

# XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

## Dialisabilidade de Peptídeos do Soro de Queijo Obtidos em Reatores Enzimáticos de Leito Fixo

Juliana Cristina Bassan<sup>1</sup>, Guilherme Peixoto<sup>2</sup>, Clariana Zanutto Paulino da Cruz<sup>3</sup>, Julian Paul Matinez Galán<sup>1</sup>, Aline Buda dos Santos<sup>3</sup>, Rubens Monti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Depto. de Alimentos e Nutrição  
Rodovia Araraquara-Jaú Km 1 – 14800-903 Araraquara-SP

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Depto. de Bioprocessos e Biotecnologia  
Rodovia Araraquara-Jaú Km 1 – 14800-903 Araraquara-SP

<sup>3</sup>Instituto de Química - Depto. de Biotecnologia  
Rua Prof. Francisco Degni, 55 – 14800-060 Araraquara-SP

### RESUMO

*Diferentes hidrolisados parciais dos soros de queijo foram obtidos através de um reator de leito fixo com pepsina e tripsina imobilizadas em pó de sabugo de milho ativado. Os hidrolisados foram fracionados em Sephadex G25 para obtenção de pools de peptídeos <5kDa. Os pools de peptídeos foram avaliados in vitro por simulação da digestão gastrointestinal/dialisabilidade e analisados por RP-HPLC. O soro de queijo apresentou concentração de proteínas de 7,2 mg/mL e a hidrólise parcial foi conseguida com sucesso nas condições testadas. Na dialisabilidade os perfis cromatográficos indicaram que os diferentes pools de peptídeos foram efetivamente modificados após a digestão simulada havendo a difusão de poucas frações peptídicas para o interior da membrana de diálise.*

Palavras-chave: dialisabilidade, peptídeos, soro de queijo, reatores enzimáticos, enzimas imobilizadas.

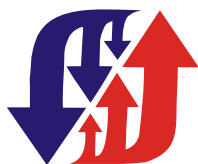
### INTRODUÇÃO

O soro de queijo é um resíduo da indústria de laticínios e representa de 85 a 90% do volume total do leite processado (Fernández et al., 2015) com uma produção estimada em cerca de 180-190 .10<sup>6</sup> toneladas/ano (Yadav et al., 2015). O avanço da ciência e uso de técnicas inovadoras colabora para aumentar a compreensão em nível molecular das características químicas, biológicas e nutricionais do soro com relação às proteínas e peptídeos obtidos por hidrólise enzimática (Smithers et al., 2008). O soro é a principal fonte de peptídeos bioativos (O’Keeffe e FitzGerald, 2014) e técnicas *in vitro* como a dialisabilidade são importantes ferramentas para predizer os mecanismo e barreiras para absorção e integridade desses compostos frente à ação enzimática durante a sua digestão (Antunes et al., 2013). O alto custo das enzimas em processos industriais impulsionou a busca por novas tecnologias que reduzam os gastos associados a essa tecnologia. A imobilização de enzimas possibilita o reuso do biocatalizador (estabilidade e insolubilização), o controle da reação e fácil recuperação do produto e automação de processo (reatores enzimáticos) (Zhang e Xing, 2011). Outro fator relevante é a escolha do suporte de imobilização, pois suas características físico-químicas e custo são determinantes no desempenho da enzima imobilizada e no emprego em escala industrial (Guisán, 2006). Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi utilizar as enzimas pepsina e tripsina imobilizadas em pó de sabugo de milho ativado com grupos aldeídos, para aplicação em reator de leite fixo e obtenção de peptídeos a partir do soro de queijo e analisar seu transporte por dialisabilidade.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Obtenção do soro de queijo bovino, determinação de proteínas e lactose:** O soro de queijo bovino foi obtido a partir de precipitação enzimática e tratado para redução dos teores de lactose e gordura (Bassan et al., 2015). Proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976) e lactose pelo método de Miller (1959). Pepsina e tripsina imobilizadas em suporte alternativo pó de sabugo de milho ativado (Laboratório de Enzimologia-FCFAR). Pepsina, pancreatina, sais biliares e membrana semipermeável foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA).

**Hidrólise parcial do soro de queijo bovino em reator de leito fixo com SMglutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina:** A razão derivado enzimático/volume útil foi de 1:2. A vazão foi de 10,1



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

mL/hora e o soro foi acidificado (pH 2,0) com HCl 0,1M ou alcalinizado (pH 9,0) com NaOH 0,1M dependendo da protease imobilizada utilizada. A hidrólise transcorreu a 45°C em diferentes condições

- **condição 1:** hidrólise com o derivado SM-glutaraldeído-pepsina (hidrolisado 1);
- **condição 2:** hidrólise com a derivado SM-glioxil-tripsina (hidrolisado 2);
- **condição 3:** parte do hidrolisado 1 foi hidrolisado de acordo a condição 2, com o devido ajuste de pH (hidrolisado 3).

**Análise dos diferentes hidrolisados proteicos por RP-HPLC:** A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa foi efetuada em cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 Nucleosil (250 x 4,6 mm),  $\Phi = 5\mu\text{m}$ ,

300Å de porosidade, com gradiente linear de 5-95% (solvente A: água contendo 0,045% de TFA e solvente B: acetonitrila contendo 0,036% de TFA em 30 minutos), com fluxo de 1,0 mL/minuto e detecção em 220 nm.

**Simulação da digestão gastrointestinal e dialisabilidade:** A simulação da digestão gastrointestinal e determinação da fração dialisável foram realizadas de acordo com o método de Luten et al. (1996). Após a digestão, o digerido externo e interno das membranas de diálise de cada condição de hidrólise foram fracionados em coluna Sephadex G25 para separar o *pool* de peptídeos <5kDa que possuem maior possibilidade de apresentarem uma propriedade bioativa. Os *pools* de peptídeos foram analisados por RP-HPLC antes e após a simulação da digestão.

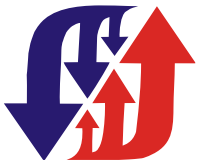
### RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Dosagem de proteínas e lactose no soro de queijo bovino e bubalino tratados** Tabela 1: Dosagem de proteínas dos soros de queijo bovino tratado (deslactosado e desengordurado).

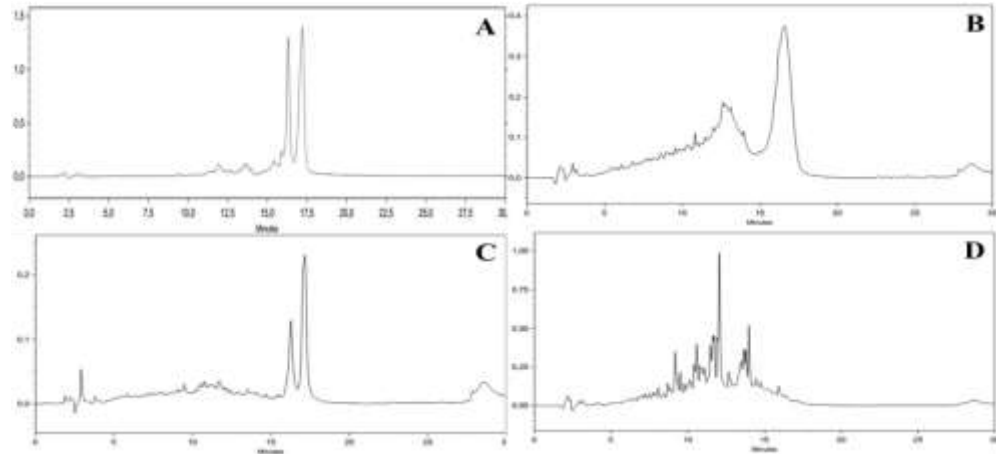
Amostra	Proteínas (g/L)	Lactose (g/L)
Soro de queijo bovino tratado	7,2±0,13	1,42 ±0,09
Soro de queijo bovino (Romám et al., 2011).	5,4	-

**Análise do perfil de hidrólise por RP-HPLC dos diferentes hidrolisados obtidos em reator de leite empacotado**

Os perfis qualitativos de hidrólise do soro de queijo obtidos com os derivados estabilizados SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina em reator de leite fixo estão representados na Figura 1. Com a análise comparativa entre os perfis cromatográficos do soro de queijo não hidrolisado (Fig. 1A) e das diferentes condições de hidrólise (Fig. 1B, 1C e 1D) foi possível verificar que houve uma hidrólise parcial das proteínas e perfis diferentes foram obtidos de acordo com a especificidade catalítica de cada derivado enzimático empregado. Na condição D observa-se um aumento no número de picos entre os tempos de retenção 5-15 minutos devido uma hidrólise mais efetiva promovida por ambos derivados com relação às demais condições. Esses resultados demonstram que proteases imobilizadas em pó de sabugo de milho podem ser utilizadas para a hidrólise do soro de queijo em sistema contínuo.



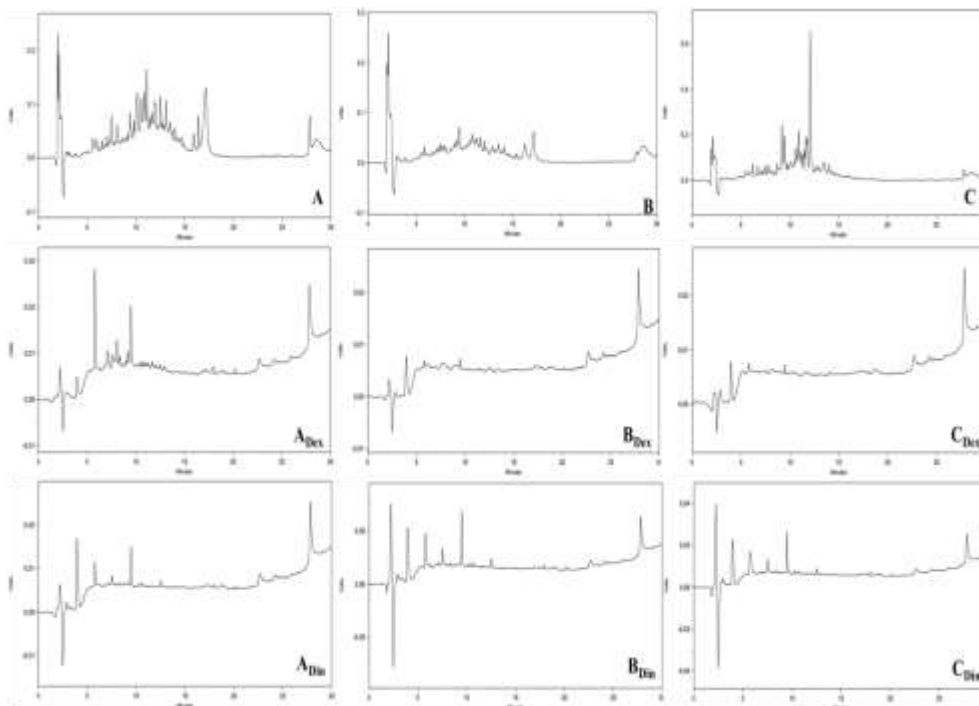
## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016



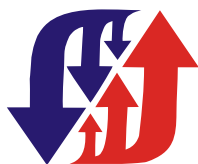
**Figura 1:** Perfis qualitativos de hidrólise dos soros de queijo bovino obtidos em reator de leito fixo com os derivados SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina. Não hidrolisado (A); hidrolisado SM-glutaraldeído-pepsina (B); hidrolisado SM-glioxil-tripsina (C); hidrolisado SM-glutaraldeído-pepsina+SM-glioxil-tripsina (D).

### Dialisabilidade dos diferentes *pools* de peptídeos < 5kDa

A dialisabilidade *in vitro* envolve um processo de digestão em duas etapas que simulam a fase gástrica (pepsina, pH 2,0) e a intestinal (pancreatina + sais biliares, pH 7,0) e a fração dialisável de um composto através de uma membrana semipermeável de porosidade controlada e pré-determinada (Sandberg, 2005). Essa técnica foi usada nesse estudo para prever o efeito da digestão simulada sobre os diferentes *pools* de peptídeos fracionados por Sephadex G25 (Figura 2: A, B e C) e sua diálise por uma membrana com corte < 12 kDa (*Sigma Aldrich*). Como podemos observar pelos cromatogramas A, A<sub>Dex</sub> e A<sub>Din</sub>; B, B<sub>Dex</sub> e B<sub>Din</sub>; C, C<sub>Dex</sub> e C<sub>Din</sub>, houveram alterações nos perfis qualitativos dos digestos externos (Dex) e digestos internos (Din) com relação às amostras testadas sugerindo um efeito hidrolítico pela ação das proteases usadas na digestão simulada.



**Figura 2.** Simulação da digestão gastrointestinal e dialisabilidade dos diferentes *pools* de peptídeos (Sephadex G25) do soro de queijo: pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina (A, A<sub>Dex</sub> e A<sub>Din</sub>); pool de peptídeos SM-glioxil-tripsina (B, B<sub>Dex</sub> e B<sub>Din</sub>); pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (C, C<sub>Dex</sub> e C<sub>Din</sub>). O perfil foi determinado por RP-HPLC.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016 CONCLUSÕES

A obtenção de hidrolisados parciais do soro de queijo bovino utilizando reator de leito fixo com SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina foi desempenhado com sucesso. O *pool* de peptídeos (<5kDa) obtidos para cada condição de hidrólise foram fortemente influenciados quando submetidos simulação gastrointestinal e dialisabilidade, mostrando perfis cromatográficos qualitativos diferentes com relação ao perfil de cada *pool* obtido por cromatografia de filtração em gel. Esses resultados sugerem que a ingestão oral de peptídeos que possam ter alguma atividade bioativa é ainda um grande desafio, já que a manutenção de sua estrutura é crucial para desempenhar efetivamente o binômio estrutura/função.

### REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, F. et al. Models to Predict Intestinal Absorption of Therapeutic Peptides and Proteins. **Current Drug Metabolism**, v.14, p.4-20, 2013.
- BASSAN, J.C. et al. Buffalo Cheese Whey Proteins, Identification of a 24 kDa Protein and Characterization of Their Hydrolysates: In Vitro Gastrointestinal Digestion. **Plos One**, v.10, p.1-18, 2015.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- FERNÁNDEZ, C. et al. Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production. **Biomass and Bioenergy**, v.81, p.55-62, 2015.
- GUISÁN, J.M. **Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins**. In: Guisan JM, editor. Immobilization of Enzymes and Cells. 2 ed. New Jersey: Human Press Inc.; 2006. p. 1-13.
- LUTEN, J. et al. Interlaboratory Trial on the Determination of the In Vitro Iron Dialysability from Food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.72, p. 415-424, 1996.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.
- O'KEEFFE, M.B.; FITZGERALD, R.J. Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells. **International Dairy Journal**, v.36, p.128-135, 2014.
- SANDBERG, A.S. Methods and Options for in vitro Dialyzability; Benefits and Limitations. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.75, p. 395-404, 2005.
- SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v.18, p. 695- 704, 2008.
- YADAV, J.S.S. et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides, **Biotechnology Advances**, 2015.
- ZHANG, C.; XING, X.H. Enzyme Bioreactors. In: MOO-YOUNG, M. (Ed). **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Academic Press, 2011. v.2, chap.23, p.319-329.