

## Hidrólise de concentrado proteico de soro de queijo com tripsina imobilizada em resíduos da indústria cervejeira

ROCHA Cristina<sup>1,2\*</sup>, TEIXEIRA José A.<sup>1</sup>, TORRES Duarte<sup>3</sup>, GONÇALVES M. Pilar<sup>3</sup>, MOTA M. Virgínia T.<sup>4</sup>, FERREIRA Isabel M.P.L.V.O.<sup>4</sup>, OLIVEIRA M. Beatriz P.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Centro de Engenharia Biológica - IBQF, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

<sup>2</sup> Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Apartado 574, 4900 Viana do Castelo, Portugal

<sup>3</sup> REQUIMTE, Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

<sup>4</sup> REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

E-mail: crocha@deb.uminho.pt

### Resumo

Neste trabalho utilizou-se um sub-produto da indústria cervejeira proveniente do malte com um teor elevado em celulose, a *drêche*, como suporte de imobilização para tripsina. Efectuaram-se hidrólises de concentrado proteico de soro de queijo com tripsina imobilizada com diferentes condições de pH e temperatura de forma a determinar os valores óptimos de operação. O perfil dos hidrolisados resultantes foi posteriormente analisado por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa. O valor óptimo de operação com tripsina imobilizada ocorreu a 60 °C, superior à temperatura correspondente com enzima livre. A actividade da enzima imobilizada em *drêche* foi bastante inferior à da enzima livre. O perfil de péptidos obtido com os dois tipos de enzima foi semelhante.

**Palavras chave:** Imobilização de tripsina, *drêche*, hidrólise de proteínas, concentrado proteico de soro de queijo.

### 1. Introdução

O soro de queijo é um efluente produzido em grandes quantidades pela indústria de lacticínios que não pode ser despejado directamente para o ambiente, apresentando a sua utilização para a formulação de novos alimentos vantagens nutricionais, tecnológicas e ambientais. A aplicação de membranas de ultrafiltração e de cromatografia de permuta iónica permite o aproveitamento da fracção proteica do soro de queijo, conduzindo a concentrados proteicos de soro de queijo com teores em proteína que podem variar entre os 35 e os 99 %.

A tripsina é muito utilizada para hidrólise de proteínas sendo interessante o uso de hidrolisados destes concentrados na indústria alimentar, tanto de um ponto de vista nutricional (menos alergenicidade, possível bioactividade, por exemplo) como pelas suas propriedades funcionais (capacidades espumante, gelificante, emulsionante...).

O uso de enzimas imobilizadas em suportes sólidos é vantajoso em relação ao uso de enzimas na forma livre já que permite a sua recuperação do meio de reacção, a sua reutilização e operação em modo contínuo. Os suportes tradicionais incluem sílica porosa, vidro poroso e celulose. A *drêche*, um sub-produto da indústria cervejeira proveniente do malte, com um teor elevado em celulose, é apropriada para uso como suporte para imobilização de enzimas já que, além de possuir as condições necessárias (como estabilidade, rigidez, ausência de limitações difusionais), é barato e de grau alimentar.

Neste trabalho foi efectuada a hidrólise de um concentrado proteico de soro de queijo atomizado comercial (70 %) a 37 °C com tripsina de pâncreas bovino na forma livre e imobilizada em *drêche*. A hidrólise foi monitorizada, ao longo do tempo (3 horas), por consumo de reagente de controlo de pH (hidróxido de sódio) e o perfil dos hidrolisados resultantes foi posteriormente caracterizado por

cromatografia líquida de alta performance em fase reversa. Compararam-se o grau de hidrólise e o perfil de péptidos obtidos com a enzima livre e com a enzima imobilizada em *drêche*. Foram também determinados os valores óptimos de pH e temperatura para operação com a enzima imobilizada.

## 2. Materiais e métodos

Foi utilizado um concentrado de proteínas de soro de queijo atomizado comercial contendo cerca de 70 % de proteínas em base seca (fornecido pela Vetagri Alimentar, S.A., Portugal). A *drêche* foi cedida pela UNICER, S.A., Leça do Balio, Portugal. Os reagentes usados foram todos de grau p.a e foram fornecidos pela Sigma (Espanha). A tripsina de pâncreas porcino (EC 3.4.21.4) com uma actividade de 1800 unidades BAEE/mg sólido foi também fornecida pela Sigma (Espanha).

### 2.1. Imobilização

A *drêche* foi lavada segundo método descrito por Branyik et al. (2001) com ácido clorídrico para hidrolisar o amido residual e hidróxido de sódio para deslenhificar parcialmente. O suporte foi então activado com glutaraldeído a 2,5 % (p/v) durante 15 minutos em tampão fosfato 0,05 M pH 7 à temperatura ambiente, filtrado a vácuo, lavado com tampão e seco à temperatura ambiente para uso posterior.

Para a imobilização da enzima, misturou-se 1 g de suporte com 30 ml de solução tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> 0,02 M (para diminuir autodigestão da enzima) e 80 mg de tripsina; agitou-se suavemente durante a noite a 4 °C, filtrou-se a vácuo e lavou-se várias vezes com tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> 0,02 M. As experiências de imobilização foram realizadas em duplicado.

A quantidade de enzima imobilizada foi determinada pelo método de Bradford, determinando a quantidade de proteína no sobrenadante usando o reagente Coomassie® Plus para teste de proteína (Pierce, EUA).

### 2.2. Hidrólise enzimática

A cinética de hidrólise enzimática de concentrado proteico de soro de queijo foi seguida experimentalmente a temperatura e pH constantes num reactor de 0,05 L, encamisado, fechado, agitado e equipado com sistema de regulação de temperatura e pH. O grau de hidrólise (ou seja, a razão entre o número de ligações peptídicas quebradas e o número total de ligações peptídicas) foi monitorizado em linha pelo método pH-stat, medindo a quantidade de reagente básico consumido (Adler-Nissen, 1985). O pH foi inicialmente ajustado e mantido constante por adição de uma solução de hidróxido de sódio 0,25 M. Foram realizados vários ensaios com 1 g de suporte com enzima imobilizada a pH 8 e diferentes temperaturas (entre 37 e 70 °C) e a temperatura de 37 °C a diferentes valores de pH (entre 7 e 9). Foi também realizada uma experiência a 37 °C e pH 8 com 20 mg de enzima livre. Nas experiências a 37 °C e pH 8 (com enzima livre e imobilizada) retiraram-se amostras ao longo do tempo para análise posterior da degradação das proteínas nativas ( $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina) e da formação de péptidos por cromatografia em fase reversa. Estas amostras foram inactivadas por elevação da temperatura a valores superiores a 80 °C durante cerca de 15 min.

### 2.2. Perfil peptídico dos hidrolisados

As amostras recolhidas foram analisadas por RP-HPLC/UV. Assim, após diluição 1:40 e filtração, injectaram-se numa coluna de fase reversa C18 Symmetry 300, Waters (5 mm, 300 Å, 250 × 4,6 mm<sup>2</sup> i.d.) montada num cromatógrafo líquido KNAUER Maxi Star K 1000 (Alemanha) para promover a separação dos péptidos em função da polaridade das moléculas. O caudal de eluição foi 0,75 mL/min com o seguinte gradiente de eluentes (A, água e 0,1% de ácido trifluoracético; B, acetonitrilo com 0,1% de ácido trifluoracético): 0 a 30 min, 100 a 50% A; 30 a 35 min 50 a 20% A; 35 a 40 min, 20% A. Nestas condições o tempo de retenção da  $\alpha$ -lactalbumina foi de 29,9 min e o tempo de retenção da  $\beta$ -lactoglobulina 31,7 min. A monitorização foi realizada a 215 nm e à temperatura de 35 °C.

## 3. Resultados e discussão

Da análise da Figura 1 pode-se concluir que a temperatura óptima para a hidrólise de concentrado proteico de soro de queijo pela tripsina imobilizada em *drêche* é 60 °C e a temperatura de inactivação é 70 °C (a esta temperatura, a variação de pH parou ao fim de 3 min). O melhor valor de pH obtido foi 8. Este resultado está próximo do obtido na literatura para a enzima livre, pelo que se pode concluir que a

imobilização não provocou grandes alterações no valor óptimo de pH. Segundo Godfrey (1996), esse óptimo será de 8,5 e, neste caso, apenas foram testados os valores 8 e 9. Por outro lado, o mesmo autor refere a temperatura de 50 °C como óptimo de operação, tendo-se obtido uma temperatura um pouco superior com a enzima imobilizada. Este facto poderá indicar um aumento de estabilidade térmica da tripsina com a imobilização, permitindo o seu uso numa gama mais alargada de temperaturas.

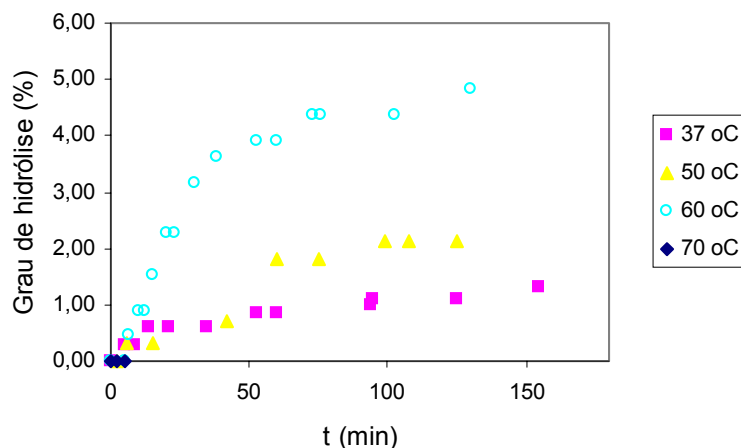


Figura 1: Hidrólise enzimática do concentrado proteico de soro de queijo por tripsina imobilizada em função da temperatura

O grau de hidrólise obtido com enzima livre (20 mg a 37 °C e pH 8) ao fim de 3 horas foi de 6 % enquanto que o obtido com 1 g de suporte com enzima imobilizada nas mesmas condições foi de apenas 1,5 %. Contudo, as análises à proteína no sobrenadante após a imobilização em suporte activado com glutaraldeído indicam uma eficiência de cerca de 60-70 %, o que conduziria a 40/50 mg de enzima por grama de *drêche*. As condições necessárias para a ligação covalente de uma enzima a um suporte são tais que, geralmente, alguma perda de actividade é inevitável. Por outro lado, a acessibilidade do substrato aos sítios activos da enzima pode ter sido diminuída por obstrução parcial daqueles ou por maior dificuldade no acesso, já que o suporte é muito poroso e a enzima pode estar imobilizada no interior dos seus poros. A ligação ao suporte pode também ter alterado a conformação do sítio activo. Esta actividade reduzida na enzima imobilizada pode também ser justificada por possíveis perdas de enzima adsorvida ao suporte durante as lavagens. Tal pode indicar, para além de ligações covalentes, a presença de ligações não covalentes entre o suporte activado e a enzima. Os valores obtidos para a quantidade de enzima imobilizada estão dentro das gamas encontradas na literatura para imobilização de tripsina. Por exemplo, Kumar *et al.* (1998) conseguiram imobilizar 75 a 86% de proteína por ligação covalente a um polímero (Eudragit S-100) e 30 % por adsorção física ao mesmo polímero. Huckel *et al.* (1996) conseguiram imobilizar 29 % da proteína em sílica porosa. Sears *et al.* (1993) obtiveram 38 mg de proteína imobilizada por grama de suporte (vidro com tamanho de poros controlado). Este valor é muito elevado, sobretudo considerando que conseguiram imobilizar 95 % da proteína. Contudo, também aqui apenas 4 mg de enzima por grama de suporte estavam activas.

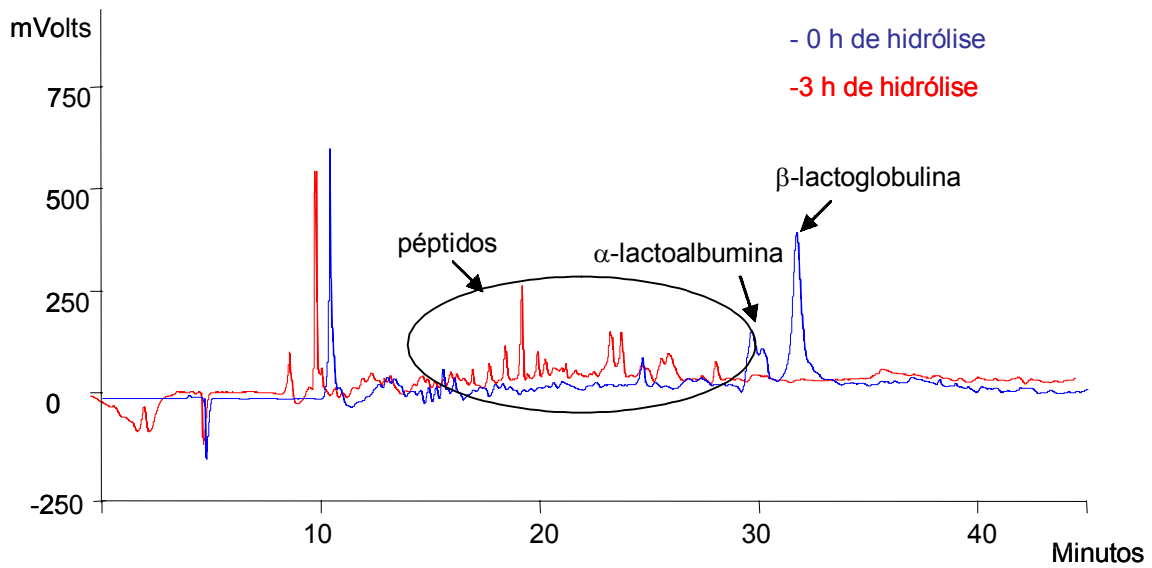


Figura 2: Perfil de proteínas e péptidos obtidos com tripsina livre a 37 °C e pH 8.

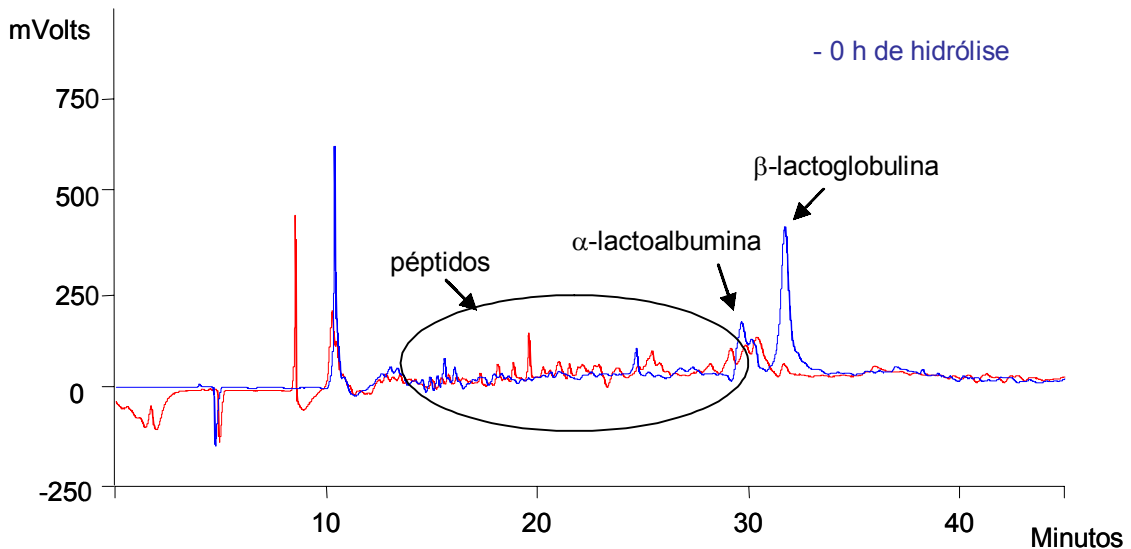


Figura 3: Perfil de proteínas e péptidos obtidos com tripsina imobilizada a 37 °C e pH 8.

Esta actividade catalítica reduzida foi também detectada nas análises por RP-HPLC. No final de 3 horas de hidrólise com enzima livre, a degradação da  $\alpha$ -lactoalbumina e de  $\beta$ -lactoglobulina foi total (Figura 2). Por outro lado, o hidrolisado de tripsina imobilizada em *drêche*, ao fim do mesmo período de tempo, apresentava ainda quantidades pequenas das proteínas referidas (Figura 3). Embora as diferenças no grau de hidrólise, e logo na actividade das enzimas, tenham sido acentuadas, os péptidos libertados aparentam ser os mesmos mas em quantidades bastante diferentes.

#### 4. Conclusões

Conseguiu-se imobilizar a tripsina em *drêche* mas a actividade obtida foi reduzida. Contudo o uso da *drêche* como suporte continua a ser interessante já que as vantagens operatórias (reutilização e

## Comunicação Poster

Alimentos do século XX1: matérias-primas, processos e produtos

operação em contínuo) e o custo de suporte podem compensar essa redução de actividade. Por outro lado, o valor óptimo de temperatura obtido foi superior o que permite um uso da enzima numa gama mais alargada de temperaturas. A imobilização da enzima não alterou o perfil peptídico resultante da hidrólise de concentrado proteico de soro de queijo o que permite a substituição da enzima livre pela enzima imobilizada sem alteração do produto final.

### 5. Referências

- ADLER-NISSEN, J. 1985. *Enzymic hydrolysis of food proteins*, Elsevier Applied Science, London, pp. 12-19.
- BRANYIK, T., VICENTE, A.A., MACHADO CRUZ, J.M., TEIXEIRA, J.A. 2001. Spent grains – a new support for brewing yeast immobilisation. *Biotechnology Letters*, 23: 1073-1078.
- GODFREY, T. 1996. Comparison of Key Characteristics of Industrial Enzymes by Type and Source. In: T. GODFREY, S. WEST (Eds.), *Industrial Enzymology*, 2<sup>nd</sup> Ed., Macmillan Press Ltd, UK, pp. 436-479.
- HUCKEL, M., WIRTH, H.-J., ERAN, M. 1996. Porous zirconia: a new support material for enzyme immobilization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 31: 165-179.
- KUMAR, A., GUPTA, M.N. 1998. Immobilization of trypsin on an enteric polymer Eudragit S-100 for the biocatalysis of macromolecular substrate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5: 289-294.
- SEARS, P., CLARK, D. 1993. Comparison of soluble and immobilized trypsin kinetics: implications for peptide synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 118-124.

### 6. Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (projecto POCTI/2000/QUI/36452). Este trabalho foi co-financiado pelo fundo Social Europeu no âmbito do concurso Público 1/5.3/PRODEP/2003, pedido de financiamento nº 1012.012, da medida 5/acção 5.3 – Formação Avançada de Docentes do Ensino Superior submetido pela

Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo.

