

**Hidrólise das proteínas do soro do queijo utilizando a alcalase imobilizada em pó de sabugo de milho****Hydrolysis of cheese whey proteins using immobilized alkali powder from corn cob**

DOI:10.34117/bjdv6n7-281

Recebimento dos originais: 13/06/2020

Aceitação para publicação: 13/07/2020

**Clariana Zanutto Paulino da Cruz**

Doutora em Biotecnologia

Instituição: Unesp de Araraquara

Endereço: Instituto de Química, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Departamento de Biotecnologia.

Cep. 14800-060 Araraquara-SP, Brasil

E-mail: clarianadacruz@gmail.com

**Aline Buda dos Santos Vaz**

Doutora em Biotecnologia

Instituição: Unesp de Araraquara

Endereço: Instituto de Química, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Departamento de Biotecnologia.

Cep. 14800-060 Araraquara-SP, Brasil

E-mail: alinebuda@zootecnista.com.br

**Juliana Cristina Bassan**

Doutora em Ciência dos Alimentos

Instituição: Unesp de Araraquara

Endereço: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Departamento de Alimentos e Nutrição. Cep. 14800-903. Araraquara, SP, Brasil

E-mail: julianacbassan@gmail.com

**Saulo Santesso Garrido**

Doutor em Biotecnologia

Instituição: Unesp de Araraquara

Endereço: Instituto de Química, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Departamento de Biotecnologia.

Cep. 14800-060 Araraquara-SP, Brasil

E-mail: saulosantesso@iq.unesp.br

**Ariela Veloso de Paula**

Doutora em Biotecnologia Industrial

Instituição: EEL/USP

Endereço: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Departamento de Alimentos e Nutrição. Cep. 14800-903. Araraquara, SP, Brasil

E-mail: ariela@fcar.unesp.br

**Rubens Monti**

Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Instituição: Universidade de São Paulo

Endereço: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Departamento de Alimentos e Nutrição. Cep. 14800-903. Araraquara, SP, Brasil

E-mail: montiru@fcfar.unesp.br

**RESUMO**

A hidrólise das proteínas do soro de queijo foi feita a 50° C, pH=9, 100 rpm por 24 h, utilizando o derivado alcalase glioxil pó de sabugo de milho (AGSM) e os resultados comparados com o derivado alcalase glioxil agarose (AGA) e enzima livre (AL). AL apresentou menor  $K_M = 0,243\text{mM}$  e maior grau de hidrólise (DH)=59,63% com relação aos derivados, provavelmente devido aos efeitos difusionais da imobilização, dificultando o acesso do substrato a enzima. AGSM apresentou melhor estabilidade térmica (62 e 15,5 vezes maior do que a AL e AGA respectivamente). A SDS-PAGE demonstrou a ocorrência de hidrólise utilizando a AGSM, além do DH=26,59% e 3,29U/mg. Confirmando esta hidrólise, o perfil cromatográfico mostrou um aumento no número de picos em diferentes tempos de retenção. Resultados semelhantes foram encontrados para AGA, portanto, o SM representa uma fonte inovativa, de baixo custo, para imobilização da alcalase e obtenção de hidrolisados proteicos.

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

**ABSTRACT**

The hydrolysis of cheese whey proteins was carried out at 50° C, pH = 9, 100 rpm for 24 h, using the derivative alkoxase glyoxyl corn cob (AGSM) and the results compared with the derivative alkoxase glyoxyl agarose (AGA ) and free enzyme (AL). AL presented a lower  $K_M = 0.243\text{mM}$  and a higher degree of hydrolysis (DH) = 59.63% in relation to derivatives, probably due to the diffusion effects of immobilization, making it difficult for the substrate to access the enzyme. AGSM showed better thermal stability (62 and 15.5 times greater than AL and AGA respectively). SDS-PAGE demonstrated the occurrence of hydrolysis using AGSM, in addition to DH = 26.59% and 3.29U / mg. Confirming this hydrolysis, the chromatographic profile showed an increase in the number of peaks at different retention times. Similar results were found for AGA, therefore, SM represents an innovative, low-cost source for immobilizing alkalase and obtaining protein hydrolysates.

**Keywords:** Alcalase, cheese whey, protein hydrolysates, multipoint covalent bond, corncob powder.

**1 INTRODUÇÃO**

O soro do leite bovino é um subproduto do processo da fabricação de queijos altamente poluente de grande valor nutricional, devido à presença principalmente de lactose e proteínas. Uma alternativa para minimizar o impacto ambiental e aproveitar as propriedades nutritivas do soro é utilizar este resíduo na obtenção de hidrolisados proteicos (ROHLFES *et al.*, 2014). Estes hidrolisados representam uma fonte rica de nutrientes exercendo impacto positivo sobre a saúde e

as diversas funções do organismo. A maneira mais comum de sua obtenção é por meio da hidrólise de soroproteínas utilizando enzimas proteolíticas (MÖLLER *et al.*, 2008; NAJAFIAN e BABJI, 2014).

A alcalase é uma enzima classificada como uma subtilisina sendo uma serina-protease. Desta forma, é uma endopeptidase que é caracterizada por seu desempenho em altas temperaturas e moderada alcalinidade. Muitos estudos têm provado que a alcalase é a melhor enzima utilizada na obtenção de diversos hidrolisados proteicos (TARDIOLLI *et al.*, 2003; PIU *et al.*, 2014).

A imobilização multipontual de uma enzima consiste na formação de várias ligações covalentes entre uma molécula de enzima e diversos grupos ativos do suporte. A imobilização multipontual covalente da enzima pode melhorar fortemente a estabilidade, a atividade e a seletividade da enzima. Muitas enzimas industriais têm sido altamente estabilizadas por ligação covalente multipontual (GRAZÚ *et al.*, 2010). O sistema hidrolítico com imobilização enzimática é mais viável economicamente que o sistema de enzimas solúveis, pois o processo de imobilização pode ser executado continuamente, possibilitando a reutilização da enzima (GUISÁN, 2006). Ademais, os suportes alternativos denominados lignocelulósicos podem ser utilizados como forma de diminuição de custo.

Os resíduos lignocelulósicos têm sido alvo de diversas pesquisas devido aos problemas ambientais gerados pelo seu descarte indevido. A agarose é muito utilizada como suporte para imobilização de enzimas, devido suas características físico-químicas, mas possui custo elevado. O sabugo de milho (SM) é o principal resíduo formado da indústria de processamento de milho. Desta forma, ressalta-se a importância da utilização do pó de sabugo de milho como suporte inovativo de baixo custo para a imobilização de enzimas. O objetivo deste trabalho foi realizar a hidrólise das proteínas do soro de queijo utilizando a alcalase imobilizada em pó de sabugo de milho e comparar os resultados obtidos com a alcalase livre e a alcalase imobilizada em agarose.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

**Alcalase livre e derivados:** A enzima utilizada neste trabalho foi a Alcalase® adquirida comercialmente da (Merk). A alcalase foi imobilizada em agarose e suporte inovativo pó de sabugo de milho segundo metodologia proposta por Guisan (2006).

**Caracterização cinética da enzima livre e dos derivados. Parâmetros cinéticos:** Os valores da constante de afinidade ( $K_M$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ) da alcalase foram determinados pelo método gráfico de Eadie-Hofstee.

**Inativação térmica e pH ótimo:** Para o ensaio de inativação térmica, a enzima livre e os derivados foram incubados na temperatura de 65° C, em solução tampão fosfato de sódio 100 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7. Em determinados tempos, uma amostra foi retirada, e verificada a atividade enzimática. Para o pH ótimo, as enzimas foram incubadas em sistemas tamponantes, com pH ajustado entre 3,0 e 10. O ensaio de atividade enzimática foi feito usando substrato sintético boc-ala-ONP segundo Tardioli *et al.* (2003).

**Hidrólise das proteínas do soro:** o soro do queijo bovino tratado (dialisado, desengordurado e centrifugado) foi utilizado para a realização da hidrólise das proteínas durante 24 horas por meio de três diferentes ensaios: **AL (alcalase livre):** 0,5 mL de enzima (diluída 300 vezes) em 20 ml de soro a 50° C, pH=9 e agitação 100 rpm (shaker Innova 40). **AGA (alcalase glioxil agarose) e AGSM (alcalase glioxil pó de sabugo de milho):** 0,5 g de derivado em 20 ml de soro a 50° C, pH=9 e agitação 100 rpm (shaker Innova 40).

Caracterização e quantificação dos hidrolisados: **Foram feitas por meio das seguintes análises: grau de hidrólise DH (%) (SPADARO *et al.*, 1979), quantificação de peptídeos e aminoácidos (MCDONALD e CHEN, 1965), determinação de proteínas (BRADFORD, 1976), eletroforese (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) e perfil dos hidrolisados por HPLC-fase reversa.**

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA ENZIMA LIVRE E DOS DERIVADOS

De acordo com a Tabela 1, pode-se observar que a AL apresenta menor valor de  $K_M$  com relação aos derivados, provavelmente devido aos efeitos difusionais provocados pela imobilização, o que dificulta o acesso da enzima ao substrato. Comparando-se os dois derivados, é possível perceber que AGSM apresenta menor valor de  $K_M$ , ou seja, apresenta maior especificidade que AGA. Desta forma, pode-se dizer que a imobilização da alcalase em suporte inovativo pó de sabugo de milho é viável e apresenta maior eficiência catalítica que a AGA. Tanto a enzima livre quanto os derivados apresentaram pH ótimo 9,0. Os resultados para a inativação térmica encontram-se na Figura 1 e Tabela 2 onde é possível observar que o derivado AGSM é 62 vezes mais estável do que a AL e 15,5 vezes mais estável que a AGA. Além disso, o tempo de meia-vida em horas da AL é de 0,5, da AGA, 02 e da AGSM 31. Portanto, pode-se dizer que a imobilização da alcalase em suporte inovativo pó de sabugo de milho é viável, pois apresenta maior estabilidade térmica do que a AL e AGA.

Tabela 1. Caracterização cinética da alcalase comercial.

| Enzima           | Atividade enzimática | K <sub>m</sub> (mM) | V <sub>máx</sub> | pH ótimo | Eficiência catalítica |
|------------------|----------------------|---------------------|------------------|----------|-----------------------|
| Alcalase livre   | 4426U/mL<br>±287,91  | 0,243               | 115,96U/mL       | 9,0      | 477,2                 |
| AGSM (131,8mmol) | 9,54U/g<br>±0,38     | 0,464               | 10,50U/g         | 9,0      | 22,6                  |
| AGA (6 BCL)      | 13,80U/g<br>±0,31    | 1,53                | 25,08U/g         | 9,0      | 16,39                 |

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS HIDROLISADOS

A quantificação dos hidrolisados proteicos do soro do queijo usando alcalase comercial pode ser visualizada na Tabela 2. O maior valor no grau de hidrólise para a AL pode ser explicado pelo fato da enzima livre estar em maior contato com o substrato na solução, além de menor K<sub>M</sub> como visto na Tabela 1. O teor de proteínas do soro foi de 15,04 mg/mL sendo que os hidrolisados apresentaram uma diminuição neste teor após 24 horas de reação, o que pode ser explicado pela possível clivagem das proteínas decorrente da hidrólise.

Figura 1. Inativação térmica a 65° C.

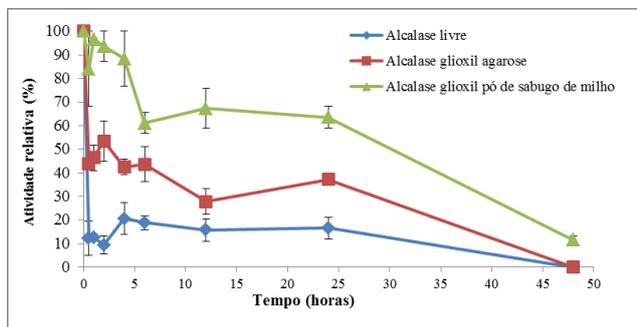
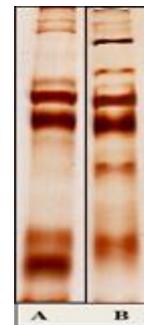


Figura 2. SDS-PAGE do soro (A) e hidrolisados (B).

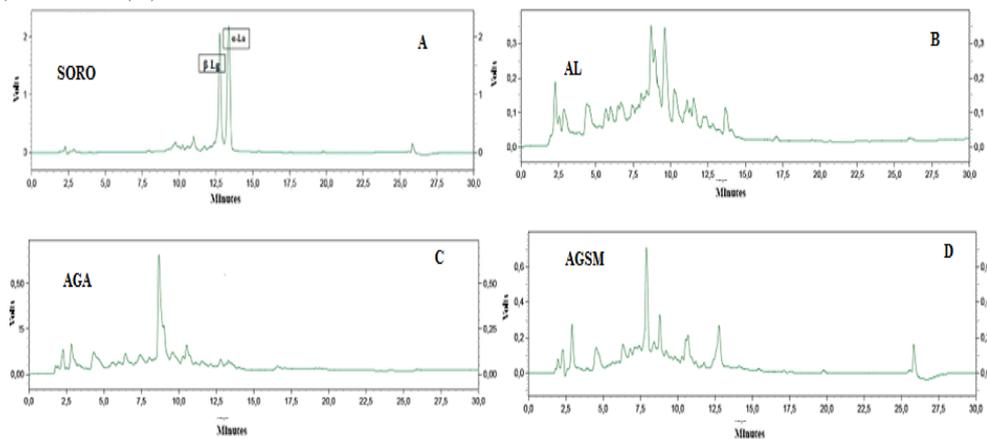


A= soro B= AGSM

Tabela 2. Quantificação dos hidrolisados proteicos após 24 horas de hidrólise, tempo de meia-vida e fator de estabilização da alcalase livre e derivados.

| Enzima | Grau de Hidrólise (%) | Quantificação de peptídeos e aminoácidos (U/mg) | Determinação de Proteínas (mg/ml) | Tempo de meia-vida (horas) | Fator de estabilização |
|--------|-----------------------|---|-----------------------------------|----------------------------|------------------------|
| AGSM   | 26,59±0,87            | 3,29±0,00                                       | 7,05±0,21                         | 31                         | 62                     |
| AL     | 59,63±1,59            | 0,73±0,01                                       | 2,31±0,28                         | 0,5                        | -                      |
| AGA    | 43,88±0,75            | 4,20±0,10                                       | 4,39±0,15                         | 2                          | 4                      |

Figura 3. Cromatogramas de HPLC-fase reversa com detecção UV a 220 nm do soro (A) e hidrolisados utilizando AL (B), AGA (C) e AGSM (D).



## 4 CONCLUSÕES

O processo de hidrólise utilizando AGSM foi eficaz conforme demonstrado por SDS-PAGE, o perfil cromatográfico mostrou um aumento no número de picos em diferentes tempos de retenção, o grau de hidrólise 26,59% e 3,29 U/mg. Resultados semelhantes foram encontrados para AGA, portanto, o SM representa uma fonte inovativa de baixo custo para imobilização da alcalase e obtenção de hidrolisados proteicos.

## REFERÊNCIAS

- Bradford, MM. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248-254.
- Guisán JM. Immobilization of enzymes and cells. Humana Press 2ªed., 2006, 449p.
- Grazú V, Gallego FL, Montes T, Abian O, González R, Hermoso JA, Garcia JL, Mateo C, Guisán JM. 2010. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. *Journal Process Biochemistry* 45: 390-398.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Mcdonald, CE, Chen, LL. 1965. The Lowry modification of the folin reagent for determination of proteinase activity. *Analytical Biochemistry* 10:175-177.
- Möller, NP, Scholz-ahrens, KE, Roos, N, Schrezenmeir, J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition* 47:171-182.

Najafian L, Babji, AS. 2014. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Journal of functional foods* 9:280–289.

Rohlfes, ALB, De Monte BN, Oliveira MSR, Marquardt, L, Weis L, Lopes L, Hochscheid, SL. 2014. Aproveitamento de subproduto de agroindústrias do setor queijeiro para desenvolvimento de produtos alimentícios e redução de impacto ambiental. *Tecno-Lógica* 18:13-18.

Piu LD, Tassoni, A, Serrazanetti, DI, Ferri M, Babini, ETD, Gianotti A. 2014. Exploitation of starch industry liquid by-product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. *Food Chemistry* 155:199–206.

Spadaro AC, Draghetta W, Del Lamma SN, Camargo AC, Greene LJ. 1979. A convenient manual trinitrobenzenesulfonic acid method for monitoring amino acids and peptides in chromatographic column effluents. *Anal Biochem* 96:317-21.

Tardioli PW, Pedroche J, Giordan, RLC, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM. 2003. Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose. *Biotechnology progress* 19:352-360.