pretreatments. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 39, n. February, p. 137–143, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.04.027>>.

QUESTER, S.; DAHESH, M.; STREY, R. Microcellular foams made from gliadin. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, n. 9, p. 2385–2389, 2014.

QUESTER, S.; KLEMMER, H. F. M.; STREY, R. Towards gliadin nanofoams. **Colloid and Polymer Science**, v. 295, n. 1, p. 267–275, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00396-016-3995-3>>.

RAM, S.; DAWAR, V.; SINGH, R. P.; SHORAN, J. Application of solvent retention capacity tests for the prediction of mixing properties of wheat flour. **Journal of Cereal Science**, v. 42, n. 2, p. 261–266, 2005.

RASHEED, F. **Tailoring the Structure-Function Relationship in Wheat Gluten**. Swedish University of Agricultural Sciences 2015. 2015.

RASHEED, F.; HEDENQVIST, M. S.; KUKTAITE, R.; PLIVELIC, T. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Mild gluten separation - A non-destructive approach to fine tune structure and mechanical behavior of wheat gluten films. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 90–98, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.007>>.

RASHEED, F.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; PLIVELIC, T. S.; JOHANSSON, E. The use of plants as a “green factory” to produce high strength gluten-based materials. **Green Chemistry**, v. 18, 2016. Disponível em: <www.rsc.org/greenchem>.

RASHEED, F.; NEWSON, W. R.; PLIVELIC, T. S.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M.

S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Macromolecular changes and nano-structural arrangements in gliadin and glutenin films upon chemical modification. Relation to functionality. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 151–159, 2015b.

RASHEED, F.; NEWSON, W. R.; PLIVELIC, T. S.; KUKTAITE, R.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E. Structural architecture and solubility of native and modified gliadin and glutenin proteins: non-crystalline molecular and atomic organization. **The Royal Society of Chemistry**, v. 15, n. 31, p. 13032–7, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817591>>.

RENZETTI, S.; DAL BELLO, F.; ARENDT, E. K. Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 1, p. 33–45, 2008.

RODRIGUEZ-MATEOS, A.; MILLAR, S. J.; BHANDARI, D. G.; FRAZIER, R. A. Formation of dityrosine cross-links during breadmaking. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2761–2766, 2006.

SALT, L. J.; GONZÁLEZ-THUILLIER, I.; CHOPE, G.; PENSON, S.; TOSI, P.; HASLAM, R. P.; SKEGGS, P. K.; SHEWRY, P. R.; WILDE, P. J. Intrinsic wheat lipid composition effects the interfacial and foaming properties of dough liquor. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 211–222, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X17302369>>.

SANTOSA, F. X. B.; PADUA, G. W. Tensile properties and water adsorption of zein sheets plasticized with oleic and linoleic acids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 2070–2074, 1999.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.; BELTON, P. S.; TATHAM, A. S. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1418, p. 133–142, 2002. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2001.1024>>.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. a; TATHAM, a S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant cell**, v. 7, n. July, p. 945–956, 1995.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S.; LAZZERI, P. Biotechnology of wheat quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 73, n. 4, p. 397–406, 1997.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 313–340, 1966.

SHIVU, B.; SESHADRI, S.; LI, J.; OBERG, K. A.; UVERSKY, V. N.; FINK, A. L. Distinct β -sheet structure in protein aggregates determined by ATR–FTIR spectroscopy. **Biochemistry**, v. 52, n. 31, p. 5176–5183, 6 ago. 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi400625v>>.

SINGH, H.; MACRITCHIE, F. Application of polymer science to properties of gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 33, n. 3, p. 231–243, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521000903606>>.

SINGH, R Paul; HELDMAN, Dennis. **Introduction to Food Engineering**. 5. ed. Ohio: Academic Press, 2014. 892 p.

SOARES, L. H.; ASSMANN, F.; ZÁCHIA AYUB, M. A. Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 37, n. Pt 3, p. 295–9, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529180>>.

SONG, Y.; ZHENG, Q. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 3, p. 132-138, 2007.

STEFFOLANI, M. E.; PÉREZ, G. T.; RIBOTTA, P. D.; PUPPO, M. C.; LEÓN, A. E. Effect of transglutaminase on properties of glutenin macropolymer and dough rheology. **Cereal Chemistry**, v. 85, n.1, p. 39-43, 2008.

STEFFOLANI, M. E.; RIBOTTA, P. D.; PÉREZ, G. T.; LEÓN, A. E. Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 366–373, 2010.

STORCK, C. R.; DA ROSA ZAVAREZE, E.; GULARTE, M. A.; ELIAS, M. C.; ROSELL, C. M.; GUERRA DIAS, A. R. Protein enrichment and its effects on gluten-free bread characteristics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 346–354, 2013.

SUN, X. D.; ARNTFIELD, S. D. Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate catalyzed by microbial transglutaminase cross-linking. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 25–31, 2011.

SUZUKI, S.; IZAWA, Y.; KOBAYASHI, K.; ETO, Y.; YAMANAKA, S.; KUBOTA, K.; YOKOZEKI, K. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18249137>>.

TAGHI GHARIBZAHEDI, S. M.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; GREINER, R.; GEORGE, S.; ROOHINEJAD, S. Recent advances in the application of microbial transglutaminase crosslinking in cheese and ice cream products: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, out. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017328489>>.

THEWISSEN, B. G.; CELUS, I.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. Foaming properties of wheat gliadin. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 1370–5, 2011.

TILLEY, K. A.; BENJAMIN, R. E.; BAGOROGOZA, K. E.; OKOT-KOTBER, B. M.;

PRAKASH, O.; KWENA, H. Tyrosine cross-links: Molecular basis of gluten structure and function. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2627–2632, 2001.

VAN DER BORGHT, A.; GOESAERT, H.; VERAVERBEKE, W. S.; DELCOUR, J. A. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: Overview of the main processes and the factors involved. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 3, p. 221–237, 2005.

VERBERNE, P.; ZWITSERLOOT, W. A new hydrocyclone process for the separation of starch and gluten from wheat flour. **Starch - Stärke**, v. 30, n. 10, p. 337–338, 1978. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/star.19780301004>>.

VOLKEN DE SOUZA, C. F.; GUIMARÃES VENZKE, J.; HICKMANN FLÔRES, S.; ZÁCHIA AYUB, M. A. 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, 2011.

WANG, J. S.; ZHAO, M. M.; YANG, X. Q.; JIANG, Y. M.; CHUN, C. Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 2, p. 174–179, 2007.

WASHIZU, K.; ANDO, K.; KOIKEDA, S.; HIROSE, S.; MATSUURA, A.; TAKAGI, H.; MOTOKI, M.; TAKEUCHI, K. Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 1, p. 82–87, 1994. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1992/58/1/58_1_82/_pdf>.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 115–119, 2007.

WIESER, H.; KIEFFER, R. Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. **Journal of Cereal Science**, v. 34, n. 1, p. 19–27, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521000903850>>.

WIKSTRÖM, K.; BOHLIN, L. Multivariate analysis as a tool to predict bread volume from mixogram parameters. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 686–690, 1996.

WILDE, P. Foam formation in dough and bread quality. In: **Breadmaking**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 370–399.

WILSON, A. J. **Foams: Physics, Chemistry and Structure**. 1. ed. London: Springer London, 1989.

WOUTERS, A. G. B.; ROMBOUTS, I.; FIERENS, E.; BRIJS, K.; BLECKER, C.; DELCOUR, J. A.; MURRAY, B. S. Foaming and air-water interfacial characteristics of solutions containing both gluten hydrolysate and egg white protein. **Food Hydrocolloids**, set. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X17312997>>.

WOUTERS, A. G. B.; ROMBOUTS, I.; LEGEIN, M.; FIERENS, E.; BRIJS, K.; BLECKER, C.; DELCOUR, J. A. Food hydrocolloids air e water interfacial properties of enzymatic wheat gluten hydrolyzates determine their foaming behavior. v. 55, p. 155–162, 2016.

WRINGLEY, C. W. Giant proteins with flour power. **Nature**, v. 381, p. 738–739, 1996.

WU, Q.; ANDERSSON, R. L.; HOLGATE, T.; JOHANSSON, E.; GEDDE, U. W.; OLSSON, R. T.; HEDENQVIST, M. S. Highly porous flame-retardant and sustainable biofoams based on wheat gluten and in situ polymerized silica. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 48, p. 20996–21009, 2014. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TA04787G>>.

WU, Q.; LINDH, V. H.; JOHANSSON, E.; OLSSON, R. T.; HEDENQVIST, M. S. Freeze-dried wheat gluten biofoams; scaling up with water welding. **Industrial Crops and Products**, v. 97, n. March, p. 184–190, 2017.

XU, J.; BIETZ, J. A.; CARRIERE, C. J. Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1025–1030, 2007.

YASUEDA, H.; KUMAZAWA, Y.; MOTOKI, M. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 11, p. 2041–2045, 1994.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 447–454, 2004.

YU, M. A.; DAMODARAN, S. Kinetics of destabilization of soy protein foams. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 9, p. 1563–1567, 1991.

YU, Y. J.; WU, S. C.; CHAN, H. H.; CHEN, Y. C.; CHEN, Z. Y.; YANG, M. Te. Overproduction of soluble recombinant transglutaminase from *Streptomyces netropsis* in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 523–532, 2008.

ZALM, E. E. J. van der; GOOT, A. J. van der; BOOM, R. M. Influence of process conditions on the separation behaviour of starch–gluten systems. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 4, p. 572–578, dez. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877409002994>>.

ZHANG, D.; YANG, Z. H. U.; CHEN, J. Microbial transglutaminase production: Understanding the mechanism. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 26, n. January, p. 205–222, 2009. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77749268141&partnerID=40&md5=76486551615f94b81437a22e4f3afac9>>.

ZHANG, L.; ZHANG, L.; YI, H.; DU, M.; MA, C.; HAN, X.; FENG, Z.; JIAO, Y.;

ZHANG, Y. Enzymatic characterization of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 in high salt and effect of enzymatic cross-linking of yak milk proteins on functional properties of stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3559–3568, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030212003372>>.

ANEXOS

Anexo - Dados da correlação de Spearman.

	mixing	enztype	enzamount	beh	IHTP	buildup	peaktime
mixing	1 0,0001 30	0 1 30	0 1 30	0,87039 <,0001 30	-0,64721 0,0001 30	-0,68188 <,0001 30	-0,70908 <,0001 30
enztype	0 1 30	1 30	0,55556 0,0014 30	0,4671 0,0093 30	-0,40487 0,0265 30	-0,32878 0,0761 30	-0,31596 0,089 30
enzamount	0 1 30	0,55556 0,0014 30	1 30	0,3633 0,0485 30	-0,40774 0,0253 30	-0,31442 0,0906 30	-0,38203 0,0372 30
beh	0,87039 <,0001 30	0,4671 0,0093 30	0,3633 0,0485 30	1 30	-0,78731 <,0001 30	-0,78194 <,0001 30	-0,79696 <,0001 30
IHTP	-0,64721 0,0001 30	-0,40487 0,0265 30	-0,40774 0,0253 30	-0,78731 <,0001 30	1 30	0,51247 0,0038 30	0,91638 <,0001 30
buildup	-0,68188 <,0001 30	-0,32878 0,0761 30	-0,31442 0,0906 30	-0,78194 <,0001 30	0,51247 0,0038 30	1 30	0,61586 0,0003 30
peaktime	-0,70908 <,0001 30	-0,31596 0,089 30	-0,38203 0,0372 30	-0,79696 <,0001 30	0,91638 <,0001 30	0,61586 0,0003 30	1 30
peakwidth	-0,86757 <,0001 30	-0,0934 0,6235 30	0,01581 0,9339 30	-0,79338 <,0001 30	0,58378 0,0007 30	0,58333 0,0007 30	0,59779 0,0005 30
peakheight	-0,67425 <,0001 30	-0,41353 0,0231 30	-0,31015 0,0953 30	-0,80886 <,0001 30	0,822 <,0001 30	0,74608 <,0001 30	0,74298 <,0001 30
initslope	-0,82048 <,0001 30	-0,39765 0,0295 30	-0,31726 0,0876 30	-0,93541 <,0001 30	0,82515 <,0001 30	0,731 <,0001 30	0,8065 <,0001 30
initwidth	-0,76715 <,0001 30	-0,41592 0,0223 30	-0,34983 0,0581 30	-0,9093 <,0001 30	0,77879 <,0001 30	0,74426 <,0001 30	0,79164 <,0001 30
initbuild	0,75516 <,0001 30	0,27425 0,1425 30	0,27425 0,1425 30	0,82764 <,0001 30	-0,5447 0,0019 30	-0,87231 <,0001 30	-0,66492 <,0001 30
time	-0,70948 <,0001 30	-0,31901 0,0857 30	-0,38799 0,0341 30	-0,80009 <,0001 30	0,9121 <,0001 30	0,62166 0,0002 30	0,99944 <,0001 30
pol	0,1733 0,3598 30	-0,22533 0,2312 30	-0,25404 0,1755 30	0,03821 0,8411 30	-0,19183 0,3099 30	0,14443 0,4464 30	-0,16874 0,3727 30
mon	0,20411 0,2793 30	-0,50951 0,004 30	-0,52099 0,0032 30	-0,07978 0,6752 30	-0,00022 0,9991 30	0,08835 0,6425 30	0,02939 0,8775 30
tot	0,18871 0,318 30	-0,35594 0,0535 30	-0,43057 0,0175 30	-0,02212 0,9076 30	-0,08301 0,6628 30	0,09236 0,6274 30	-0,04497 0,8135 30
et	0,31342 0,0978 29	-0,70982 <,0001 29	-0,25345 0,1846 29	-0,04182 0,8295 29	0,0584 0,7635 29	0,00172 0,9929 29	-0,03697 0,849 29
pro	-0,22269 0,2456	0,22197 0,2472	0,10635 0,5829	-0,07423 0,702	-0,22102 0,2492	0,04755 0,8065	-0,17646 0,3598

	29	29	29	29	29	29	29
prop	-0,28043 0,1406 29	0,1963 0,3074 29	0,23281 0,2242 29	-0,11283 0,5601 29	-0,26044 0,1724 29	0,17593 0,3613 29	-0,09242 0,6335 29
SDS	-0,28868 0,1288 29	-0,14286 0,4597 29	0,21006 0,2741 29	-0,26946 0,1575 29	-0,14784 0,4441 29	0,41148 0,0266 29	-0,06753 0,7278 29
DTT	-0,19795 0,3033 29	-0,19948 0,2995 29	-0,04736 0,8073 29	-0,28232 0,1378 29	0,30602 0,1064 29	0,12394 0,5218 29	0,20382 0,2889 29
Urea	-0,15671 0,4169 29	0,24551 0,1992 29	0,20292 0,2911 29	0,01757 0,9279 29	-0,28631 0,1321 29	0,13478 0,4858 29	-0,16833 0,3827 29
total	0,04124 0,8318 29	-0,66167 <,0001 29	-0,09577 0,6212 29	-0,23506 0,2196 29	0,01552 0,9363 29	0,23703 0,2157 29	-0,03845 0,843 29

	peakwidth	peakheight	initslope	initwidth	initbuild	time	pol
mixing	-0,86757 <,0001 30	-0,67425 <,0001 30	-0,82048 <,0001 30	-0,76715 <,0001 30	0,75516 <,0001 30	-0,70948 <,0001 30	0,1733 0,3598 30
enztype	-0,0934 0,6235 30	-0,41353 0,0231 30	-0,39765 0,0295 30	-0,41592 0,0223 30	0,27425 0,1425 30	-0,31901 0,0857 30	-0,22533 0,2312 30
enzamount	0,01581 0,9339 30	-0,31015 0,0953 30	-0,31726 0,0876 30	-0,34983 0,0581 30	0,27425 0,1425 30	-0,38799 0,0341 30	-0,25404 0,1755 30
beh	-0,79338 <,0001 30	-0,80886 <,0001 30	-0,93541 <,0001 30	-0,9093 <,0001 30	0,82764 <,0001 30	-0,80009 <,0001 30	0,03821 0,8411 30
IHTP	0,58378 0,0007 30	0,822 <,0001 30	0,82515 <,0001 30	0,77879 <,0001 30	-0,5447 0,0019 30	0,9121 <,0001 30	-0,19183 0,3099 30
buildup	0,58333 0,0007 30	0,74608 <,0001 30	0,731 <,0001 30	0,74426 <,0001 30	-0,87231 <,0001 30	0,62166 0,0002 30	0,14443 0,4464 30
peaktime	0,59779 0,0005 30	0,74298 <,0001 30	0,8065 <,0001 30	0,79164 <,0001 30	-0,66492 <,0001 30	0,99944 <,0001 30	-0,16874 0,3727 30
peakwidth	1 30	0,67276 <,0001 30	0,74346 <,0001 30	0,6961 <,0001 30	-0,65192 <,0001 30	0,5969 0,0005 30	-0,19579 0,2998 30
peakheight	0,67276 <,0001 30	1 30	0,78896 <,0001 30	0,75682 <,0001 30	-0,58517 0,0007 30	0,73649 <,0001 30	-0,08168 0,6678 30
initslope	0,74346 <,0001 30	0,78896 <,0001 30	1 30	0,9647 <,0001 30	-0,85174 <,0001 30	0,81052 <,0001 30	-0,1186 0,5325 30
initwidth	0,6961 <,0001 30	0,75682 <,0001 30	0,9647 <,0001 30	1 30	-0,88771 <,0001 30	0,79599 <,0001 30	-0,1403 0,4596 30
initbuild	-0,65192 <,0001 30	-0,58517 0,0007 30	-0,85174 <,0001 30	-0,88771 <,0001 30	1 30	-0,6761 <,0001 30	-0,01113 0,9535 30
time	0,5969 0,0005 30	0,73649 <,0001 30	0,81052 <,0001 30	0,79599 <,0001 30	-0,6761 <,0001 30	1 30	-0,16951 0,3705 30
pol	-0,19579 0,2998 30	-0,08168 0,6678 30	-0,1186 0,5325 30	-0,1403 0,4596 30	-0,01113 0,9535 30	-0,16951 0,3705 30	1 30
mon	-0,20448 0,2784 30	-0,02827 0,8821 30	-0,03071 0,872 30	-0,04944 0,7953 30	0,00846 0,9646 30	0,03118 0,8701 30	0,77753 <,0001 30
tot	-0,20047 0,2882 30	-0,07879 0,679 30	-0,06987 0,7137 30	-0,0942 0,6205 30	-0,00089 0,9963 30	-0,04499 0,8134 30	0,91991 <,0001 30
et	-0,05697 0,7691 29	0,06309 0,7451 29	0,0101 0,9585 29	0,03254 0,8669 29	0,05446 0,779 29	-0,03575 0,8539 29	0,1798 0,3507 29
pro	0,07818 0,6868	-0,15155 0,4326	-0,01306 0,9464	-0,10947 0,5719	-0,03894 0,8411	-0,17061 0,3762	0,22069 0,25

	29	29	29	29	29	29	29
prop	0,19115 0,3206 29	-0,15525 0,4213 29	0,0138 0,9434 29	-0,05227 0,7877 29	-0,17891 0,3531 29	-0,08161 0,6739 29	0,11429 0,555 29
SDS	0,41164 0,0265 29	0,15919 0,4095 29	0,13624 0,481 29	0,10059 0,6036 29	-0,30976 0,102 29	-0,0609 0,7537 29	0,167 0,3866 29
DTT	0,36503 0,0515 29	0,35288 0,0604 29	0,23306 0,2237 29	0,24137 0,2072 29	-0,08945 0,6445 29	0,2071 0,2811 29	-0,32069 0,0899 29
Urea	0,2348 0,2202 29	-0,05495 0,7771 29	-0,08229 0,6713 29	-0,10799 0,5771 29	-0,07836 0,6862 29	-0,16741 0,3854 29	-0,00739 0,9697 29
total	0,20274 0,2915 29	0,17496 0,364 29	0,1663 0,3886 29	0,17949 0,3515 29	-0,18383 0,3398 29	-0,03526 0,8559 29	0,22956 0,231 29

	mon	tot	et	pro	prop	SDS	DTT
mixing	0,20411	0,18871	0,31342	-0,22269	-0,28043	-0,28868	-0,19795
	0,2793	0,318	0,0978	0,2456	0,1406	0,1288	0,3033
	30	30	29	29	29	29	29
enztype	-0,50951	-0,35594	-0,70982	0,22197	0,1963	-0,14286	-0,19948
	0,004	0,0535	<,0001	0,2472	0,3074	0,4597	0,2995
	30	30	29	29	29	29	29
enzamount	-0,52099	-0,43057	-0,25345	0,10635	0,23281	0,21006	-0,04736
	0,0032	0,0175	0,1846	0,5829	0,2242	0,2741	0,8073
	30	30	29	29	29	29	29
beh	-0,07978	-0,02212	-0,04182	-0,07423	-0,11283	-0,26946	-0,28232
	0,6752	0,9076	0,8295	0,702	0,5601	0,1575	0,1378
	30	30	29	29	29	29	29
IHTP	-0,00022	-0,08301	0,0584	-0,22102	-0,26044	-0,14784	0,30602
	0,9991	0,6628	0,7635	0,2492	0,1724	0,4441	0,1064
	30	30	29	29	29	29	29
buildup	0,08835	0,09236	0,00172	0,04755	0,17593	0,41148	0,12394
	0,6425	0,6274	0,9929	0,8065	0,3613	0,0266	0,5218
	30	30	29	29	29	29	29
peaktime	0,02939	-0,04497	-0,03697	-0,17646	-0,09242	-0,06753	0,20382
	0,8775	0,8135	0,849	0,3598	0,6335	0,7278	0,2889
	30	30	29	29	29	29	29
peakwidth	-0,20448	-0,20047	-0,05697	0,07818	0,19115	0,41164	0,36503
	0,2784	0,2882	0,7691	0,6868	0,3206	0,0265	0,0515
	30	30	29	29	29	29	29
peakheight	-0,02827	-0,07879	0,06309	-0,15155	-0,15525	0,15919	0,35288
	0,8821	0,679	0,7451	0,4326	0,4213	0,4095	0,0604
	30	30	29	29	29	29	29
initslope	-0,03071	-0,06987	0,0101	-0,01306	0,0138	0,13624	0,23306
	0,872	0,7137	0,9585	0,9464	0,9434	0,481	0,2237
	30	30	29	29	29	29	29
initwidth	-0,04944	-0,0942	0,03254	-0,10947	-0,05227	0,10059	0,24137
	0,7953	0,6205	0,8669	0,5719	0,7877	0,6036	0,2072
	30	30	29	29	29	29	29
initbuild	0,00846	-0,00089	0,05446	-0,03894	-0,17891	-0,30976	-0,08945
	0,9646	0,9963	0,779	0,8411	0,3531	0,102	0,6445
	30	30	29	29	29	29	29
time	0,03118	-0,04499	-0,03575	-0,17061	-0,08161	-0,0609	0,2071
	0,8701	0,8134	0,8539	0,3762	0,6739	0,7537	0,2811
	30	30	29	29	29	29	29
pol	0,77753	0,91991	0,1798	0,22069	0,11429	0,167	-0,32069
	<,0001	<,0001	0,3507	0,25	0,555	0,3866	0,0899
	30	30	29	29	29	29	29
mon	1	0,94705	0,35616	0,06749	-0,04384	-0,02069	-0,30394
	30	<,0001	0,0579	0,728	0,8213	0,9152	0,1089
	30	30	29	29	29	29	29
tot	0,94705	1	0,2468	0,16995	0,04729	0,01478	-0,33202
	<,0001	30	0,1968	0,3781	0,8075	0,9393	0,0785
	30	30	29	29	29	29	29
et	0,35616	0,2468	1	-0,37044	-0,21133	0,26601	0,23892
	0,0579	0,1968	29	0,0479	0,2711	0,1631	0,212
	29	29	29	29	29	29	29
pro	0,06749	0,16995	-0,37044	1	0,82266	0,20591	-0,05764
	0,728	0,3781	0,0479		<,0001	0,2839	0,7665

	29	29	29	29	29	29	29
prop	-0,04384 0,8213 29	0,04729 0,8075 29	-0,21133 0,2711 29	0,82266 <,0001 29	1 0,4601 29	0,4601 0,012 29	0,00197 0,9919 29
SDS	-0,02069 0,9152 29	0,01478 0,9393 29	0,26601 0,1631 29	0,20591 0,2839 29	0,4601 0,012 29	1 0,15714 29	0,15714 0,4156 29
DTT	-0,30394 0,1089 29	-0,33202 0,0785 29	0,23892 0,212 29	-0,05764 0,7665 29	0,00197 0,9919 29	0,15714 0,4156 29	1 0,4156 29
Urea	-0,21429 0,2643 29	-0,15025 0,4366 29	-0,12956 0,503 29	0,33892 0,0721 29	0,47783 0,0088 29	0,60936 0,0005 29	-0,27438 0,1497 29
total	0,20394 0,2886 29	0,17094 0,3753 29	0,82956 <,0001 29	-0,06995 0,7184 29	0,13103 0,4981 29	0,65764 0,0001 29	0,29163 0,1248 29

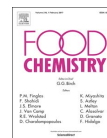
	Urea	total
mixing	-0,15671 0,4169 29	0,04124 0,8318 29
enztype	0,24551 0,1992 29	-0,66167 <,0001 29
enzamount	0,20292 0,2911 29	-0,09577 0,6212 29
beh	0,01757 0,9279 29	-0,23506 0,2196 29
IHTP	-0,28631 0,1321 29	0,01552 0,9363 29
buildup	0,13478 0,4858 29	0,23703 0,2157 29
peaktime	-0,16833 0,3827 29	-0,03845 0,843 29
peakwidth	0,2348 0,2202 29	0,20274 0,2915 29
peakheight	-0,05495 0,7771 29	0,17496 0,364 29
initslope	-0,08229 0,6713 29	0,1663 0,3886 29
initwidth	-0,10799 0,5771 29	0,17949 0,3515 29
initbuild	-0,07836 0,6862 29	-0,18383 0,3398 29
time	-0,16741 0,3854 29	-0,03526 0,8559 29
pol	-0,00739 0,9697 29	0,22956 0,231 29
mon	-0,21429 0,2643 29	0,20394 0,2886 29
tot	-0,15025 0,4366 29	0,17094 0,3753 29
et	-0,12956 0,503 29	0,82956 <,0001 29
pro	0,33892 0,0721	-0,06995 0,7184

	29	29
prop	0,47783 0,0088 29	0,13103 0,4981 29
SDS	0,60936 0,0005 29	0,65764 0,0001 29
DTT	-0,27438 0,1497 29	0,29163 0,1248 29
Urea	1 29	0,25271 0,186 29
total	0,25271 0,186 29	1 29



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: Production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems



Elaine B. Ceresino^{a,*}, Ricardo R. de Melo^{a,1}, Ramune Kuktaite^b, Mikael S. Hedenqvist^c, Tiago D. Zucchi^d, Eva Johansson^{b,1}, Helia H. Sato^{a,1}

^a Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas, Box 6121, 13083-862 Sao Paulo, SP, Brazil

^b Department of Plant Breeding, The Swedish University of Agricultural Sciences, Box 104, SE-23053 Alnarp, Sweden

^c KTH Royal Institute of Technology, School of Chemical and Engineering, Fibre and Polymer Technology, SE-10044 Stockholm, Sweden

^d Department of Research & Development, Agrivalle, 13329-600 Salto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Transglutaminase
Enzyme production
Wheat protein polymers
Cross-linking

ABSTRACT

The popularity of transglutaminase (TG) by the food industry and the variation in functionality of this enzyme from different origins, prompted us to isolate and evaluate a high-yielding TG strain. Through the statistical approaches, Plackett-Burman and response surface methodology, a low cost fermentation media was obtained to produce 6.074 ± 0.019 U mL⁻¹ of TG from a novel source; *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6). Its potential exploitation was compared to commonly used TG, from *Streptomyces mobaraensis*. Biochemical and FT-IR studies indicated differences between SB6 and commercial TG (Biobond™ TG-M). Additions of TG to wheat protein and flour based doughs revealed that the dough stretching depended on the wheat protein fraction, TG amount and its origin. A higher degree of cross-linking of glutenins and of inclusion of gliadin in the polymers was seen for SB6 as compared to commercial TG. Thus, our results support the potential of SB6 to tailor wheat protein properties within various food applications.

1. Introduction

Microbial transglutaminase (TG; E.C. 2.3.2.13) is today one of the most applied enzymes to cross-link proteins. The enzyme is widely used by the industries in producing meat, dairy and bakery products (Kieliszek & Misiewicz, 2014). TG promotes the formation of intra and intermolecular cross-links through the formation of covalent bonds between lysine and glutamine residues in the proteins (Yokoyama, Nio, & Kikuchi, 2004).

The isolation of a strain of *Streptomyces mobaraense* (Washizu et al., 1994) was the first step towards the extensive commercial exploitation of this enzyme. Thereafter, a number of various microbial strains, such as *Streptomyces lydicus* (Færgemand & Qvist, 1997), *Streptomyces cinnamoneum* CBS 683.68 (Duran, Junqua, Schmitter, Gancet, & Goulas, 1998), *Streptomyces* sp. CBMAI 837 (Macedo, Sette, & Sato, 2007), have been found being able to biosynthesize TG extracellularly. The yield and the properties of the synthesized TG have been found to vary

considerably among the strains (Kieliszek & Misiewicz, 2014). Novel TG-producing bacterial strains are still isolated from various environmental sources with an aim to find high-yielding strains (Zhang, Yang, & Chen, 2009). While evaluating novel strains for enzyme production, selection of the most appropriate composition of the media for culturing the specific strains are extremely important (Reddy, Wee, Yun, & Ryu, 2008). The Plackett-Burman design (PB) and response surface methodology (RSM) are powerful statistical tools used to reduce the number of experiments needed through the application of a broad spectrum of interactions among variables to optimize the response of a process (Abd El Aty, Wehaidy, & Mostafa, 2014; Reddy et al., 2008).

Wheat dough extensibility and strength are characters attributed to the main polymeric gluten protein fractions. The amount, type and size distribution of protein present in the wheat flour play a key role in dough development. Genetic and environmental factors are important determinants of the complexity and amount of polymers formed during wheat processing (Johansson et al., 2013). Such polymer differences are

Abbreviations: TG, transglutaminase; RSM, response surface methodology; CCRD, central composite rotatable design; PB, Plackett-Burman design; PP, polymeric proteins

* Corresponding author.

E-mail addresses: elaineceresino@gmail.com (E.B. Ceresino), ricardorodriguesmelo@gmail.com (R.R. de Melo), ramune.kuktaite@slu.se (R. Kuktaite), mikaelhe@kth.se (M.S. Hedenqvist), Tiago.Zucchi@hotmail.com (T.D. Zucchi), Eva.Johansson@slu.se (E. Johansson), heliah@fea.unicamp.br (H.H. Sato).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.010>

Received 19 February 2017; Received in revised form 25 July 2017; Accepted 4 September 2017

Available online 06 September 2017

0308-8146/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

23/01/2018

Gmail - Share your article [FOCH_21679] published in Food Chemistry



Elaine Berger Ceresino <elaineceresino@gmail.com>

Share your article [FOCH_21679] published in Food Chemistry

2 mensagens

Elsevier - Article Status <Article_Status@elsevier.com>

25 de setembro de 2017 11:15

Para: elaineceresino@gmail.com

Please note this is a system generated email from an unmanned mailbox.
If you have any queries we really want to hear from you
via our 24/7 support at <http://service.elsevier.com>

Article title: Transglutaminase from newly isolated Streptomyces sp. CBMAI 1617: production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems

Article reference: FOCH21679

Journal title: Food Chemistry

Corresponding author: Ms. Elaine Berger Ceresino

First author: Ms. Elaine Berger Ceresino

Final version published online: 25-Sep-2017

Full bibliographic details: Food Chemistry 241C (2018) pp. 403-410

DOI information: 10.1016/j.foodchem.2017.09.010

Dear Ms. Ceresino,

We are pleased to inform you that the final version of your article with full bibliographic details is now available online.

To help you access and share your article, we are providing you with the following personal article link, which will provide free access to your article, and is valid for 50 days, until November 14, 2017

<https://authors.elsevier.com/a/1VnMK16Ds1aGLi>

Please use this link to download a personal copy of your article for your own archive. You are also welcome to email the link to your co-authors and colleagues, or post the link on your own homepage, Facebook, Google+, Twitter or other social media profile, to tell your network about your new publication. Anyone who clicks on the link until November 14, 2017, will be taken to the final version of your article on ScienceDirect for free. No sign up or registration is needed - just click and read!

As an author, you may use your article for a wide range of scholarly, non-commercial purposes, and share and post your article online in a variety of ways. For more information, please see www.elsevier.com/copyright.

Kind regards,
Elsevier Author Support

ADVANCING WOMEN

Advancing women in science and libraries in the developing world:

Every year, the Elsevier Foundation provides grants to institutions around the world, with a focus on support for the world's libraries and for scholars in the early stages of their careers. Since 2002, The Elsevier Foundation has awarded more than 60 grants worth millions dollars to non-profit organizations focusing on helping the world's libraries, nurse faculties, and women scholars during their early and mid-careers. Maybe we can help you.

See the latest call for funding applications at: www.elsevierfoundation.org**TRACK YOUR ARTICLE**

To track the status of your article throughout the publication process, please use our article tracking service:

http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html?trk_article=FOCH21679&trk_surname=Ceresino

For detailed article tracking instructions please go to:

http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/5971**HAVE QUESTIONS OR NEED ASSISTANCE?**

For further assistance, please visit our Customer Support site where you search for solutions on a range of topics and find answers for frequently asked questions. You can also talk to our customer support team by phone 24 hours a day



Food Chemistry

Certificate of publication for the article titled:

"Transglutaminase from newly isolated Streptomyces sp. CBMAI 1617: production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems "

Authored by:

**Elaine B.Ceresino, Ricardo R.de Melo, Ramune Kuktaite,
Mikael S.Hedenqvist, Tiago D.Zucchi, Eva Johansson, Helia H.Sato**

Published in:

Volume 241C, 2018, Pages 403-410