



MARCELA PAVAN BAGAGLI

***PRODUÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE DE *Streptomyces* sp. CBMAI-837
UTILIZANDO RESÍDUOS OU SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E APLICAÇÃO
EM FARINHA DE TRIGO***

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

MARCELA PAVAN BAGAGLI

***PRODUÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE DE *Streptomyces* sp. CBMAI-837
UTILIZANDO RESÍDUOS OU SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E APLICAÇÃO
EM FARINHA DE TRIGO***

*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*

Orientador: Helia Harumi Sato

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
TESE DEFENDIDA PELO ALUNO MARCELA PAVAN
BAGAGLI, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. HELIA
HARUMI SATO

CAMPINAS

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

B146p Bagagli, Marcela Pavan, 1981-
Produção de transglutaminase de *Streptomyces sp.*
cbmai-837 utilizando resíduos ou subprodutos
agroindustriais e aplicação em farinha de trigo / Marcela
Pavan Bagagli. -- Campinas, SP: [s.n.], 2014.

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

1. Transglutaminases. 2. Fermentação. 3.
Resíduos. 4. Panificação. I. Sato, Helia Harumi. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Production of transglutaminase of *Streptomyces sp.*
cbmai-837 using agroindustrial by products or residuals and application
on wheat flour.

Palavras-chave em inglês:

Transglutaminase

Fermentation

Residues

Bakery

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helia Harumi Sato [Orientador]

Haroldo Yukio Kawaguti

Juliana Alves Macedo

Luciana Francisco Fleuri

Rafael Rezende Maldonado

Data da defesa: 24-02-2014

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helia Harumi Sato
Orientadora - DCA/FEA/ UNICAMP

Dr. Haroldo Yukio Kawaguti
Membro Titular - Pesquisador / Campinas

Profa. Dra. Juliana Alves Macedo
Membro Titular - DEPAN/FEA/ UNICAMP

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri
Membro Titular - Inst. Biociências Botucatu/UNESP

Prof. Dr. Rafael Rezende Maldonado
Membro Titular - COTUCA/ UNICAMP

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
Membro Suplente - DCA/FEA/ UNICAMP

Prof. Dr. Yoon Kil Chang
Membro Suplente - DTA/FEA/ UNICAMP

Prof. Dr. Luciana Ferracini dos Santos
Membro Suplente - UNIARARAS

Resumo

A transglutaminase catalisa a formação de ligações cruzadas entre grupos ϵ -amino de resíduos de lisina e o grupo γ -carboxiamida de resíduos de glutamina de proteínas. Esta enzima pode ser usada para unir diferentes proteínas e melhorar suas propriedades funcionais. A transglutaminase obtida de micro-organismos por processos fermentativos apresenta vantagens em relação à enzima obtida de plantas e tecidos animais para as aplicações industriais. Neste trabalho, foram estudados os efeitos de diferentes subprodutos ou resíduos agroindustriais no meio de cultivo para a fermentação submersa de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, visando o aumento da atividade e da produtividade da enzima. Entre os substratos proteicos avaliados, o uso de 2,5% (m:v) de farelo de algodão ou de 2,5% (m:v) de farelo de soja no meio de cultivo resultou no aumento da atividade enzimática de 1,2 U.mL⁻¹ (214%) e 1,0 U.mL⁻¹ (182%), respectivamente, em relação ao valor obtido pela fermentação do micro-organismo em meio de cultivo contendo 2,5% de farinha de soja (0,57 U.mL⁻¹). Em relação às fontes de carbono principais avaliadas, a adição de 2,0% de glicerol ou de 12% de melaço de cana de açúcar permitiu o aumento da atividade de transglutaminase em 0,94 U.mL⁻¹ (167%) e 0,88 U.mL⁻¹ (157%), respectivamente. Foi verificado que a adição de 1% de quitina nativa no meio de cultivo favoreceu a produção da enzima elevando a atividade de transglutaminase em 181% em relação ao meio de cultivo sem quitina. Os efeitos da aplicação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em massa de farinha de trigo mole e na fabricação de pães foram avaliados e os resultados foram comparados com a atuação de uma TGase comercial (BioBond) formulada para aplicação em cereais. De forma geral, as duas enzimas avaliadas apresentaram o mesmo efeito sobre a massa quanto ao aumento da resistência

à extensão, a redução da máxima extensão da massa e a redução da pegajosidade da massa. Efeito antagônico foi observado na hidrofobicidade de superfície das proteínas da massa sendo que este parâmetro foi reduzido pela adição da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e foi elevado pela enzima comercial. A adição de TGase na preparação da massa de farinha de trigo mole resultou em aumento da massa molecular das proteínas, indicativo da formação de ligações cruzadas entre proteínas. A aplicação da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em massa de pão de farinha de trigo mole promoveu a redução do volume do pão em 9% e o aumento da firmeza em 32%. O aumento da quantidade de solvente adicionado na massa de 53% para 56% permitiu o aumento do volume dos pães, no entanto, com pouca diferença dos parâmetros de textura em relação ao controle para a TGase comercial BioBond e para a TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837.

Abstract

Transglutaminase catalyzes the cross-linking reaction between a γ -carboxamide of a glutamine residue from a peptide bond and the ε -amino group of a lysine. TGase can bind different proteins and improve their functional properties. The microbial transglutaminase shows advantages over the enzyme extracted from plants and mammals. In the present study, the effect of different industrial wastes and byproducts in the culture medium during the submerged fermentation of *Streptomyces* sp. CBMAI-837 was studied aiming to increase the enzyme activity and yield. Amongst the substrates with high protein content, the use of 2,5% of cottonseed meal or 2,5% of soybean meal in the culture medium increased the transglutaminase activity to 1.2 U.mL⁻¹ (214%) and 1.0 U.mL⁻¹ (182%), respectively, as compared to the results obtained using 2,5% of soybean flour. With regard to the main carbon sources, both 2% glycerol and 12% sugar cane molasses increased the transglutaminase activity to 0.94 U.mL⁻¹ (167%) and 0.88 U.mL⁻¹ (157%), respectively. It was observed that the addition of 1% of chitin on culture medium increased the transglutaminase activity by 181% as compared to the results obtained without the addition of chitin. The effects of the TGase from *Streptomyces* sp. CBMAI - 837 on soft wheat flour dough and on the manufacture of bread were evaluated, and the results were compared with the performance of a commercial TGase (BioBond) formulated for specific applications in cereal products. In general, both enzymes had the same effect on the rheological properties of the doughs, increasing the resistance to extension, reducing the maximum extension and reducing stickiness of the dough. The surface hydrophobicity of the protein dough was reduced by the addition of TGase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 but increased by the addition of the commercial enzyme. In general the analysis

of the protein structure indicated an agglomeration of the proteins causing an increase in molecular weight. The application of transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI-837 in the formulation of bread loaves decreased the bread volume by 9% and increased firmness by 32%. Increasing the amount of solvent added to the dough from 53% to 56% increased the volume of the loaves, but resulted in little difference in the texture profiles of the loaves made with the addition of the commercial BioBond and *Streptomyces* sp. CBMAI – 837 TGases, in relation to the control.

Dedico este trabalho ao meu marido Flávio, ao meu querido filho Yuji e a minha mãe, por toda compreensão e presença a cada dia desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à meu marido pelo companheirismo e apoio incondicional à busca de minha felicidade.

Agradeço ao meu filho por, ainda que tão pequeno, ser tão bom e compreensivo.

Agradeço aos meus pais e irmãos pelo apoio familiar e formação pessoal e profissional.

Agradeço aos amigos do laboratório, Joelise, Haroldo, Ruann, Fabíola, Camilo e Fabiano, pelo carinho e por toda ajuda para controlar o “cientista maluco” que há em mim.

Agradeço ao professor Koushik Seetharaman pela confiança e por todos os ensinamentos e pelo desenvolvimento de minha auto confiança. Agradeço ainda à Sahar Jazaeri pelo treinamento e principalmente pela amizade, ao jeito dela, em um momento atípico de minha vida.

Em especial, agradeço à professora Hélia pelo acompanhamento, por estar sempre presente, por ser acima de tudo uma pessoa generosa.

A University of Guelph pela oportunidade de utilizar suas instalações para o desenvolvimento desta pesquisa.

A FEA e a UNICAMP por minha formação acadêmica.

Ao CNPQ e a CAPES por todo apoio financeiro.

*“Education is the most powerful weapon
which you can use to change the world.”*

(Nelson Mandela)

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”*

(Marie Curie)

Índice

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
INTRODUÇÃO GERAL	1
I. CAPÍTULO I – PRODUÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE POR <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837 UTILIZANDO RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS	3
RESUMO	3
ABSTRACT	5
I.1. INTRODUÇÃO	7
I.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
I.2.1. <i>Transglutaminase</i>	8
I.2.2. <i>Produção da transglutaminase microbiana</i>	9
I.2.2.1. Meios de cultivo e indução da produção de TGase por fermentação submersa de linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.....	12
I.2.2.1.1. Uso de produtos e subprodutos agrícolas para produção de TGase de <i>Streptomyces</i> sp.....	13
I.2.2.1.2. Uso da quitina nativa no meio de cultivo de <i>Streptomyces</i> sp.	14
I.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
I.3.1. <i>Metodologias analíticas</i>	15
I.3.1.1. Determinação de massa celular seca	15
I.3.1.2. Determinação da atividade de transglutaminase	16
I.3.2. <i>Estudo da utilização de produtos e subprodutos agroindustriais como substratos da fermentação submersa de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 para produção de TGase em frascos agitados</i>	17
I.3.2.1. Fermentação submersa de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 em frascos agitados para obtenção de TGase.....	17
I.3.2.2. Seleção de substratos com elevado teor proteico para a fermentação submersa de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase	17
I.3.2.3. Cinética de fermentação e produção de TGase por <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 utilizando farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de algodão e farelo de soja no meio de cultivo.....	18
I.3.2.3.1. Caracterização físicoquímica da farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de soja e farelo de algodão, utilizados como substratos proteicos para a fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837.....	19
I.3.2.4. Avaliação de melão e glicerol como fonte de carbono no meio de cultura para fermentação submersa de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase	19

I.3.2.5. Delineamento fatorial 2 ² para estudo do efeito da porcentagem de farelo de soja e glicerol no meio de cultura para fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 em frascos agitados	20
I.3.2.6. Delineamento fatorial 2 ² para estudo do efeito da porcentagem de farelo de algodão e glicerol no meio de cultura para fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 em frascos agitados.....	21
I.3.3. <i>Avaliação do uso de quitina no meio de cultura para fermentação de Streptomyces sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase</i>	22
I.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
I.4.1. <i>Estudo da utilização de produtos e subprodutos agroindustriais como substratos para fermentação submersa de Streptomyces sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase</i>	23
I.4.1.1. Seleção de substratos com elevado teor proteico para fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase	23
I.4.1.1.1. Cinética de fermentação e produção de TGase pela linhagem <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 utilizando-se farinha de amendoim, farelo de soja, farelo de algodão ou farinha de soja no meio de cultura.....	25
I.4.1.1.2. Caracterização dos substratos proteicos e correlação com a produção da TGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837.....	29
I.4.1.2. Utilização de melão de cana-de-açúcar e glicerol como fonte de carbono no meio de cultura para fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase	32
I.4.1.3. Delineamento fatorial 2 ² para estudo dos efeitos da concentração de farelo de soja e de glicerol no meio de cultura para fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 em frascos agitados.....	36
I.4.1.1. Delineamento fatorial 2 ² para estudo do efeito da porcentagem de farelo de algodão e glicerol no meio de cultura para fermentação de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI-837 em frascos agitados.....	47
I.4.2. <i>Avaliação do uso de quitina no meio de cultura para fermentação de Streptomyces sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase</i>	54
I.5. CONCLUSÕES	58
I.6. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DOS ESTUDOS.....	58
I.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
II. CAPÍTULO II – APLICAÇÃO DA TRANSGLUTAMINASE DE STREPTOMYCES SP. CBMAI-837	63
RESUMO	63
ABSTRACT	65
II.1. INTRODUÇÃO	66
II.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	67
II.2.1. <i>Glúten: uma visão geral</i>	67
II.2.2. <i>Atuação da TGase em farinhas de trigo</i>	72
II.2.3. <i>Técnicas analíticas para identificação das alterações nas proteínas do trigo causadas pela TGase</i>	75

II.2.3.1.	Avaliação das propriedades reológicas	75
II.2.3.2.	Avaliação das alterações moleculares decorrentes da ação da TGase.....	80
II.3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
II.3.1.	<i>Farinha</i>	84
II.3.2.	<i>Enzimas</i>	85
II.3.3.	<i>Atuação da TGase microbiana nas proteínas da farinha de trigo mole (Triticum aestivum)</i>	85
II.3.3.1.	Preparo da massa de farinha de trigo	85
II.3.3.2.	Ávaliação do efeito da quantidade de TGase, pH e temperatura na massa de farinha de trigo mole.....	86
II.3.3.2.1.	Análises da mistura da massa de farinha de trigo mole no farinógrafo	88
II.3.3.2.2.	Análise das respostas de extensibilidade das massas de farinha de trigo mole.....	89
II.3.3.2.3.	Análise da pegajosidade da massa de farinha de trigo mole.....	89
II.3.3.2.4.	Análise da solubilidade das proteínas do glúten presentes na massa de farinha de trigo mole.....	90
II.3.3.2.5.	Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas da massa de farinha de trigo mole.....	90
II.3.3.2.6.	Avaliação da estrutura secundária das proteínas da massa de farinha de trigo mole por espectroscopia por infravermelho (EIVTF)	91
II.3.4.	<i>Comparação da atuação da TGase comercial e de Streptomyces sp. CBMAI 837 nas proteínas da farinha de trigo mole</i>	92
II.3.4.1.1.	Avaliação das propriedades mecânicas das massas de farinha de trigo mole tratadas com TGase comercial e de <i>Streptomyces sp. CBMAI-837</i>	93
II.3.4.1.2.	Avaliação das características bioquímicas da massa de trigo mole.....	93
II.3.4.2.	Avaliação da produção de pão de forma com farinha de trigo mole e transglutaminase comercial e de <i>Streptomyces sp. CBMAI-837</i> utilizando água destilada ou tampão citrato 0,05 mol.L ⁻¹ pH6,5 na formulação.....	95
II.4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	100
II.4.1.	<i>Atuação da TGase microbiana nas proteínas da farinha de trigo mole</i>	100
II.4.1.1.	Delineamento fatorial 2 ³ para o preparo da massa de farinha de trigo mole e análises das propriedades mecânicas.....	100
II.4.1.1.1.	Análise da mistura da massa de farinha de trigo mole tratada com TGase no farinógrafo.....	101
II.4.1.1.2.	Análise das respostas de extensibilidade das massas de farinha de trigo mole.....	105
II.4.1.1.3.	Análise da pegajosidade da massa de farinha de trigo mole tratada com TGase	110
II.4.1.2.	Delineamento fatorial 2 ³ para as análises bioquímicas da massa de farinha de trigo mole tratada com TGase.....	111
II.4.1.2.1.	Análise da solubilidade das proteínas do glúten presentes na massa de farinha de trigo mole tratada com TGase.....	112

II.4.1.2.2. Perfil eletroforético das proteínas da massa de farinha de trigo mole tratadas com TGase (SDS-PAGE).....	117
II.4.1.2.3. Avaliação da estrutura secundária das proteínas das massas de farinha de trigo mole tratada com TGase por espectroscopia por infravermelho (EIVTF).....	119
II.4.2. Comparação da atuação da TGase comercial e de <i>Streptomyces sp. CBMAI 837</i> nas proteínas da farinha de trigo mole (<i>Triticum aestivum</i>).....	124
II.4.2.1. Avaliação das propriedades mecânicas das massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de <i>Streptomyces sp. CBMAI-837</i>	124
II.4.2.2. Avaliação bioquímica das massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de <i>Streptomyces sp. CBMAI-837</i>	128
II.4.2.2.1. Avaliação da solubilidade das proteínas e glúten presentes nas massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de <i>Streptomyces sp. CBMAI-837</i>	128
II.4.2.2.2. Perfil eletroforético das proteínas das massas de farinha de trigo mole tratadas com TGase comercial e de <i>Streptomyces sp. CBMAI-837</i> (SDS-PAGE)	131
II.4.2.2.3. Avaliação da estrutura secundária das proteínas das massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de <i>Streptomyces sp. CBMAI-837</i> por espectroscopia por infravermelho (EIVTF).....	133
II.4.2.2.4. Hidrofobicidade de superfície das proteínas das massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de <i>Streptomyces sp. CBMAI-837</i>	137
II.4.2.3. Avaliação da adição de TGase na produção de pão de forma de farinha de trigo mole	141
II.5. CONCLUSÕES	151
II.6. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	152
II.7. AGRADECIMENTOS.....	152
II.8. REFERÊNCIAS	153
ANEXO	1
I. ANEXO I: PURIFICAÇÃO DA TRANSGLUTAMINASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i>	2
RESUMO	2
ABSTRACT	4
I.1. INTRODUÇÃO	6
I.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
I.2.1. Purificação da TGase microbiana.....	7
I.2.2. Resinas para purificação da TGase	8
I.2.2.1. Resinas de afinidade Blue Sepharose CL-6B.....	8
I.2.2.2. Resinas de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose.....	9
I.2.2.3. Resina de afinidade por ligações covalentes.....	10
I.2.3. Estabilização da TGase microbiana.....	12

I.3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
I.3.1.	<i>Produção do extrato enzimático bruto de transglutaminase.....</i>	14
I.3.2.	<i>Estabilizantes da TGase de Streptomyces sp. CBMAI-837.....</i>	14
I.3.3.	<i>Purificação da TGase de Streptomyces sp. CBMAI-837.....</i>	15
I.3.3.1.	Purificação da TGase de <i>Streptomyces sp. CBMAI-837</i> em uma etapa utilizando a resina Blue Sepharose CL-6B.....	15
I.3.3.1.1.	pH ótimo de atividade da fração transglutaminase purificada	16
I.3.3.2.	Purificação da TGase de <i>Streptomyces sp. CBMAI-837</i> em uma etapa utilizando resina Phenyl Sepharose 6 FF.....	17
I.3.3.3.	Purificação da TGase de <i>Streptomyces sp. CBMAI-837</i> em uma etapa utilizando resina Activated Thiol Sepharose 4B	18
I.3.4.	<i>Perfil eletroforético das frações purificadas (SDS-PAGE)</i>	19
I.4.	RESULTADOS.....	20
I.4.1.	<i>Estabilizantes da TGase de Streptomyces sp. CBMAI-837.....</i>	20
I.4.2.	<i>Purificação da TGase de Streptomyces sp. CBMAI-837 em Blue Sepharose CL-6B na presença de L-cisteína.....</i>	23
I.4.2.1.	pH ótimo de atividade da fração transglutaminase purificada	26
I.4.3.	<i>Purificação da TGase de Streptomyces sp. CBMAI-837 em resina Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (FF).....</i>	28
I.4.4.	<i>Purificação da TGase de Streptomyces sp. CBMAI-837 em Activated Thiol Sepharose 4B.....</i>	31
I.4.5.	<i>Perfil eletroforético (SDS-PAGE)</i>	33
I.5.	CONCLUSÕES	35
I.6.	REFERÊNCIAS	36

Índice de Figuras

FIGURA I-1 – REAÇÕES CATALISADAS PELA TGASE.....	9
FIGURA I-3 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICROBIANO E DE PRODUÇÃO DA TRANSGLUTAMINASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO FARINHA DE SOJA, FARINHA DE AMENDOIM, FARELO DE SOJA E FARELO DE ALGODÃO NO MEIO DE CULTIVO. CRESCIMENTO MICROBIANO (LINHA PONTILHADA); ATIVIDADE DE TGASE (LINHA SÓLIDA).....	26
FIGURA I-4 – (A) ATIVIDADES MÉDIAS DE TGSE MÁXIMAS E (B) PRODUTIVIDADES MÉDIAS MÁXIMAS DE TGASE OBTIDAS NA FERMENTAÇÃO SUBMERSA DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> EM MEIOS DE CULTURA CONTENDO DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNAS.....	28
FIGURA I-5 – PREÇO POR KG DA FARINHA DE SOJA, FARELO DE SOJA E FARELO DE ALGODÃO. FONTE: CEREALISTA SÃO JOSÉ.....	29
FIGURA I-6 – (A) FARINHA DE SOJA; (B) FARINHA DE AMENDOIM; (C) FARELO DE ALGODÃO (D) FARELO DE SOJA.....	31
FIGURA I-7 – CINÉTICA DA ATIVIDADE DE TGASE E CRESCIMENTO CELULAR DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> NOS MEIOS DE CULTIVO 1, 2, 3 E PADRÃO. CRESCIMENTO MICROBIANO (LINHA PONTILHADA); ATIVIDADE DE TGASE (LINHA SÓLIDA).....	33
FIGURA I-8 – (A) ATIVIDADES MÉDIAS MÁXIMAS DE TGASE E (B) PRODUTIVIDADES MÉDIAS MÁXIMAS DE TGASE OBTIDAS NA FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> NOS MEIOS DE CULTURA 1, 2, 3 E PADRÃO, NO ESTUDO DE SUBSTITUIÇÃO DA FONTE DE CARBONO DO MEIO PADRÃO.....	34
FIGURA I-9 – PREÇO POR KG DO MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR LÍQUIDO, GLICEROL 90% DE PUREZA, GLICOSE ANIDRA, AMIDO DE BATATA. FONTE: EGC RELIANT.....	35
FIGURA I-10 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> POR FERMENTAÇÃO UTILIZANDO MEIO DE CULTIVO CONTENDO FARELO DE SOJA E GLICEROL. (A) ENSAIOS DO DELINEAMENTO FATORIAL 2^2 , (B) ENSAIOS DOS PONTOS CENTRAIS.....	37
FIGURA I-11 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> UTILIZANDO MEIO DE CULTIVO CONTENDO FARELO DE SOJA E GLICEROL – PONTOS AXIAIS PARA COMPOR O MODELO QUADRÁTICO APÓS 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO.....	40
FIGURA I-12 – CURVAS DE CONTORNO PARA O ESTUDO DO EFEITO DA PERCENTAGEM DE GLICEROL E DE FARELO DE SOJA NO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> APÓS 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO. ...	43
FIGURA I-13 – CURVAS DE CONTORNO PARA O ESTUDO DO EFEITO DA PERCENTAGEM DE GLICEROL E DE FARELO DE SOJA NO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> APÓS 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO. ...	46
FIGURA I-14 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> POR FERMENTAÇÃO UTILIZANDO MEIO DE CULTIVO CONTENDO FARELO DE ALGODÃO E GLICEROL. (A) ENSAIOS DO DELINEAMENTO FATORIAL 2^2 , (B) ENSAIOS DOS PONTOS CENTRAIS.....	48

FIGURA I-15 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> UTILIZANDO MEIO DE CULTIVO CONTENDO FARELO DE ALGODÃO E GLICEROL – PONTOS AXIAIS PARA COMPOR O MODELO QUADRÁTICO APÓS 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO.	52
FIGURA I-16 – CRESCIMENTO DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> , APÓS 120 HORAS DE INCUBAÇÃO A 30°C EM PLACAS DE PETRI CONTENDO MEIO ISP2 (A) COM 1% DE QUITINA; (B) SEM QUITINA.	55
FIGURA I-17 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICROBIANO E DE PRODUÇÃO DA TRANSGLUTAMINASE DE <i>STREPTOMYCES SP.</i> <i>CBMAI-837</i> POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM MEIO DE CULTIVO PADRÃO (A) ADICIONADO DE 1% DE QUITINA NATIVA (B) SEM ADIÇÃO DE QUITINA. CRESCIMENTO MICROBIANO (LINHA PONTILHADA); ATIVIDADE DE TGASE (LINHA SÓLIDA).56	
FIGURA II-1– (A) ILUSTRAÇÃO DAS PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS DO GLÚTEN E DE SUAS FRAÇÕES GLUTENINAS E GLIADINAS (ADAPTADO DE WRIGLEY ET AL., 2006); (B) MODELO ESQUEMÁTICO PARA A EXTENSÃO DA MASSA DE FARINHA DE TRIGO (ADAPTADO DE IOANA URMA)	69
FIGURA II-2 – REORIENTAÇÃO DAS CADEIAS PROTEICAS DA MASSA DURANTE O ESTRESSE MECÂNICO DA MISTURA DEVIDO ÀS REAÇÕES DE INTERCÂMBIO DAS PONTES DISSULFETO INICIADAS POR UM GRUPO SULFIDRILA MÓVEL (ADAPTADO DE DELCOUR ET AL., 2012).	70
FIGURA II-3 – FARINOGRAMA PARA MISTURA DE MASSAS DE DIFERENTES FARINHAS DE TRIGO FORMULADAS COM ÁGUA E ÁGUA DEUTERADA (ADAPTADO DE HAMER & HOSENEY,1998).	71
FIGURA II-4 – ILUSTRAÇÃO DO FARINÓGRAFO BRABENDER E DE UM FARINOGRAMA GENÉRICO.	77
FIGURA II-5 – TEXTURÔMETRO ACOPLADO COM A SONDA SMS/KIEFFER PARA ANÁLISE DE MICRO-EXTENSÃO DE MASSAS DE FARINHA DE TRIGO.	78
FIGURA II-6 – CURVA GENÉRICA DE UM ENSAIO TPA (ADAPTADA DE ARMERO & COLLAR, 1997).	79
FIGURA II-7 – (A) ILUSTRAÇÃO DO MECANISMO DE FLUORESCÊNCIA DE FACE FRONTAL; (B) ATUAÇÃO DA SONDA ESPECTROSCÓPICA NA ANÁLISE DE HIDROFOBICIDADE. (ADAPTADO DE IAMETTI).	83
FIGURA II-8 – FLUXOGRAMA DO PREPARO DOS PÃES.	98
FIGURA II-9 – FARINOGRAMAS DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE TRATADA COM TGASE DOS ENSAIOS DO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³ (A) TEMPERATURA DE 30°C E (B) TEMPERATURA DE 37°C E PONTO CENTRAL. (—) 8 U/G DE PROTEÍNA E PH 4,5; (—) 2U/G DE PROTEÍNA E PH 4,5; (---) 8U/G DE PROTEÍNA E PH 6,5; (---) 2U/G DE PROTEÍNA E PH 6,5; (=) 5U/G DE PROTEÍNA E PH5,5.	102
FIGURA II-10 – MICRO-EXTENSOGRAMAS DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE (A) 30°C (B) 37°C.	106
FIGURA II-11 – ILUSTRAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DAS LIGAÇÕES ISOPEPTÍDICAS E-(γ -GLUTAMINIL)-LISINA NA EXTENSIBILIDADE DO GLÚTEN (ADAPTADO DE RAUSCHER & POMÈS, 2011).	110
FIGURA II-12 – CROMATOGRAMAS DE EXCLUSÃO MOLECULAR PARA AS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE PREPARADAS NO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³ (A) ENSAIOS A 30°C E (B) ENSAIOS A 37°C.	113

FIGURA II-13 – SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE PARA CADA ENSAIO DO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³	118
FIGURA II-14 – DERIVADA SEGUNDA DOS ESPECTROS INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER PARA AS AMOSTRAS DE MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE OBTIDAS NOS ENSAIOS DO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³	120
FIGURA II-15 – MICRO-EXTENSOGRAMAS PARA AS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE PREPARADAS COM TGASE COMERCIAL (BioBOND) E EEBC DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i>	125
FIGURA II-16 – CROMATOGRAMAS DE EXCLUSÃO MOLECULAR PARA AS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE PREPARADAS SEM E COM TGASE COMERCIAL E DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837 (A)</i> EM ÁGUA DESTILADA (B) EM TAMPÃO CITRATO 0,05M PH6,5	129
FIGURA II-17 – SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE. COLUNA 1 – CBMAI AD 8U; COLUNA 2 – CBMAI PH6,5 8U; COLUNA 3 – BioBOND AD 8U; COLUNA 4 – BioBOND PH6,5 8U, COLUNA 5 – CONTROLE AD; COLUNA 6 – CONTROLE PH6,5, COLUNA P – PADRÕES DE MASSA MOLECULAR (10 – 250kDA)	132
FIGURA II-18 – DERIVADA SEGUNDA DOS ESPECTROS INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER PARA AS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE TRATADAS COM TGASE COMERCIAL BioBOND E DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837 (A)</i> PREPARADAS COM ÁGUA DESTILADA (B) PREPARADAS COM TAMPÃO CITRATO 0,05M PH6,5.	134
FIGURA II-19 - ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA DAS PROTEÍNAS DO GLÚTEN (LIGADAS A SONDA DE FLUORESCÊNCIA ANS) DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE TRATADAS COM TGASE COMERCIAL E DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837 (A)</i> E ÁGUA DESTILADA; (B) E TAMPÃO CITRATO 0,05M PH6,5.....	138
FIGURA II-20 – INTENSIDADE DE EMISSÃO A 470NM PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANS ADICIONADAS ÀS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE FORMULADAS COM TGASE COMERCIAL BioBOND E EEBC DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837(A)</i> COM ÁGUA DESTILADA E (B) COM TAMPÃO CITRATO 0,05M PH6,5.....	139
FIGURA II-21 – FATIA CENTRAL DOS PÃES DE FORMA FORMULADOS COM FARINHA DE TRIGO MOLE E ÁGUA DESTILADA NA PRESENÇA DE TGASE COMERCIAL BioBOND E EEBC DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i>	142
FIGURA II-22 – VOLUME ESPECÍFICO E RESULTADOS DA ANÁLISE DE TEXTURA (TPA) PARA OS PÃES FORMULADOS COM FARINHA DE TRIGO MOLE E COM TGASE (COMERCIAL OU DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i>) EM PRESENÇA DE ÁGUA DESTILADA (PH5,0).	143
FIGURA II-23 – FATIA CENTRAL DOS PÃES DE FORMA FORMULADOS COM FARINHA DE TRIGO MOLE E TAMPÃO CITRATO 0,05 MOL.L ⁻¹ PH 6,5 NA PRESENÇA DE TGASE COMERCIAL BioBOND E EEBC DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i>	147
FIGURA II-24 – VOLUME ESPECÍFICO E RESULTADOS DA ANÁLISE DE TEXTURA (TPA) PARA OS PÃES FORMULADOS COM FARINHA DE TRIGO MOLE E COM TGASE (COMERCIAL OU DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i>) EM PRESENÇA DE TAMPÃO CITRATO 0,05M PH6,5.....	148
FIGURA I-1 – ESTRUTURA PARCIAL DA RESINA BLUE SEPHAROSE CL-6B	9
FIGURA I-2 – ESTRUTURA PARCIAL DA RESINA PHENYL SEPHAROSE 6 FF	10
FIGURA I-3 – ESTRUTURA PARCIAL DA RESINA ACTIVATED THIOI-SEPHAROSE 4B (GE HEALTHCARE, INSTRUCTIONS 71-7106-00 AE).	11

FIGURA I-4 – ESQUEMA DAS REAÇÕES ENVOLVIDAS NA SEPARAÇÃO DE MOLÉCULAS COM A RESINA <i>ACTIVATED THIOL-SEPHAROSE 4B</i> (ADAPTADO DE GE HEALTHCARE, INSTRUCTIONS 71-7106-00 AE).....	11
FIGURA I-5 – ATIVIDADE RESIDUAL DE TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> INCUBADA NA PRESENÇA DE SOLUÇÕES ESTABILIZANTES.	21
FIGURA I-6 - PURIFICAÇÃO DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> EM <i>BLUE SEPHAROSE CL-6B (A)</i> NA AUSÊNCIA DE L-CISTEÍNA (B) NA PRESENÇA DE L-CISTEÍNA (5MMOL.L ⁻¹).	24
FIGURA I-7 – ATIVIDADE RELATIVA DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO, EEBC E FRAÇÃO PURA (F2-CIS) DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> EM PH 6,0, 7,0, 10,0 E 11,0.	27
FIGURA I-8 - PURIFICAÇÃO DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> EM RESINA PHENYL SEPHAROSE 6 FF EM TAMPÃO FOSFATO 0,05 MOL.L ⁻¹ ADICIONADO DE 1,5 MOL.L ⁻¹ DE (NH ₄) ₂ SO ₄ EM (A) PH 7,5 E (B) PH 8,0.	29
FIGURA I-9 - PURIFICAÇÃO DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> EM RESINA <i>ACTIVATED THIOL SEPHAROSE 4B</i> EM TAMPÃO TRIS-HCL 0,1 MOL.L ⁻¹ PH8,0 ADICIONADO DE 1MMOL.L ⁻¹ DE EDTA E 0,3 MOL.L ⁻¹ DE NaCl.....	32
FIGURA I-10 –PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DO EXTRATO ENZIMÁTICO CONCENTRADO E FRAÇÕES PURAS.	34

Índice de Tabelas

TABELA I-1 – MEIOS DE CULTIVO CONTENDO MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E GLICEROL PARA FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE TGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837	20
TABELA I-2 – ENSAIOS DO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ² PARA ESTUDO DO EFEITO DA QUANTIDADE DE FARELO DE SOJA E GLICEROL NO MEIO DE CULTIVO PARA FERMENTAÇÃO DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837 E PRODUÇÃO DE TGASE.	21
TABELA I-3 – ENSAIOS DO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ² PARA ESTUDO DO EFEITO DA QUANTIDADE DE FARELO DE ALGODÃO E GLICEROL NO MEIO DE CULTIVO PARA FERMENTAÇÃO DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837 E PRODUÇÃO DE TGASE.	22
TABELA I-4 – TEOR DE PROTEÍNAS, LIPÍDEOS, CARBOIDRATOS E CINZAS DA FARINHA DE SOJA, FARINHA DE AMENDOIM, FARELO DE SOJA E FARELO DE ALGODÃO	29
TABELA I-5 – PERCENTAGEM DE PARTÍCULAS MAIORES E MENORES QUE 0,8MM PRESENTES NA FARINHA DE SOJA, FARINHA DE AMENDOIM, FARELO DE ALGODÃO E FARELO DE SOJA.....	30
TABELA I-6 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS PERCENTAGEM DE FARELO DE SOJA E GLICEROL NO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE TGASE APÓS 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837 – MODELO LINEAR.	38
TABELA I-7 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO LINEAR PROPOSTO PARA A PRODUÇÃO DE TGASE EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO FARELO DE SOJA E GLICEROL APÓS 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO.	39
TABELA I-8 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS PERCENTAGEM DE FARELO DE SOJA E GLICEROL NO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE TGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837 APÓS 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO – MODELO QUADRÁTICO.....	41
TABELA I-9 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO QUADRÁTICO PROPOSTO PARA A PRODUÇÃO DE TGASE EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO FARELO DE SOJA E GLICEROL APÓS 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO.....	42
TABELA I-10 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS PERCENTAGEM DE FARELO DE SOJA E DE GLICEROL NO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE TGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837 APÓS 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO – MODELO QUADRÁTICO	44
TABELA I-11- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO QUADRÁTICO PROPOSTO PARA A PRODUÇÃO DE TGASE EM MEIO CONTENDO FARELO DE SOJA E GLICEROL APÓS O TEMPO DE FERMENTAÇÃO DE 96 HORAS.....	45
TABELA I-12 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS PERCENTAGEM DE FARELO DE ALGODÃO E GLICEROL NO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE TGASE APÓS 72 HORAS DE FERMENTAÇÃO DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837– MODELO LINEAR.....	49
TABELA I-13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO LINEAR PROPOSTO PARA A PRODUÇÃO DE TGASE EM MEIO CONTENDO FARELO DE ALGODÃO E GLICEROL APÓS O TEMPO DE FERMENTAÇÃO DE 72 HORAS.....	50
TABELA I-14 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS PERCENTAGEM DE FARELO DE ALGODÃO E DE GLICEROL NO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE TGASE APÓS 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837- – MODELO LINEAR	51
TABELA I-15 EFEITOS DAS VARIÁVEIS PERCENTAGEM DE FARELO DE ALGODÃO E DE GLICEROL NO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE TGASE APÓS 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837– MODELO QUADRÁTICO 52	
TABELA I-16 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO QUADRÁTICO PROPOSTO PARA A PRODUÇÃO DE TGASE EM MEIO CONTENDO FARELO DE ALGODÃO E GLICEROL APÓS O TEMPO DE FERMENTAÇÃO DE 96 HORAS.	53

TABELA II-1 – QUANTIDADE DE RESÍDUOS DE GLUTAMINA E LISINA EM FARINHA DE TRIGO DURO.....	73
TABELA II-2 – PARÂMETROS AVALIADOS ATRAVÉS DA CURVA DE TPA PARA AMOSTRAS DE PÃO.....	80
TABELA II-3 – NÍVEIS DE ESTUDO DAS ARIÁVEIS QUANTIDADE DE TGASE, PH DO TAMPÃO CITRATO E TEMPERATURA PARA O ESTUDO DO EFEITO EM MASSA DE FARINHA DE TRIGO MOLE	87
TABELA II-4 – ENSAIOS DO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA O ESTUDO DO EFEITO DA QUANTIDADE DE TRANSGLUTAMINASE, PH DO TAMPÃO CITRATO E TEMPERATURA DE MISTURA E DESCANSO DA MASSA DE FARINHA DE TRIGO MOLE EM SUAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E BIOQUÍMICAS. VALORES CODIFICADOS ENCONTRAM-SE ENTRE PARÊNTESES.....	88
TABELA II-5 – FORMULAÇÃO DOS PÃES CONTENDO TGASE MICROBIANA E CONTROLES	96
TABELA II-6 – CONSISTÊNCIA MÁXIMA (BU), TEMPO DE DESENVOLVIMENTO (MIN), ESTABILIDADE (MIN), PERDA DA CONSISTÊNCIA (BU), RESISTÊNCIA À EXTENSÃO (G), EXTENSIBILIDADE (MM), TRABALHO REALIZADO (G.MM) E PEGAJOSIDADE DA MASSA (G) DE FARINHA DE TRIGO MOLE.....	101
TABELA II-7 – EFEITOS DA QUANTIDADE DE TGASE, PH DO TAMPÃO CITRATO E TEMPERATURA NOS PARÂMETROS DE FORMAÇÃO DA MASSA DE FARINHA DE TRIGO MOLE NO FARINÓGRAFO.....	103
TABELA II-8 – EFEITOS DA QUANTIDADE DE TGASE, PH DO TAMPÃO CITRATO E TEMPERATURA NA RESISTÊNCIA À EXTENSÃO (R _m), EXTENSIBILIDADE (E _m) E TRABALHO PARA ESTENDER A MASSA (A) DE FARINHA DE TRIGO MOLE.....	107
TABELA II-9 – EFEITOS DA QUANTIDADE DE TGASE, PH DO TAMPÃO CITRATO E TEMPERATURA NA PEGAJOSIDADE DA MASSA DE TRIGO MOLE	111
TABELA II-10– RESPOSTAS OBTIDAS DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR E DA ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DAS PROTEÍNAS DA MASSA DE FARINHA DE TRIGO MOLE REALIZADA POR FTIR	112
TABELA II-11 – EFEITO DA QUANTIDADE DE ENZIMA, PH DO TAMPÃO E TEMPERATURA DO PREPARO E DESCANSO DA MASSA SOBRE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA MASSA DE FARINHA DE TRIGO MOLE	114
TABELA II-12 – PERCENTAGEM DE ESTRUTURAS α -HÉLICE, FOLHAS- β , RANDÔMICA E VOLTA- β ESTIMADAS PARA A ESTRUTURA SECUNDÁRIA DAS PROTEÍNAS DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE DO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³	121
TABELA II-13 – EFEITO DA QUANTIDADE DE TGASE, PH DO TAMPÃO E TEMPERATURA NA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DAS PROTEÍNAS DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE PREPARADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	122
TABELA II-14 – RESISTÊNCIA À EXTENSÃO (R _m), MÁXIMA EXTENSÃO (E _m) E O TRABALHO REALIZADO (G.MM) PARA MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE FORMULADAS COM TGASE DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i> E COM TGASE COMERCIAL. 126	
TABELA II-15 – PEGAJOSIDADE (G) DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE PREPARADAS COM TGASE COMERCIAL E DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i>	127
TABELA II-16 – ÁREAS ESTIMADAS SOB AS CURVAS DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR PARA AS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE PREPARADAS COM TGASE COMERCIAL E DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i>	130
TABELA II-17 – PERCENTAGEM DE ESTRUTURAS α -HÉLICE, FOLHAS- β , RANDÔMICA E VOLTA- β ESTIMADAS PARA A ESTRUTURA SECUNDÁRIA DAS PROTEÍNAS DAS MASSAS DE FARINHA DE TRIGO MOLE FORMULADAS COM TGASE COMERCIAL E DE <i>STREPTOMYCES SP. CBMAI-837</i>	135

TABELA II-18 – NÚMERO DE ONDA (cm^{-1}) DOS PRINCIPAIS PICOS ENCONTRADOS NAS CURVAS DA DERIVADA SEGUNDA DOS ESPECTROS INFRAVERMELHOS COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....	136
TABELA II-19 – COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS DE TEXTURA E VOLUME ESPECÍFICO DE PÃES FORMULADOS COM FARINHA DE TRIGO DURO E FARINHA DE TRIGO MOLE COM ENZIMA COMERCIAL BIOBOND E EEBC DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837.	150
TABELA I-1 – SUBSTÂNCIAS AVALIADAS PARA ESTABILIZAÇÃO DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. CBMAI-837, CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS E ABREVIATURAS	15
TABELA I-2 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DA ATIVIDADE RESIDUAL DE TGASE EM PRESENÇA DE ESTABILIZANTES A CURTO (2 HORAS), MÉDIO (22 HORAS) E LONGO PRAZO (120 HORAS)	23
TABELA I-3 – PURIFICAÇÃO DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP CBMAI-837 EM <i>BLUE SEPHAROSE</i> CL-6B NA AUSÊNCIA DE L-CISTEÍNA	25
TABELA I-4 – PURIFICAÇÃO DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP CBMAI-837 EM <i>BLUE SEPHAROSE</i> CL-6B NA PRESENÇA DE L-CISTEÍNA	26
TABELA I-5– PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE TGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP CBMAI-837 EM COLUNA PHENYL SEPHAROSE 6 FF EQUILIBRADA COM TAMPÃO FOSFATO 0,05 MOL.L^{-1} PH 7,5 OU 8,0 CONTENDO 1,5 MOL.L^{-1} DE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	30
TABELA I-6- PURIFICAÇÃO DA TGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP CBMAI-837 EM COLUNA ACTIVATED THIOL SEPHAROSE 4B TRIS-HCL 0,1 MOL.L^{-1} PH8,0 ADICIONADO DE 1 MMOL.L^{-1} DE EDTA E 0,3 MOL.L^{-1} DE NaCl	33

Introdução Geral

A transglutaminase (TGase; proteína-glutamina γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13) é uma enzima capaz de catalisar reações de acil transferência entre resíduos dos aminoácidos glutamina e lisina pela formação de ligações covalentes cruzadas entre proteínas, assim como, peptídeos e várias aminas primárias (Cui et al., 2007). Devido à sua habilidade de modificar proteínas, a TGase apresenta potencial de aplicação na indústria de alimentos para o desenvolvimento de novos produtos e modificação das propriedades de produtos já existentes, como capacidade de emulsificação e formação de gel, viscosidade, textura e valor nutricional. Esta enzima também tem despertado a atenção para sua aplicação em outros segmentos industriais, como indústrias farmacêuticas, no tratamento de tecidos de lã e curtimento de couro, imobilização de enzimas e em estudos de bioengenharia de tecidos humanos (Zhu et al., 1995; Polaina e Maccabe, 2007).

As TGases são encontradas em vários tecidos e fluídos corporais de mamíferos, peixes e plantas (Macedo e Sato, 2006). Os primeiros estudos de aplicação e forma de ação desta enzima foram realizados na década de 80 e utilizaram enzima extraída de fígados de cobaias e plasma de bovinos. Contudo, devido ao alto custo de obtenção e as dificuldades de extração e purificação dessas enzimas de origem animal, foram realizados diversos estudos sobre fontes alternativas de origem microbiana para produção da enzima. A primeira transglutaminase microbiana foi obtida a partir de uma linhagem de *Streptoverticillium mobaraense* isolada de solo (Ando et al., 1989). Desde então, esforços têm sido feitos para obter esta enzima em grandes quantidades e com custos de produção menores para aplicações comerciais, como o

desenvolvimento de produtos alimentícios com propriedades funcionais modificadas.

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 por fermentação submersa utilizando como substratos resíduos ou subprodutos agroindustriais e quitina, além de estudar a aplicação desta transglutaminase em massas de farinha de trigo mole, em comparação com a atuação de enzima comercial formulada para aplicação em cereais.

O Capítulo I descreve a avaliação da produção da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando resíduos ou subprodutos agroindustriais no meio de cultivo da linhagem e o efeito da adição de quitina nativa ao meio de cultivo, visando o aumento da atividade enzimática e produtividade de transglutaminase.

No Capítulo II foram avaliados os efeitos da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, em relação à uma formulação comercial de transglutaminase, em massas de farinha de trigo mole (baixo teor protéico) e em pães de forma formulados com farinha de trigo mole.

Este trabalho apresenta em anexo (ANEXO I) o estudo de purificação da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em uma única etapa utilizando os princípios cromatográficos de interação por afinidade, interação hidrofóbica e interação covalente por pontes dissulfeto, além do estudo da estabilização da transglutaminase para elevar o rendimento da purificação.

I. Capítulo I – Produção de transglutaminase por *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando resíduos e subprodutos agroindustriais

Resumo

A transglutaminase catalisa a formação de ligações isopeptídicas envolvendo grupos ϵ -amino de resíduos de lisina (receptor de grupo acil) e o grupo γ -carboxiamida de resíduos de glutamina (doadores de acil) de proteínas. Esta enzima pode ser usada para formar ligações cruzadas intra e intermoleculares, unindo diferentes proteínas e melhorando suas propriedades funcionais. A transglutaminase microbiana apresenta vantagens em relação às aquelas extraídas de plantas e mamíferos sendo o estudo da produção desta enzima de grande relevância para sua aplicação em escala industrial. Neste trabalho, foram estudados os efeitos de diferentes substratos no meio de cultivo para a fermentação submersa de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, uma linhagem previamente isolada de solo brasileiro, em frascos agitados, visando o aumento da atividade e da produtividade da enzima. Foram avaliadas a utilização dos substratos com elevado teor proteico (farinha de feijão branco, farinha de feijão moyashi, farinha de feijão carioca, farinha de amendoim, farelo de soja e farelo de algodão) em substituição à farinha de soja presente no meio de cultivo descrito por Macedo et al (2007), denominado padrão (2,5% de farinha de soja; 2,0% de amido de batata; 0,1% de glicose; 1,0% de peptona; 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4), bem como o uso de melão de cana de açúcar e glicerol como fontes de carbono principais para a fermentação submersa. Entre os substratos proteicos avaliados, a substituição de 2,5% de farinha de soja por 2,5% de farelo de algodão ou de 2,5% de farelo de soja resultou no aumento da atividade enzimática de 1,2 U.mL⁻¹ (214%) e 1,0 U.mL⁻¹

(182%), respectivamente, em relação ao valor obtido pela fermentação do micro-organismo em meio de cultivo padrão ($0,57 \text{ U.mL}^{-1}$). A produtividade obtida no meio com 2,5% de farelo de algodão foi aumentada cerca de 340% em relação à obtida no meio padrão. Em relação às fontes de carbono principais avaliadas, a adição de 2,0% de glicerol ou de 12% de melaço de cana de açúcar permitiu o aumento da produção de atividade de transglutaminase em $0,94 \text{ U.mL}^{-1}$ (167%) e $0,88 \text{ U.mL}^{-1}$ (157%), respectivamente. O glicerol, no entanto, favoreceu o aumento da produtividade, sendo que a máxima atividade observada ocorreu 24 horas antes dos picos observados na fermentação com o meio padrão ou com o meio contendo melaço. Utilizando-se meio de cultura contendo 3% de farelo de soja e 2% de glicerol em substituição a 2,5% de farinha de soja e a mistura de 2% de amido de batata com 0,1% de glicose, foi obtido $0,47 \text{ U.mL}^{-1}$ de transglutaminase após 72 horas de fermentação.

Abstract

Transglutaminase catalyzes the cross-linking reaction between a γ -carboxamide of a glutamine residue (acyl donor) from a peptide bond and the ϵ -amino group of a lysine (acyl receptor). TGase can improve the functional properties of different proteins through inter or intramolecular bonds. The microbial transglutaminase shows advantages over the enzyme extracted from plants and mammals, and hence the study of its production is of great importance for its industrial application. In the present study, the effect of different substrates in the culture medium during the submerged fermentation of *Streptomyces* sp. CBMAI-837, a strain previous isolated from Brazilian soil was studied in shaker flasks aiming to increase the enzyme activity and yield. Substrates with high protein content were evaluated (white bean flour, moyashi bean flour, carioca bean flour, peanut flour, soybean meal and cottonseed meal) replacing the soybean flour of the standard culture medium (2.5% soybean flour, 2.0% potato starch, 0.1% glucose, 1.0% peptone, 0.4% KH_2PO_4 and 0.2% MgSO_4), as well as the use of sugar cane molasses and glycerol as the main carbon sources for the fermentation process. Amongst the substrates with high protein content, the replacement of soybean flour by cottonseed meal and soybean meal increased the transglutaminase activity to 1.2 U.mL^{-1} (214%) and 1.0 U.mL^{-1} (182%), respectively, as compared to the results obtained using the standard culture medium. The yield obtained with cottonseed meal in the culture medium increased about 340% over that obtained in the standard medium. With regard to the main carbon sources, both glycerol and sugar cane molasses increased the transglutaminase activity to 0.94 U.mL^{-1} (167%) and 0.88 U.mL^{-1} (157%), respectively. Glycerol, however, favored the increase in yield of the enzyme production, showing its maximum activity 24 hours before the peak observed in the standard medium or in the

medium containing sugar cane molasses. The medium containing 3% of soybean meal + 2% of glycerol replacing the 2.5% of soybean flour + 2% of potato starch + 0.1% of glucose, lead to 0.47 U.mL^{-1} of transglutaminase activity after 72 hours of fermentation.

I.1. Introdução

A transglutaminase (TGase, E.C. 2.3.2.13) catalisa a formação de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina de proteínas, podendo formar uma rede proteica, além de catalisar a desamidação de resíduos de glutamina.

Inicialmente a TGase era obtida de mamíferos como, por exemplo, do fígado de porquinhos da índia e de sangue bovino, no entanto a extração e purificação da enzima era difícil, além da enzima apresentar coloração avermelhada indesejável.

Em 1989, uma linhagem de *Streptoverticillum mobaraense* foi utilizada na produção de transglutaminase por fermentação submersa (Ando et al., 1989). A partir de então, esta enzima foi produzida industrialmente pela indústria Ajinomoto Co. em colaboração com a Amano Enzyme INC., sendo atualmente comercializada com o nome de Activa[®]. Outras transglutaminases comerciais são encontradas no mercado, entre elas a BioBond.

A transglutaminase (TGase) microbiana apresenta crescente aplicação na indústria de alimentos, devido à sua propriedade de catalisar a formação de ligações cruzadas entre proteínas, sendo capaz de unir pedaços de carne, formar géis protéicos resistentes à temperatura, melhorar a textura de massas e pães, formar filmes proteicos, entre outras.

Atualmente, diversas linhagens de *Streptomyces* sp. tem sido relatadas por apresentarem elevada atividade de transglutaminase, entre elas *Streptomyces platensis*, *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptomyces lividans*. Além dos actinomicetos, alguns *Bacillus* sp. (como o *Bacillus circulans*) também foram descritos como produtores de transglutaminase (Soares et al. 2008; Nagy & Szakacs, 2008).

A engenharia genética também tem sido aplicada para elevar a produtividade de TGase microbiana e facilitar a recuperação da enzima do meio de cultivo (Yu et al., 2008).

A linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foi isolada por MACEDO et al. (2007) de solo brasileiro e apresentou capacidade de produção de TGase por fermentação em meio de cultivo viscoso composto de 2,5% de farinha de soja; 2,0% de amido de batata; 1,0% de peptona; 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 .

Neste capítulo foi estudada a utilização de produtos ou subprodutos da indústria agrícola como farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de algodão, farelo de soja, melaço de cana de açúcar e glicerol como componentes do meio de cultura para fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e aumento da produção da transglutaminase. Foi estudado também a elicitação do metabolismo do micro-organismo pela adição de quitina no meio de cultivo visando a promoção do crescimento celular e produção da transglutaminase.

I.2. Revisão Bibliográfica

I.2.1. Transglutaminase

A transglutaminase é uma enzima que catalisa a transferência de um grupo acil entre uma γ -carboxiamida de resíduos de glutamina e diversas aminas primárias, incluindo poliaminas. Em proteínas, a TGase utiliza como substrato aceitor de grupos acil os resíduos ϵ -amino de lisinas, formando ligação isopeptídicas ϵ -(γ -glutamil)lisina. Na ausência de aminas primárias, a TGase catalisa a desamidação dos resíduos de glutamina. A **Figura I-1** ilustra as reações catalisadas pela TGase.

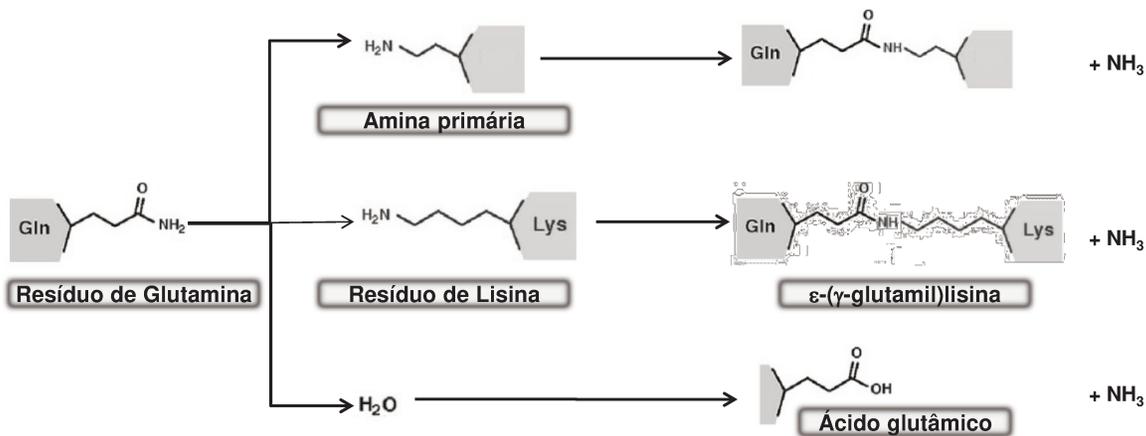


Figura I-1- Reações catalisadas pela TGase.

A introdução de ligações isopeptídicas em proteínas promove a formação de uma rede proteica com características funcionais diferenciadas em termos de retenção de água, características reológicas, capacidade emulsificante, solubilidade, entre outras, encontrando aplicação não apenas na indústria de alimentos como também na área médica, farmacêutica, biotecnológica e têxtil (Yokoyama et al., 2004; Tanaka et al., 2008; Zhu & Tramper, 2009; Dash et al., 2011).

A TGase está presente em tecidos animais, vegetais e micro-organismos (Folk, 1980; Kang & Cho, 1996; Cariello et al., 1997; Ando et al., 1989; Kim et al., 2000; Souza et al., 2008). As funções desempenhadas pelas transglutaminases nesses organismos são variadas, embora ainda não totalmente elucidadas.

I.2.2. Produção da transglutaminase microbiana

Em 1989, Ando et al. isolaram uma linhagem de *Streptoverticillum mobaraense* que foi utilizada na produção de transglutaminase por fermentação submersa em reator de 20L, obtendo atividade de $2,5 \text{ U.mL}^{-1}$ de caldo fermentado. O meio de cultivo utilizado apresentava em sua composição 2,0% de polipeptona; 2,0% de amido solúvel; 0,2% de K_2HPO_4 ; 0,2% de extrato de

levedura; 0,1% de $MgSO_4$ e 0,05% de surfactante. A partir de então, diversas linhagens de micro-organismos foram investigadas quanto à capacidade de produção de TGase, entre elas actinomicetos e bacilos (Kim et al., 2000; Cui et al., 2007; Souza et al., 2008).

A TGase de *Streptomyces* sp. é uma enzima extracelular, podendo ser recuperada do meio de cultivo após centrifugação, não sendo necessário realizar a ruptura das células para obtenção da enzima (Zhu et al., 1995). A TGase microbiana tem sido obtida através da fermentação submersa e, em menor escala, por fermentação em estado sólido, de linhagens de *Streptomyces* sp. A atividade enzimática obtida por fermentações submersas variam de 0,28 a 5,0 $U.mL^{-1}$ de caldo fermentado (Soo-Hwan et al., 2009) para micro-organismos sem alterações genéticas. A transglutaminase microbiana apresenta ainda a vantagem, frente à enzima obtida de tecidos animais, na aplicação industrial, de ser cálcio independente (Ando et al., 1989; Yokoyama et al., 2004; Cui et al., 2007; Macedo, 2009).

Macedo et al. (2007) isolaram de solo brasileiro a linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 que apresentou atividade de transglutaminase. O meio de cultivo composto de 2,5% de farinha de soja, 2% amido de batata; 1% de peptona; 0,1% de glicose; 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de $MgSO_4$ foi utilizado para cultivo da linhagem e a atividade enzimática obtida foi de 1,14 $U.mL^{-1}$ após 120 horas de fermentação em agitador rotativo a 100 rpm e 30°C.

Soo-Hwan et al. (2009) isolaram de solos florestais coreanos a linhagem de *Streptomyces platensis* YK-2 que apresentou elevada atividade de TGase utilizando meio de cultivo composto de 2% de glicose, 1% de polipeptona, 1% de proteína de soja hidrolisada e 0,1% de $MnCl_2$, incubado em agitador rotativo a 150 rpm e 28°C por 5 dias. Foram obtidas atividades entre 4 e 5 $U.mL^{-1}$ de meio fermentado.

Portilla-Rivera et al. (2009) estudaram o uso de melão de cana-de-açúcar e de glicerol como fontes de carbono para obtenção de TGase pela fermentação da linhagem de *Streptomyces ladakanum* NRRL 3191, sendo que conseguiram obter atividade de TGase de $0,46 \text{ U.mL}^{-1}$ de caldo fermentado, após 72 horas de fermentação, utilizando o meio composto de 30 g.L^{-1} de melão e 30 g.L^{-1} de glicerol; $38,4 \text{ g.L}^{-1}$ de caseinato de sódio; $10,5 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona; $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura; 5 g.L^{-1} de Na_2HPO_4 ; 2 g.L^{-1} de KH_2PO_4 e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de MgSO_4 .

Zhang et al. (2012) obtiveram $4,3 \text{ U.mL}^{-1}$ de atividade de TGase pela fermentação submersa da linhagem *Streptomyces mobaraensis* cultivada em meio padrão contendo $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de MgCl_2 . A atividade enzimática e a produtividade da fermentação foram duas vezes superiores à obtida no meio padrão (3% polipeptona, 1% de amido solúvel, 1% de frutose, 0,2% K_2HPO_4 e 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sendo evidenciado que o estresse causado pelo MgCl_2 estimulou a diferenciação micelial, favorecendo a produção da TGase.

A TGase microbiana foi obtida também por fermentação em estado sólido, embora poucos relatos tenham sido encontrados na literatura. Souza et al. (2008) avaliaram o uso de resíduos de milho, resíduo de arroz, resíduo fibroso de soja, casca de soja e bagaço de malte, umedecidos com solução salina ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de MgSO_4 ; $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 ; $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ K_2HPO_4 ; $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ NH_4NO_3 ; $0,02 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCl_2 e $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de FeCl_2) para a produção de TGase por fermentação em estado sólido da linhagem de *Bacillus circulans* BL32, isolado da Amazônia. A fermentação foi realizada em reatores cilíndricos, a 30°C por 168 horas, sendo insuflado ar estéril saturado de umidade na vazão de $0,25 \text{ L.min}^{-1}$. O uso do resíduo fibroso de soja possibilitou a obtenção de maiores atividades enzimáticas, sendo obtido $1,28 \text{ U.g}^{-1}$ de substrato seco em 48 horas de fermentação.

NAGY e SZAKACS (2008) estudaram a produção de transglutaminase por linhagens de *Streptomyces* (*S. mobaraensis* NRRL B-3729, *S. paucisporogenes* ATCC 12596 e *S. platensis* NRRL 2364) por fermentação em estado sólido. Como substratos foram utilizados farinhas e farelos de cereais e leguminosas umedecido com solução de sais (0,8 mg.L⁻¹ de MgSO₄; 5,0 g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 1,0 g.L⁻¹ de NaCl; 5,0 g.L⁻¹ de NH₄NO₃; 1 mg.L⁻¹ de CoCl₂; 1,7 mg.L⁻¹ de ZnSO₄; 2,5 mg.L⁻¹ de FeSO₄ com pH ajustado para 6,0) e inoculados com 1mL de suspensão de células dos micro-organismos em água destilada. Os frascos foram incubados a 30°C sem agitação. Os melhores resultados foram obtidos pela fermentação da linhagem *S. platensis* NRRL 2364 utilizando feijão vermelho como substrato sendo obtida atividade de TGase máxima de 5,1 U.g⁻¹ de substrato seco após 168 horas de fermentação.

I.2.2.1. Meios de cultivo e indução da produção de TGase por fermentação submersa de linhagens de *Streptomyces* sp.

Os Streptomycetos são bactérias filamentosas, aeróbias, gram-positivas amplamente empregadas na produção de metabólitos, entre eles antibióticos e enzimas (Whitaker, 1992; O'Cleirigh et al., 2005). A morfologia dessas bactérias assemelha-se à de fungos filamentosos quando em cultivo submerso, variando de *pellets* maciços a hifas suspensas (Stanbury et al., 2003; O'Cleirigh et al., 2005).

As variações morfológicas das culturas submersas influenciam diretamente a produção dos metabólitos e podem ser induzidas pelos parâmetros de processo utilizados e viscosidade do meio de cultivo (Stanbury et al., 2003; Junker et al., 2004; O'Cleirigh et al., 2005). Macedo et al. (2007) observou que o meio de cultivo viscoso foi capaz de estimular a produção de

TGase da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837, sendo observada a formação de uma massa celular densa ao invés de *pellets*.

A função da TGase no ciclo de vida dos Streptomycetos ainda não é conhecida, porém há indícios de que atue na fortificação dos micélios e formação de esporos por estas bactérias (Zotzel et al., 2003). Recentemente Chen et al. (2012) evidenciaram que TGase está relacionada à diferenciação morfológica da linhagem *Streptomyces hygroscopicus* e conseguiram elevar a produção da TGase prolongando a fase de diferenciação micelial.

Bagagli e Sato (2013) evidenciaram que a produção de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foi elevada de 3,4 vezes em fermentação submersa ao utilizar uma estratégia com dois estágios de temperatura e agitação, na qual a temperatura foi reduzida de 34°C para 26°C e a agitação de 350 rpm para 150 rpm após 24 horas de fermentação.

Além das propriedades físicas do meio e parâmetros de processo, os componentes do meio de cultivo também podem influenciar a produção de metabólitos pelas linhagens de *Streptomyces* sp. Em geral, a mimetização do habitat natural dessa linhagem no meio de cultivo para fermentação pode proporcionar a diferenciação celular e a produção de metabólitos secundários e outros produtos (Chater et al., 2010).

I.2.2.1.1. Uso de produtos e subprodutos agrícolas para produção de TGase de *Streptomyces* sp.

Na fermentação submersa para obtenção de enzimas, o custo do meio de cultivo representa cerca de 30% dos custos de produção, sendo de grande valia a realização de estudos de otimização de seus componentes bem como a introdução de resíduos ou subprodutos industriais na sua formulação (Stambury et al., 1995).

A utilização de subprodutos ou resíduos de agroindústrias em processos fermentativos diversos apresenta importância econômica, uma vez que alia baixos custos à elevada quantidade de proteínas e carboidratos remanescentes nesses materiais, reduzindo, assim os custos dos meios de fermentação.

Entre os subprodutos utilizados, pode-se citar o farelo de soja, farelo de algodão e farelo de amendoim. O melaço também é um subproduto, com elevado teor de carboidratos (principalmente mono e dissacarídeos) e vitaminas, que apresenta baixo custo e pode ser utilizado para o cultivo de micro-organismos, inclusive para a produção de transglutaminase (Portilla-Rivera et al., 2009).

Esses substratos, abundantes no Brasil, ainda são pouco explorados para a obtenção da TGase microbiana, sendo relatado na literatura a aplicação de subprodutos agroindustriais para produção de TGase por fermentação em estado sólido de *Bacillus circulans* BL32 (Souza et al., 2008).

Desta forma, o estudo da aplicação destes subprodutos e resíduos da agroindústria brasileira pode reduzir o custo do meio de cultivo submerso para obtenção de TGase além de poder estimular a produção uma vez que são ricos em nutrientes.

I.2.2.1.2. Uso da quitina nativa no meio de cultivo de *Streptomyces* sp.

Streptomycetos são capazes de utilizar a quitina como fonte de carboidratos e nitrogênio em seu metabolismo. A quitina é um polissacarídeo nitrogenado, insolúvel, presente no exoesqueleto de artrópodes e na parede celular de diversos fungos (Fleuri e Sato, 2005). Desta forma, os Streptomycetos são favorecidos em habitats contendo quitina. O uso da quitina

nativa por estes micro-organismos é superior ao da quitina coloidal (Schrempf, 2001).

Os Streptomyces podem metabolizar a quitina de organismos vivos (fungos e insetos) ou resíduos desses organismos presentes no meio ambiente. O uso da quitina por essas bactérias filamentosas envolve o desenvolvimento de um sistema extracelular complexo que envolve a produção de proteínas que ligam à quitina e metabólitos secundários, como os antibióticos, produzidos durante a expansão das hifas aéreas e esporulação (Chater et al., 2010).

Não há relatos na literatura do uso de quitina como substrato para obter TGase microbiana. A TGase da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 é produzida durante o período estacionário de seu crescimento e a formação micelial favoreceu a produção (Bagagli, 2009). Essa similaridade com a produção da TGase e a produção de metabólitos secundários e outras enzimas por linhagens diversas de *Streptomyces* sp. quando em presença de quitina (Schrempf et al., 2001; Chater et al., 2010) é sugestiva de que o uso desse polissacarídeo no meio de cultivo pode favorecer a formação de hifas e esporulação da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837, favorecendo também a produção da TGase.

I.3. Material e métodos

I.3.1. Metodologias analíticas

I.3.1.1. Determinação de massa celular seca

Para a determinação da massa celular seca, alíquotas de 2 mL do meio de cultura foram centrifugadas a 9630 x *g* por 10 minutos a 5°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade de transglutaminase (descrita no

item I.3.1.2) e a massa celular foi lavada com 5 mL de água destilada. A massa celular foi recuperada por centrifugação como descrito acima. O processo de lavagem foi repetido até que o sobrenadante não apresentasse coloração. As amostras de massa celular precipitadas foram transferidas para placas de Petri, secas e previamente pesadas, as quais foram mantidas em estufa a 105°C até atingir massa constante. Do valor obtido foi subtraída a massa referente ao branco (meio de cultivo não inoculado submetido à mesma sequência de procedimentos do tratamento das amostras). O resultado foi expresso em gramas de massa seca por mL de meio de cultivo.

I.3.1.2. Determinação da atividade de transglutaminase

A atividade de transglutaminase foi determinada utilizando-se o substrato N-carbobenzoxi-L-glutaminil-glicina (CBZ-glutaminilglicina), como descrito por GROSSOWICZ et al. (1950) e adaptado por FOLK e COLE (1966).

As misturas de 200 µL de enzima; 75 µL de solução de CBZ-glutaminilglicina (Sigma C6154-1G) 30mM; 25 µL de solução de hidroxilamina 2M; 200 µL de tampão citrato 0,2 mol.L⁻¹ 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 mol.L⁻¹ e 1/3 de solução de cloreto férrico 5% em HCl 0,1 mol.L⁻¹ (v:v). A mistura foi centrifugada por 1 minuto e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 525 nm contra o branco.

Uma unidade de atividade de transglutaminase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 µmol de ácido hidroxâmico por minuto. A curva padrão foi preparada com o L-ácido glutâmico-γ-ácido monohidroxâmico (Sigma G2253).

I.3.2. Estudo da utilização de produtos e subprodutos agroindustriais como substratos da fermentação submersa de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 para produção de TGase em frascos agitados.

I.3.2.1. Fermentação submersa de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados para obtenção de TGase

A fermentação submersa foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Os frascos foram inoculados com 2 cilindros de ágar (4,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10,0 g.L⁻¹ de extrato de malte, 4,0 g.L⁻¹ de glicose, 20 g.L⁻¹ de ágar-ágar, pH 7,0) de 1,4 cm de diâmetro, recobertos com o micro-organismo *Streptomyces* sp. CBMAI-837, incubado a 30°C por 5 dias. Os frascos Erlenmeyer foram incubados durante 120 horas a 150 rpm. A atividade de transglutaminase foi determinada no sobrenadante do caldo fermentado centrifugado a 9.630 x *g* por 10 minutos a 5°C como descrito no item I.3.1.2.

I.3.2.2. Seleção de substratos com elevado teor proteico para a fermentação submersa de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase

Foi avaliada a substituição de 2,5% de farinha de soja do meio de cultivo descrito por Macedo et al. (2007) por 2,5% de farinha de feijão branco, farinha de feijão Moyashi, farinha de feijão carioca, farinha de amendoim, farelo de soja ou farelo de algodão como substrato para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e produção de TGase.

A produção da TGase foi realizada em frascos Erlenmeyer agitados, conforme descrito no item I.3.2.1, sendo que a atividade enzimática foi medida

após 120 horas de fermentação, tendo como base o meio de cultivo composto de 2,5% de farinha de soja, 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 .

Os feijões e amendoim foram adquiridos em mercado local, moídos em moinho de pás e passados por peneira de 1mm de abertura. O farelo de soja com alto teor de proteína e farelo de algodão foram doados pela empresa Bunge Foods S/A e foram usados diretamente para formular os meios de cultivo. A farinha de soja torrada (Kinako) foi comprada em mercado local e usada diretamente no meio de cultivo.

Os substratos que apresentaram valores de atividade de TGase superiores ao encontrado no meio padrão foram selecionados para avaliação da cinética de produção da TGase.

I.3.2.3. Cinética de fermentação e produção de TGase por *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de algodão e farelo de soja no meio de cultivo

A fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foi testada utilizando-se os meios de cultura contendo 2,5% de farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de soja ou farelo de algodão, 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 como descrito no item I.3.2.1.

O acompanhamento da atividade de TGase e da massa seca de micro-organismos foi realizado após 28, 52, 72 102 e 144 horas de fermentação a 30°C. Os ensaios foram realizados em duplicata.

I.3.2.3.1. Caracterização físicoquímica da farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de soja e farelo de algodão, utilizados como substratos proteicos para a fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

Os substratos avaliados com maior impacto na produção da enzima foram caracterizados quanto ao teor de proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos de acordo com as metodologias da AOAC (18^a edição, 2005).

O tamanho das partículas maiores e menores que 0,8 mm foram quantificados peneirando-se 100g de cada material em peneira de mesh #20 (0,841 mm), usando como referência o método AOAC 965.22 (AOAC, 2010). A peneira foi mantida sob agitação constante por 5 min a 3800 rpm. As partículas retidas na peneira foram pesadas e consideradas como maiores que 0,8 mm, as partículas que passaram pela peneira foram consideradas como menores que 0,8 mm.

I.3.2.4. Avaliação de melão e glicerol como fonte de carbono no meio de cultura para fermentação submersa de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase

O melão e o glicerol, fontes de carbono de baixo custo, foram avaliados como fontes de carbono para substituir a glicose e o amido de batata presentes no meio de cultivo padrão. Foram avaliadas 1 formulação contendo o melão (Meio 1) e duas formulações contendo o glicerol (Meios 2 e 3) descritas na **Tabela I-1**. O melão utilizado (80,1°Brix) foi fornecido por indústria local e adicionada ao meio de cultivo a fim de se adicionar 12% de sólidos solúveis provenientes deste componente. O glicerol utilizado foi o comercial 87% (v:v).

A produção da TGase foi realizada em frascos Erlenmeyer agitados, conforme descrito no item I.3.2.1, sendo realizado o acompanhamento da atividade enzimática e da massa seca de micro-organismos após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação.

Tabela I-1- Meios de cultivo contendo melaço de cana de açúcar e glicerol para fermentação e produção de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

Materiais	Composição (%)			
	Padrão	Meio 1	Meio 2	Meio 3
Farinha de soja	2,5	2,5	2,5	2,5
Peptona	1	1	1	1
Amido de batata	2	0	0	0
Glicose	0,1	0	0,05	0
KH ₂ PO ₄	0,4	0,4	0,4	0,4
MgSO ₄	0,2	0,2	0,2	0,2
Melaço de cana de açúcar	0	12	0	0
Glicerol	0	0	2	2

I.3.2.5. Delineamento fatorial 2² para estudo do efeito da porcentagem de farelo de soja e glicerol no meio de cultura para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados

O efeito da adição de farelo de soja e glicerol ao meio de cultivo composto de 1% de peptona, 0,4% de KH₂PO₄ e 0,2% de MgSO₄ para produção de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foi estudado através de um delineamento fatorial 2² com 3 repetições no ponto central e 4 pontos axiais. A **Tabela I-2** apresenta os níveis estudados para cada substrato.

Tabela I-2 – Ensaio do delineamento fatorial 2² para estudo do efeito da quantidade de farelo de soja e glicerol no meio de cultivo para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e produção de TGase.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
%(m:v) Farelo de soja	2,50	2,90	4,00	6,10	5,50
%(m:v) Glicerol 87%	0,50	0,94	2,00	3,06	3,50

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo conforme descrito no item I.3.2.1. Amostras foram coletadas após 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação, centrifugadas e a atividade de TGase foi determinada conforme descrito no item I.3.1.1.

O delineamento fatorial foi analisado utilizando o software Statistica 7 (Statsoft, Inc.) com 90% de significância.

I.3.2.6. Delineamento fatorial 2² para estudo do efeito da porcentagem de farelo de algodão e glicerol no meio de cultura para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados

O efeito da adição de farelo de algodão e glicerol no meio de cultivo composto de 1% de peptona, 0,4% de KH₂PO₄ e 0,2% de MgSO₄ para produção de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foi estudado através de um delineamento fatorial 2² com 3 repetições no ponto central e 4 pontos axiais. A **Tabela I-3** apresenta os níveis estudados para cada substrato.

Tabela I-3 – Ensaio do delineamento fatorial 2² para estudo do efeito da quantidade de farelo de algodão e glicerol no meio de cultivo para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e produção de TGase.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
%(m:v)Farelo de algodão	1,50	1,90	2,50	3,10	3,50
%(m:v)Glicerol 87%	1,50	1,90	2,50	3,10	3,50

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo conforme descrito no item I.3.2.1. Amostras foram coletadas após 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação, centrifugadas e a atividade de TGase foi determinada conforme descrito no item I.3.1.1.

O delineamento fatorial foi analisado utilizando o software Statistica 7 (Statsoft, Inc.) com 90% de significância.

I.3.3. Avaliação do uso de quitina no meio de cultura para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase

Foi avaliado o efeito da adição de 1% de quitina nativa (Sigma C9213) no meio de cultura padrão (composto de 2,5% de farinha de soja, 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH₂PO₄ e 0,2% de MgSO₄) na fermentação submersa de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e produção de transglutaminase.

A fermentação foi realizada em frascos agitados como descrito no item I.3.2.1. Amostras foram retiradas após 28, 52, 72, 102 e 144 horas de fermentação para determinação da atividade de TGase e de crescimento microbiano conforme descrito nos itens I.3.1.2 e I.3.1.1, respectivamente.

I.4. Resultados e discussões

I.4.1. Estudo da utilização de produtos e subprodutos agroindustriais como substratos para fermentação submersa de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase

I.4.1.1. Seleção de substratos com elevado teor proteico para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase

A **Figura I-2** apresenta as atividades de TGase bem como os desvios padrões de cada amostra e intervalos de confiança para o teste de Tukey utilizado para comparar as médias (95% de confiança) obtidas após 120 horas de fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em diferentes meios de cultura contendo 2,5% farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de algodão ou farelo de soja, 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 .

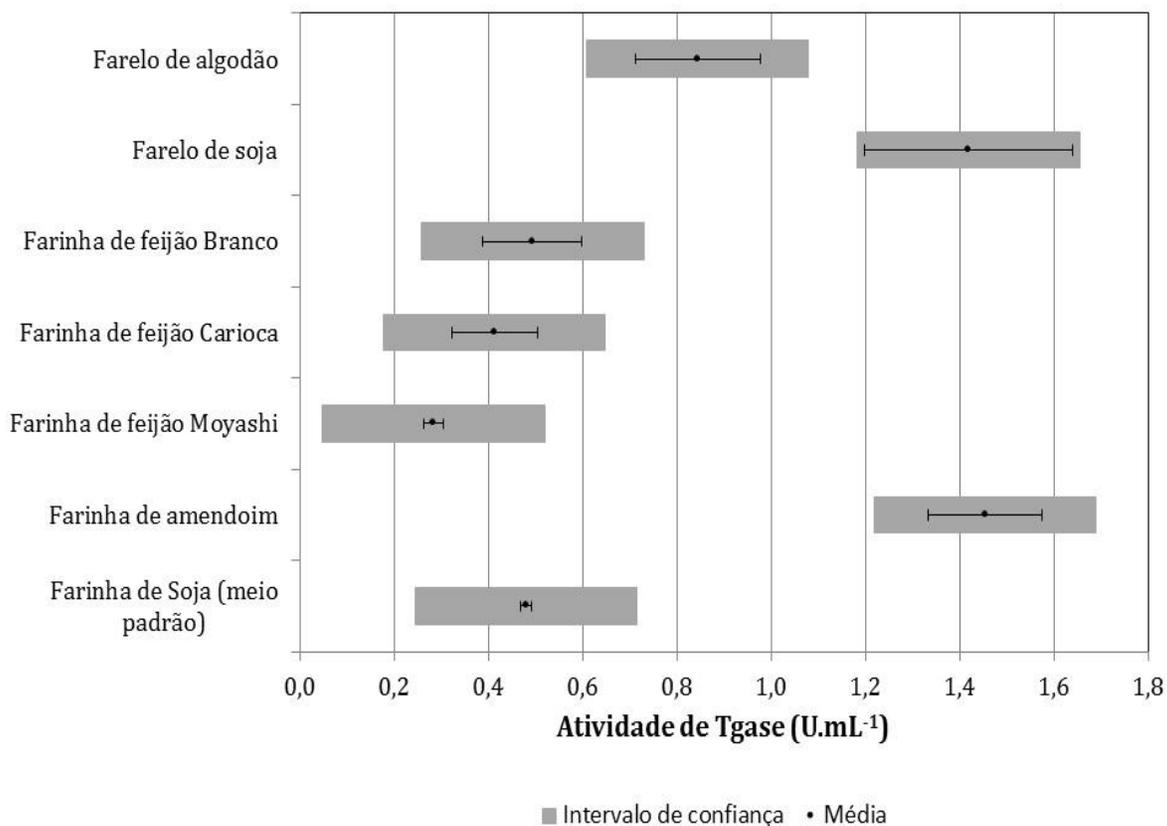


Figura I-2 - Atividade de transglutaminase obtida pela fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando meios de cultura contendo diferentes substratos.

De acordo com os resultados obtidos, foi verificado que o uso de 2,5% de farinha de amendoim ou 2,5% de farelo de soja no meio de cultivo para a fermentação submersa da linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 proporcionaram valores de atividade de TGase (1,45±0,12 U.mL⁻¹ e 1,41±0,22 U.mL⁻¹, respectivamente) significativamente superiores ao valor obtido para o meio de cultivo padrão contendo 2,5% de farinha de soja (0,48±0,01 U.mL⁻¹) após 120 h de fermentação. A adição de 2,5% de farelo de algodão ao meio de cultivo apresentou produção de atividade de TGase considerável (0,84±0,13 U.mL⁻¹), porém não foi possível distinguir estatisticamente a produção de enzima neste meio de cultivo evno meio padrão após 120 horas de fermentação.

As atividades de TGase obtidas utilizando-se 2,5% de farinha de feijão branco ($0,49 \pm 0,10$ U.mL⁻¹) ou 2,5% de farinha de feijão carioca ($0,41 \pm 0,09$ U.mL⁻¹), no meio de cultura submerso, não foram estatisticamente diferentes da atividade determinada para meio padrão. A atividade obtida com a adição de 2,5% de farinha de feijão moyashi ($0,28 \pm 0,02$ U.mL⁻¹) em substituição à farinha de soja apresentou resultados significativamente inferiores. Desta forma, esses substratos não foram utilizados nos estudos seguintes, uma vez que o seu uso apenas se justificaria em caso de elevada produção da enzima em relação à farinha de soja.

O desvio padrão encontrado nas fermentações realizadas com o farelo de soja foi elevado, embora tenha sido possível diferenciar estatisticamente este substrato dos demais. O farelo de soja apresenta tamanhos de partículas variados e os mesmos não foram padronizados para emprego na fermentação, o que dificulta a distribuição destas partículas de forma homogênea entre os frascos Erlenmeyers onde a fermentação foi realizada. De forma similar, o farelo de algodão apresenta partículas aglomeradas pela fibra residual de algodão, dificultando a distribuição homogênea das partículas nos diferentes recipientes, embora, visualmente, tenha-se tentado manter a quantidade de partículas iguais entre os frascos.

I.4.1.1.1. Cinética de fermentação e produção de TGase pela linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando-se farinha de amendoim, farelo de soja, farelo de algodão ou farinha de soja no meio de cultura

A cinética de crescimento do micro-organismo e produção de transglutaminase pela linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foi testada como descrito no item I.3.2.3. A **Figura I-3** apresenta a cinética de crescimento

microbiano e de produção da enzima TGase (valores médios) pela fermentação submersa de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em meios de cultivo contendo 2,5% de farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de soja ou farelo de algodão, 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 no período entre 28 e 144 horas de fermentação.

As letras sobre os pontos dos gráficos são referentes aos resultados do teste de Tukey (95% de confiança) utilizado para comparar os respectivos valores de cada cinética entre si.

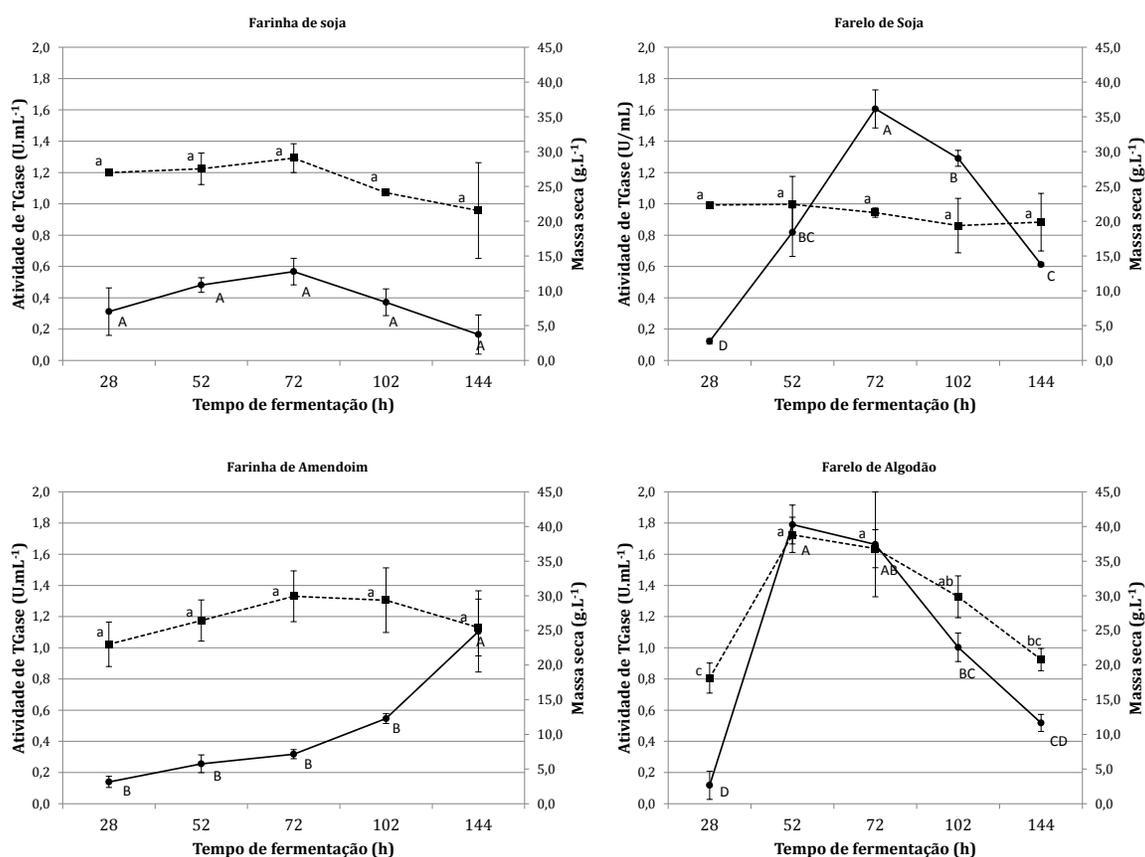


Figura I-3 – Cinética de crescimento microbiano e de produção da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 por fermentação submersa utilizando farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de soja e farelo de algodão no meio de cultivo. Crescimento microbiano (linha pontilhada); Atividade de TGase (linha sólida).

A produção de transglutaminase pela linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em meio de cultura contendo 2,5% de farelo de soja ($1,61 \pm 0,12$ U.mL⁻¹) foi cerca de 2,8 vezes a obtida no meio de cultura contendo 2,5% de farinha de soja após 72 horas de fermentação.

O uso da farinha de amendoim no meio de cultivo possibilitou a obtenção de atividade enzimática de $1,11 \pm 0,26$ U.mL⁻¹, no entanto este valor foi observado apenas após 144 horas de fermentação. Com o uso do farelo de algodão na composição do meio de cultivo, a máxima atividade de TGase foi obtida após 52 horas de fermentação sendo observada atividade de $1,79 \pm 0,12$ U.mL⁻¹, valor 3,2 vezes superior ao obtido para o meio padrão.

A cinética de crescimento do micro-organismo em meio padrão e em meio contendo farelo de soja, de forma análoga ao perfil cinético de produção da enzima, foram similares, sendo que após 28 horas o micro-organismo já alcançou a fase estacionária. Não foi observada diferença estatística entre os tempos de fermentação para ambos os substratos. Com o uso da farinha de amendoim, o micro-organismo apresentou um pequeno crescimento entre 28 e 76 horas de fermentação e após este período a massa seca começou a decair. Para o meio de cultivo contendo farelo de algodão também foi observado aumento de massa seca entre 28 e 52 horas de fermentação, sendo que este valor diminuiu rapidamente após 76 horas de fermentação.

As **Figura I-4** (A) e (B) apresentam, respectivamente, as atividades médias máximas e os valores médios de produtividade máxima da enzima TGase obtida da fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 nos diferentes meios de cultivo avaliados, bem como, os desvios padrões e intervalos de confiança para o teste de Tukey utilizado para comparar as médias com 95% de confiança. A produtividade da enzima foi considerada como a razão entre a atividade de TGase por mL de caldo fermentado e o tempo de fermentação em horas.

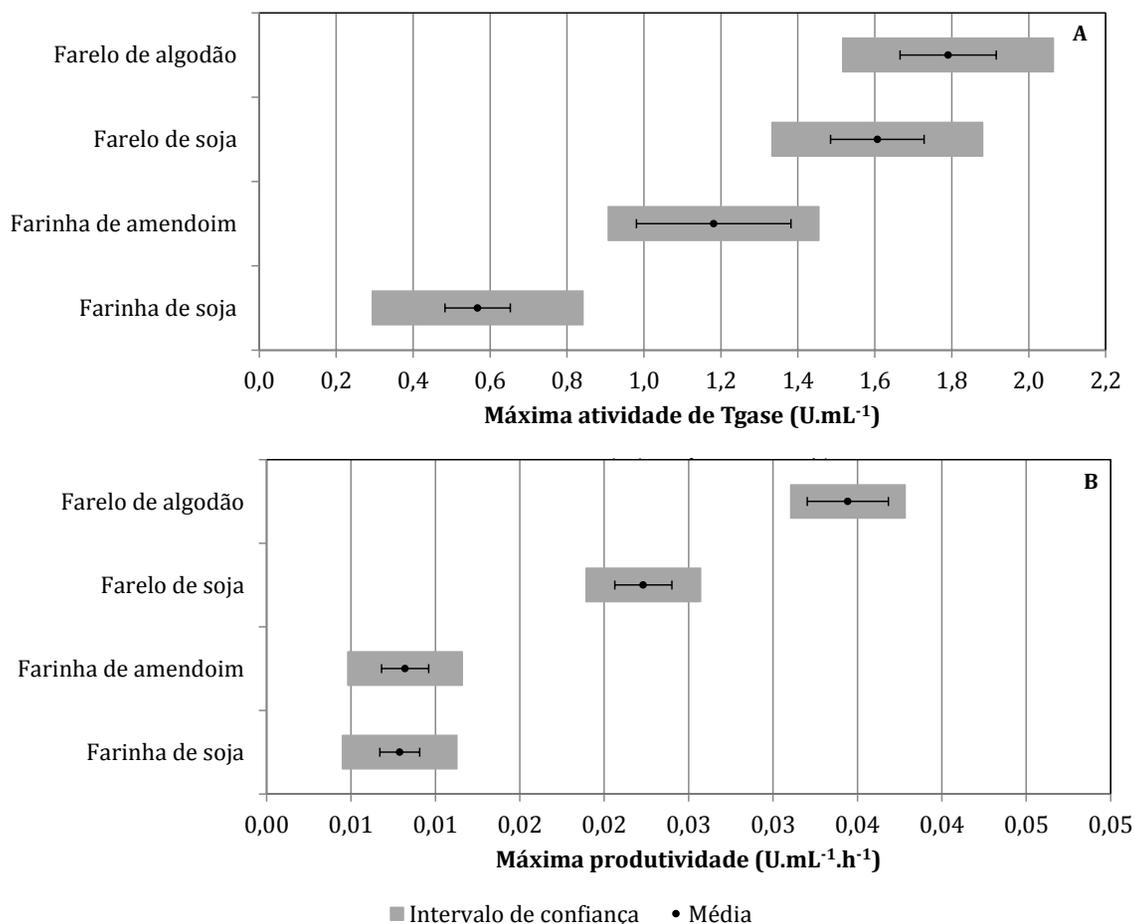


Figura I-4 - (A) Atividades médias de TGase máximas e (B) produtividades médias máximas de TGase obtidas na fermentação submersa da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em meios de cultura contendo diferentes fontes de proteínas.

O meio de cultivo contendo farelo de algodão apresentou máxima atividade enzimática superior ao meio padrão contendo farinha de soja ($1,79 \pm 0,13$ e $0,57 \pm 0,08 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente) bem como proporcionou o aumento da produtividade de 337% , seguido pelo meio de cultivo contendo o farelo de soja (aumento de 183%). Esses dois substratos são gerados pela indústria de óleos vegetais, sendo comercializados a baixos custos como subprodutos ou resíduos agroindustriais. Desta forma o farelo de algodão e o farelo de soja são alternativas vantajosas para a produção de TGase por fermentação, considerando-se o preço de cada substrato na **Figura I-5**.

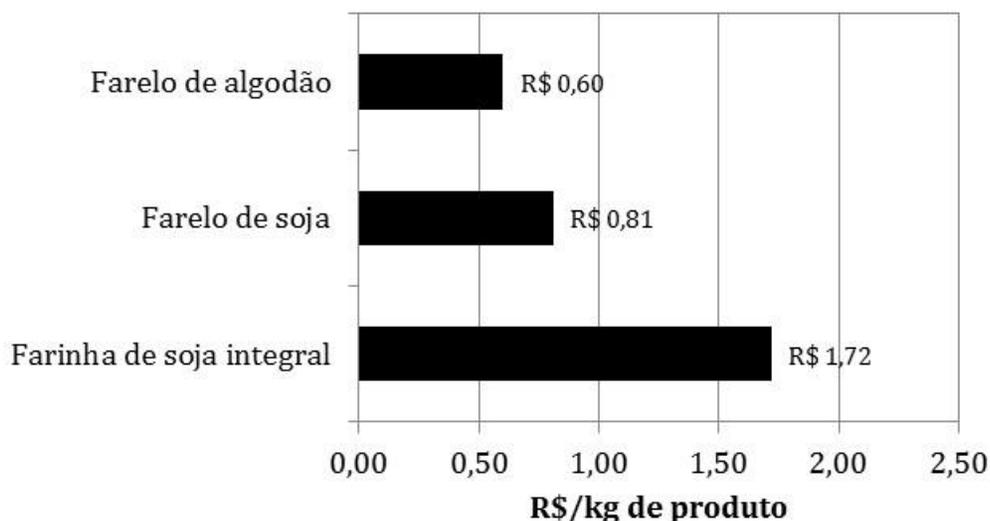


Figura I-5 – Preço por kg da farinha de soja, farelo de soja e farelo de algodão. Fonte: Cerealista São José

Desta forma a substituição de 25 g.L⁻¹ de farinha de soja por 25 g.L⁻¹ de farelo de algodão no meio de cultivo submerso da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 proporcionou a redução de 65% no custo do substrato, o que reflete redução de cerca de 2% no custo total do meio de cultivo, além do aumento da produtividade de 260%.

I.4.1.1.2. Caracterização dos substratos proteicos e correlação com a produção da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

A **Tabela I-4** apresenta a composição centesimal (proteínas, carboidratos, lipídeos, cinzas e umidade) dos substratos farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de soja e farelo de algodão.

Tabela I-4 – Teor de proteínas, lipídeos, carboidratos e cinzas da farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de soja e farelo de algodão

Substrato	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
Farinha de soja	38,44	30,36	21,53	4,75	4,92
Farinha de amendoim	28,29	18,90	44,43	2,33	6,05
Farelo de soja	49,24	31,53	1,40	5,90	11,93
Farelo de algodão	25,91	55,80	7,83	4,04	6,42

Na literatura, há poucos relatos sobre o uso de substratos com elevado teor proteico para produção de TGase por fermentação submersa, no entanto, Nagy e Szakacs (2008) estudaram a produção de TGase por diversas linhagens de *Streptomyces* sp., em meio de cultivo em estado sólido, utilizando como substrato leguminosas e cereais sendo que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas nas fermentações realizadas com substratos com os maiores teores de proteína, como o feijão vermelho.

A **Tabela I-5** apresenta a percentagem de partículas maiores e menores que 0,8 mm presente em cada substrato proteico avaliado.

Tabela I-5 - Percentagem de partículas maiores e menores que 0,8mm presentes na farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de algodão e farelo de soja

Tamanho da partícula	%			
	Farinha de soja	Farinha de amendoim	Farelo de algodão	Farelo de soja
> 0,8 mm	0	0	83,5	72,9
< 0,8 mm	100	100	16,5	27,1

A **Figura I-6 (A-D)** ilustra a aparência visual dos substratos farinha de soja, farinha de amendoim, farelo de algodão e farelo de soja utilizados no meio de cultura para fermentação submersa da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 para produção de TGase.

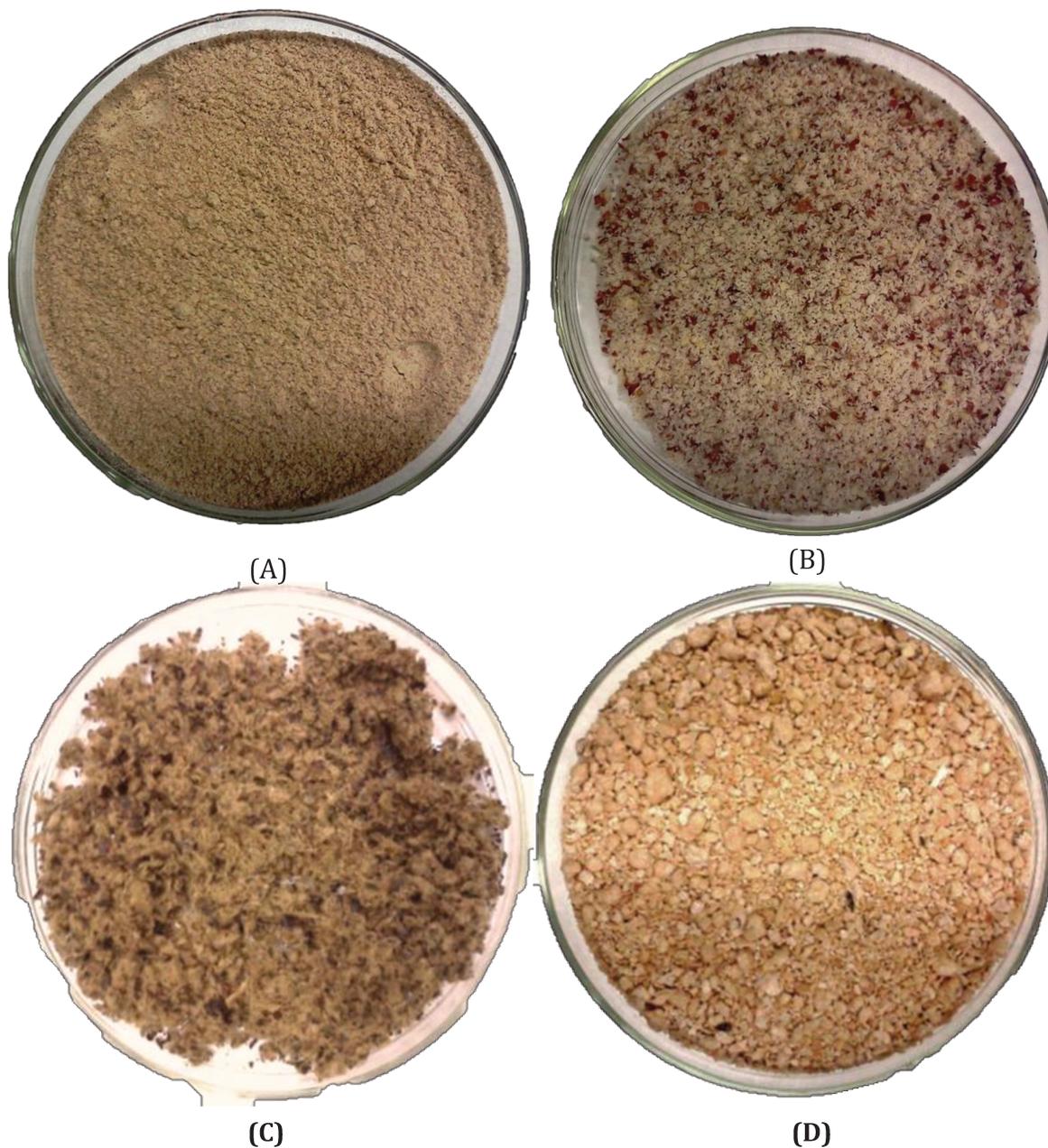


Figura I-6 - (A) Farinha de soja; (B) Farinha de amendoim; (C) Farelo de algodão (D) Farelo de soja.

A farinha de amendoim contém alto teor de lipídeos (44,3%) e baixa quantidade de carboidratos (19,9%) em relação aos demais substratos. Esses fatos podem ter interferido na produtividade da TGase de *Streptomyces* sp.

CBMAI-837, em que a máxima atividade foi encontrada após 144 horas de fermentação.

Entre os substratos avaliados, o farelo de algodão (25,9% de proteína) não apresentou a maior percentagem de proteínas entre os substratos avaliados, no entanto apresentou elevada quantidade de carboidratos (55,8%), granulometria com 83% das partículas acima de 0,8mm e foi obtida maior produtividade de TGase ($0,034 \pm 0,002 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$) quando utilizado no meio de cultivo. Estes fatores aliados podem contribuir para os bons resultados observados na fermentação com este substrato. O farelo de soja também apresenta tamanho de partículas grandes, porém não fibrosas. O estudo da influência da granulometria na produção de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 pode ser um trabalho futuro que aprimore o entendimento dos fatores que promovem o crescimento do micro-organismo para produção desta enzima.

I.4.1.2. Utilização de melaço de cana-de-açúcar e glicerol como fonte de carbono no meio de cultura para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase

A **Figura I-7** ilustra a cinética de produção de TGase pela linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837, nos meios de cultura 1, 2, 3 e padrão com a composição descrita na **Tabela I-1**, bem como os desvios padrões. As letras sobre os pontos das curvas referem-se ao resultado do teste de Tukey (95% de confiança) utilizado para comparar os respectivos valores de cada cinética entre si.

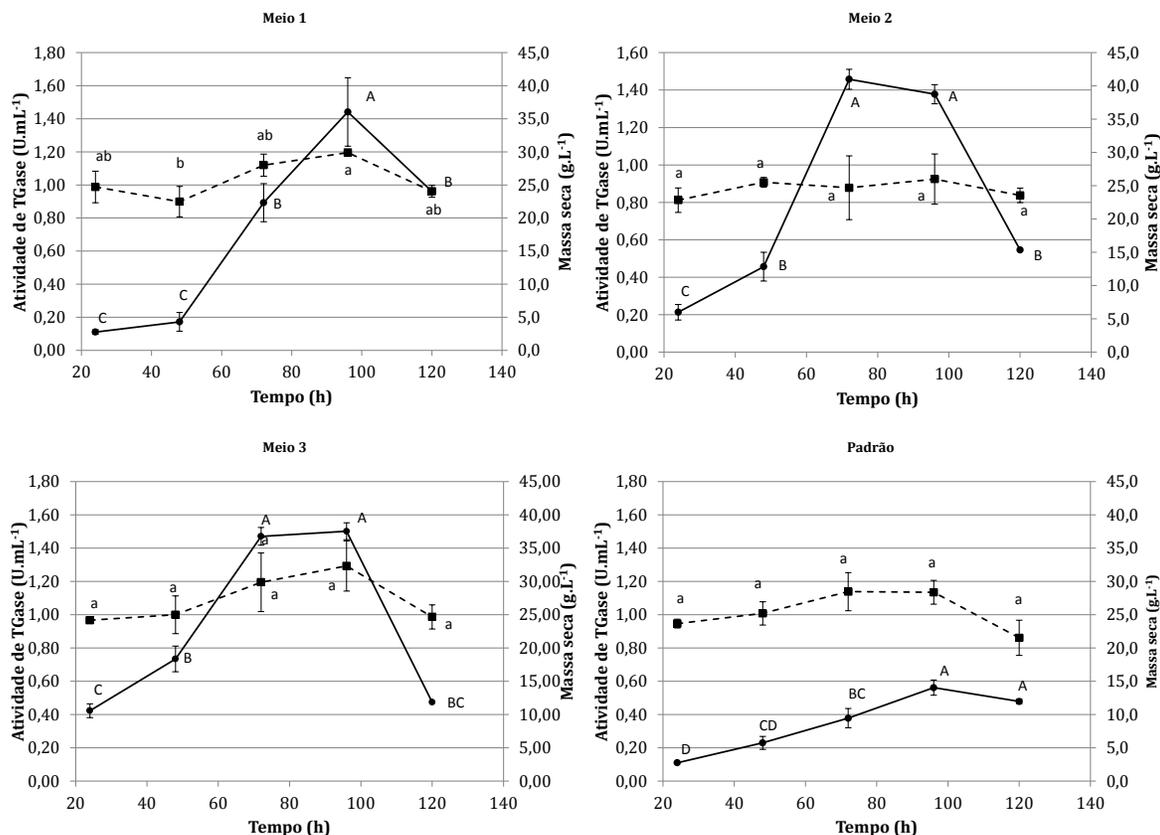


Figura I-7 – Cinética da atividade de TGase e crescimento celular da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 nos meios de cultivo 1, 2, 3 e padrão. Crescimento microbiano (linha pontilhada); Atividade de TGase (linha sólida).

As atividades médias máximas de TGase obtidas com os meios de cultivo com a fonte principal de carbono modificada foram significativamente superiores a atividade de TGase determinada no meio padrão (contendo glicose e amido de batata como fontes principais de carboidratos), como pode ser observado na **Figura I-8 (A)**. Não houve diferença significativa entre o Meio 1 (12% de melaço), Meio 3 (2% glicerol) e o Meio 2 (0,5% glicose e 2% de glicerol) quanto a máxima atividade média de TGase. A **Figura I-8 (B)** apresenta os resultados da comparação estatística entre as máximas produtividades médias da produção da TGase em cada meio avaliado. Não houve diferença significativa, a 95% de confiança, entre as produtividades

obtidas nos Meios 2 e 3, no entanto o Meio 1 apresentou produtividade inferior devido ao fato da maior atividade ter sido atingida, em média, 24 horas após o pico de atividade observado nos meios formulados com glicerol.

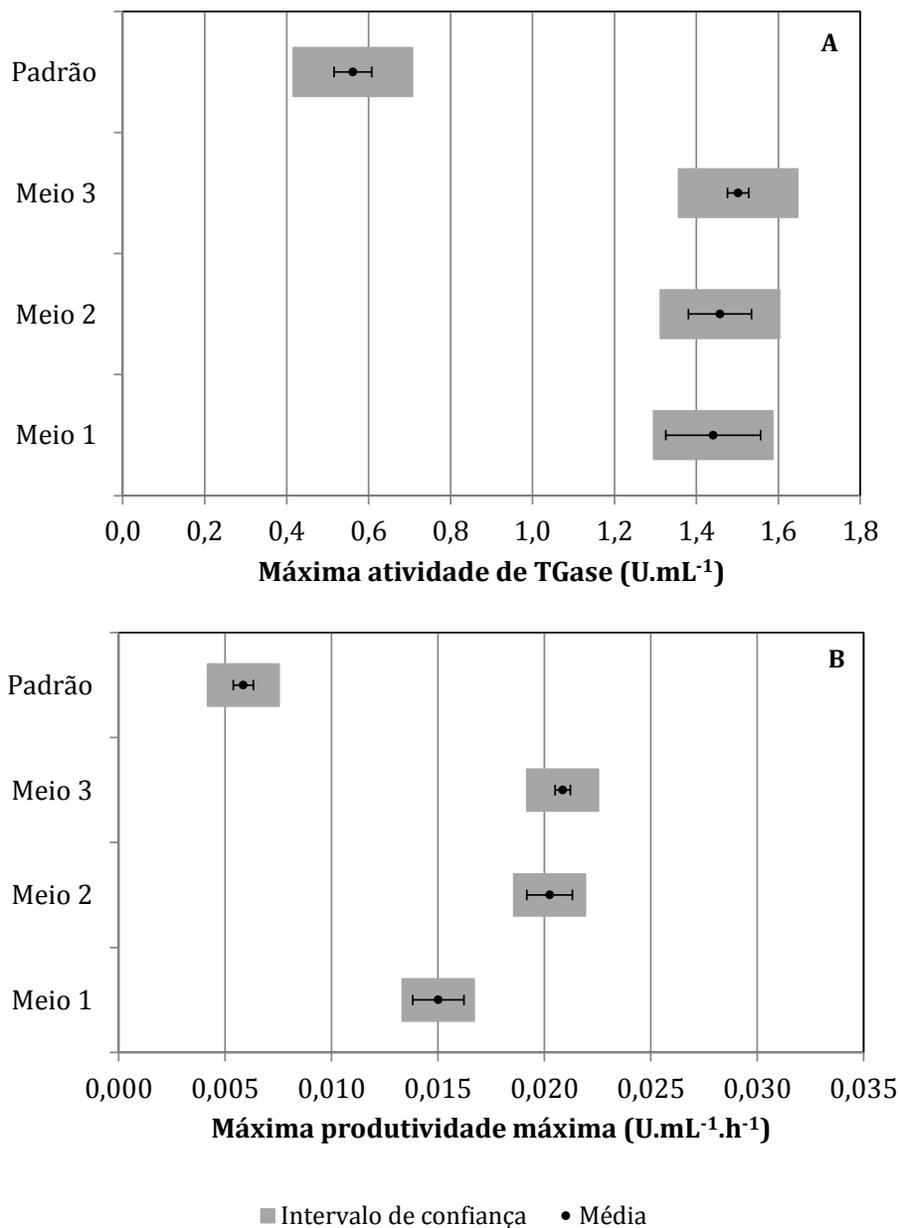


Figura I-8 - (A) Atividades médias máximas de TGase e (B) Produtividades médias máximas de TGase obtidas na fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 nos meios de cultura 1, 2, 3 e padrão, no estudo de substituição da fonte de carbono do meio padrão.

Os resultados apresentados indicam que a adição de 2% de glicerol pode substituir a glicose (0,1%) e o amido de batata (2%) presentes no meio de cultivo padrão, elevando a atividade máxima obtida durante a fermentação submersa da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em 0,94 U.mL⁻¹ (167%) e aumentando a produtividade do processo em 257%. Esse resultado é positivo para a redução dos custos relativos ao meio de cultivo para fermentação uma vez que o glicerol apresenta custo inferior à glicose e ao amido.

O melaço de cana-de-açúcar também é uma alternativa em relação às fontes de carbono glicose e amido do meio de cultivo padrão, uma vez que é um subproduto abundante, e com produção crescente, gerado pelas indústrias sucroalcooleiras (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007). A **Figura I-9** ilustra os preços estimados para as fontes de carbono estudadas.

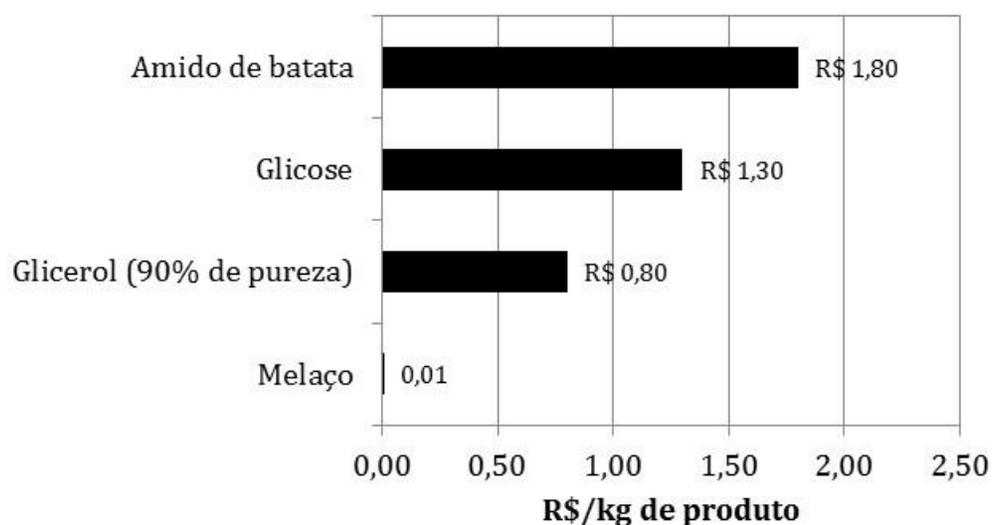


Figura I-9 – Preço por kg do melaço de cana de açúcar líquido, glicerol 90% de pureza, glicose anidra, amido de batata. Fonte: EGC Reliant

Macedo et al. (2007), utilizando a linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837, avaliaram o melaço de cana de açúcar como fonte de carbono, comparando a produção de TGase em meio contendo amido de batata e glicose após 120 horas de fermentação a 30°C e 100 rpm, no qual observaram que o meio composto

por 2% de amido de batata e 0,2% de glicose apresentaram atividade de TGase superiores em relação ao meio composto por 2% (20 g.L⁻¹) de melaço de cana de açúcar.

O uso de melaço de cana de açúcar na produção de TGase microbiana é pouco descrito na literatura, no entanto, Rivera et al. (2009) avaliaram o uso de melaço e glicerol na produção de TGase de *Streptoverticillium ladakanum* NRRL 3191. Os autores verificaram que o uso de melaço e de glicerol na concentração de 60 g de açúcares totais/L de meio proporcionou a obtenção de atividade de TGase de 0,24 U.mL⁻¹ e 0,25 U.mL⁻¹ respectivamente. A mistura das duas fontes de carbono proporcionou a produção de 0,46 U.mL⁻¹ de atividade de TGase.

I.4.1.3. Delineamento fatorial 2² para estudo dos efeitos da concentração de farelo de soja e de glicerol no meio de cultura para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados

Foi realizado um delineamento fatorial 2², com triplicata no ponto central a fim de estudar os efeitos da concentração de farelo de soja e de glicerol no meio de cultivo para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 para produção de TGase. A **Figura I-10** apresenta a cinética de produção da enzima para cada ensaio do delineamento fatorial.

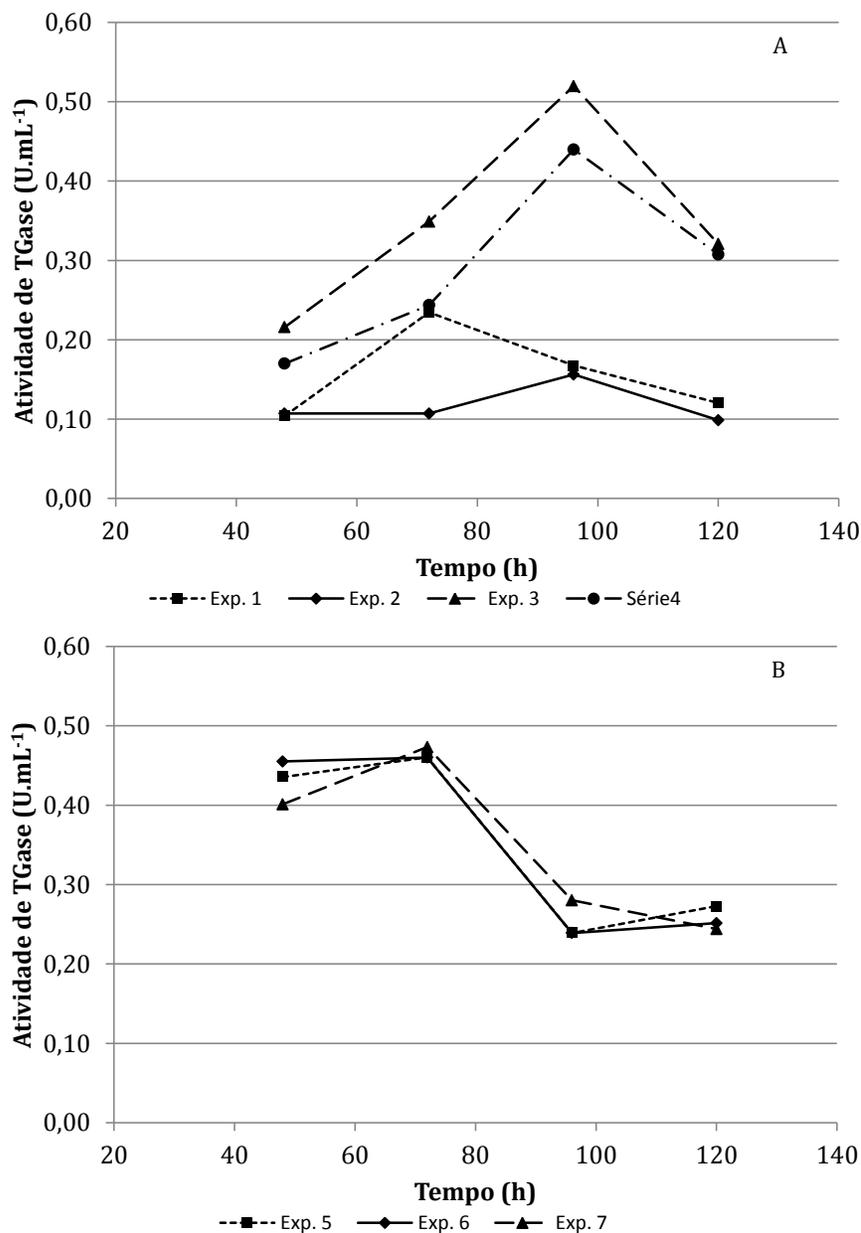


Figura I-10 – Cinética de produção da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 por fermentação utilizando meio de cultivo contendo farelo de soja e glicerol. (A) ensaios do delineamento fatorial 2², (B) ensaios dos pontos centrais.

O modelo linear foi avaliado após 72 e 96 horas de fermentação uma vez que muitos dos ensaios atingiram o pico de atividade de TGase nesses tempos de fermentação.

A **Tabela I-6** apresenta os efeitos de cada variável e sua interação após 72 horas de fermentação.

Tabela I-6 – Efeitos das variáveis percentagem de farelo de soja e glicerol no meio de cultivo para produção de TGase após 72 horas de fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 – modelo linear.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média*	0,333	0,003	116,69	<0,01
Farelo de soja(L)*	-0,116	0,008	-15,43	<0,01
Glicerol(L)*	0,126	0,008	16,65	<0,01
Farelo de soja x Glicerol	0,011	0,008	1,47	0,28

$R^2 = 0,24$

* Efeitos significativos

Os termos lineares foram significativos ($p\text{-valor} < 0,1$) enquanto que a interação não foi significativa. O coeficiente de regressão foi baixo, sendo o modelo linear capaz de representar apenas 24% da variabilidade experimental. A ANOVA do modelo linear, apresentada na **Tabela I-7**, confirma que este modelo não é significativo com 90% de confiança, sendo a falta de ajuste significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) e a regressão não significativa ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$).

Tabela I-7 – Análise de variância (ANOVA) do modelo linear proposto para a produção de TGase em meio de cultivo contendo farelo de soja e glicerol após 72 horas de fermentação.

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados médios	F_{calculado}	F_{tabelado}
Regressão	0,029	3	0,010	0,32	5,39
Resíduo	0,092	3	0,031		
Falta de ajuste*	0,092	1	0,092	1609,45	8,53
Erro puro	0,001	2	<0,001		
Total	0,121	6	0,020		

R² = 0,21

* Termos significativos

A análise da curvatura do modelo linear foi significativa a 90% de confiança. Desta forma o modelo quadrático foi avaliado, sendo adicionados 4 experimentos adicionais (pontos axiais), cuja cinética se encontra na **Figura I-11**.

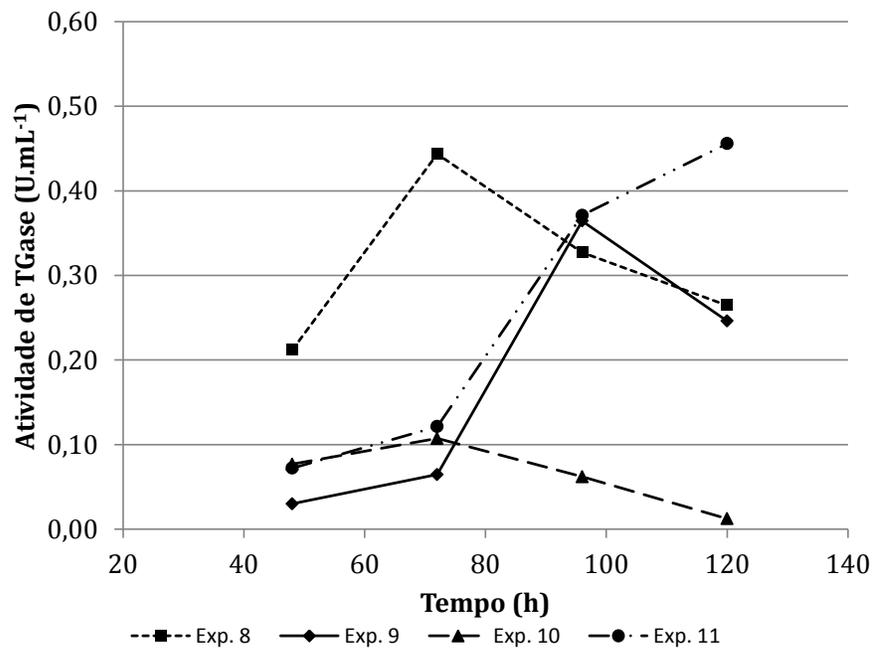


Figura I-11 - Cinética de produção da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando meio de cultivo contendo farelo de soja e glicerol - Pontos axiais para compor o modelo quadrático após 72 horas de fermentação.

Os efeitos foram recalculados utilizando os pontos axiais (experimentos 8, 9, 10 e 11) e são apresentados na **Tabela I-8**.

Tabela I-8 – Efeitos das variáveis percentagem de farelo de soja e glicerol no meio de cultivo para produção de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 após 72 horas de fermentação – modelo quadrático.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média*	0,464	0,004	106,67	<0,01
Farelo de soja(L)*	-0,192	0,005	-36,02	<0,01
Farelo de soja(Q)*	-0,186	0,006	-29,17	<0,01
Glicerol(L)*	0,068	0,005	12,72	0,01
Glicerol(Q)*	-0,326	0,006	-51,24	<0,01
Farelo de soja x Glicerol	0,011	0,008	1,47	0,28

R² = 0,91

* Termos significativos

Com exceção da interação, todos os fatores foram significativos com 90% de confiança. O coeficiente de regressão foi elevado, sendo o modelo quadrático capaz de representar 91% da variação experimental. A

Equação I-1 ilustra o modelo quadrático codificado composto apenas por termos significativos (FS representa o farelo de soja e GL o glicerol).

$$A = \underbrace{0,464}_{(\pm 0,004)} - \underbrace{0,096}_{(\pm 0,003)} FS - \underbrace{0,093}_{(\pm 0,003)} FS^2 + \underbrace{0,093}_{(\pm 0,003)} GL - \underbrace{0,163}_{(\pm 0,003)} GL^2$$

Equação I-1

A ANOVA do modelo quadrático constando apenas de termos significativos pode ser observada na **Tabela I-9**.

Tabela I-9 – Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático proposto para a produção de TGase em meio de cultivo contendo farelo de soja e glicerol após 72 horas de fermentação.

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados médios	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão*	0,245	4	0,061	15,53	3,18
Resíduo	0,024	6	0,004		
Falta de ajuste*	0,024	4	0,006	103,46	9,24
Erro puro	0,001	2	<0,001		
Total	0,268	10	0,027		

R²=0,91

* Termos significativos

A regressão do modelo quadrático proposto foi significativa a 90% de confiança ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), no entanto o modelo apresentou falta de ajuste. Considerando-se que o coeficiente de correlação múltipla foi elevado (0,91), o modelo foi considerado suficiente para prever a percentagem de farelo de soja e glicerol para se obter resultados otimizados de atividade de TGase pela fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837. As curvas de contorno que relacionam a influência dos parâmetros estudados na atividade enzimática estão ilustradas na **Figura I-12**.

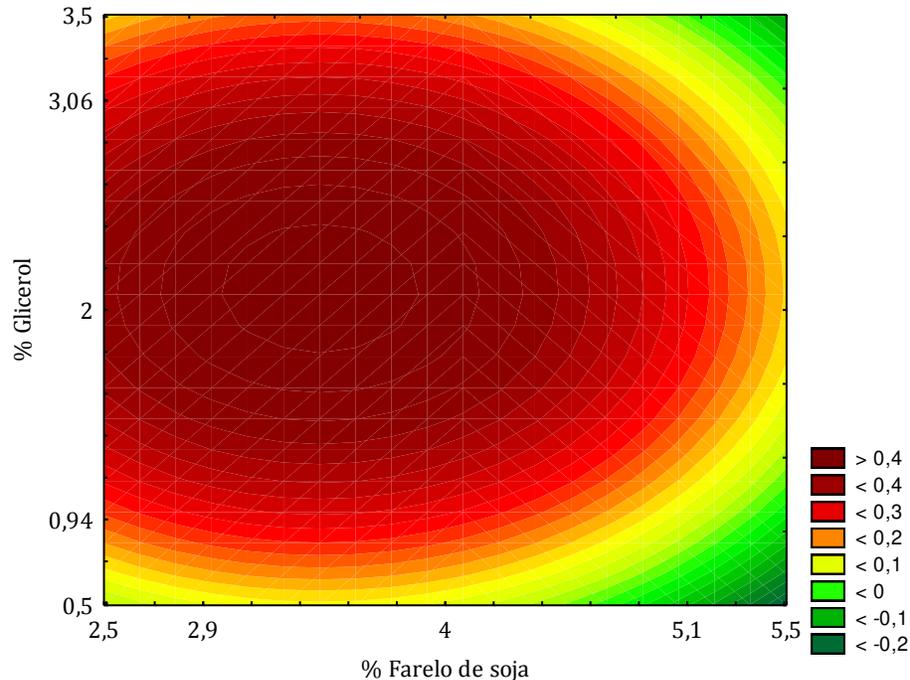


Figura I-12 – Curvas de contorno para o estudo do efeito da percentagem de glicerol e de farelo de soja no meio de cultura para a produção de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 após 72 horas de fermentação.

Desta forma, o meio de cultura estudado (1% de peptona, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4) deve ser adicionado de 3% de farelo de soja e 2 % de glicerol, a fim de se obter melhores resultados de atividades de TGase no tempo de fermentação de 72 horas.

Para a análise do delineamento fatorial após 96 horas de fermentação o modelo linear não foi significativo a 90% de confiança e, de forma análoga ao ocorrido para 72 horas de fermentação, a curvatura foi significativa. Desta forma, o modelo quadrático foi analisado. A **Tabela I-10** apresenta os efeitos da percentagem de farelo de soja e glicerol no meio de cultivo para obtenção da enzima após 96 horas de fermentação.

Tabela I-10 – Efeitos das variáveis percentagem de farelo de soja e de glicerol no meio de cultura na produção de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 após 96 horas de fermentação - modelo quadrático

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	0,264	0,013	20,84	<0,01
Farelo de soja(L)	-0,010	0,016	-0,63	0,59
Farelo de soja(Q)*	0,102	0,019	5,52	0,03
Glicerol(L)*	0,269	0,016	17,30	<0,01
Glicerol(Q)	-0,028	0,019	-1,50	0,27
Farelo de soja x Glicerol	-0,034	0,022	-1,56	0,26

R² = 0,93

* Termos significativos

Observou-se que apenas o termo quadrático da percentagem de farelo de soja e o linear da percentagem de glicerol foram significativos (p-valor < 0,1). A **Equação I-2** apresenta o modelo quadrático codificado composto pelos termos significativos.

$$A = \frac{0,251}{(\pm 0,009)} + \frac{0,055}{(\pm 0,009)} FS^2 + \frac{0,134}{(\pm 0,008)} GL$$

Equação I-2

A **Tabela I-11** apresenta a análise de variância para o modelo proposto.

Tabela I-11- Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático proposto para a produção de TGase em meio contendo farelo de soja e glicerol após o tempo de fermentação de 96 horas.

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados médios	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão*	0,163	2	0,081	46,62	3,11
Resíduo	0,014	8	0,002		
Falta de ajuste	0,013	6	0,002	4,50	9,33
Erro puro	0,001	2	<0,001		
Total	0,176	10	0,018		

R²=0,92

* Termos significativos

A regressão do modelo foi significativa e não houve falta de ajuste significativa a 90% de confiança. O coeficiente de correlação múltipla foi elevado, sendo capaz de representar 92% das variações experimentais. As curvas de contorno que relacionam a influência dos parâmetros estudados na atividade enzimática após 96 horas de fermentação estão ilustradas na **Figura I-13**.

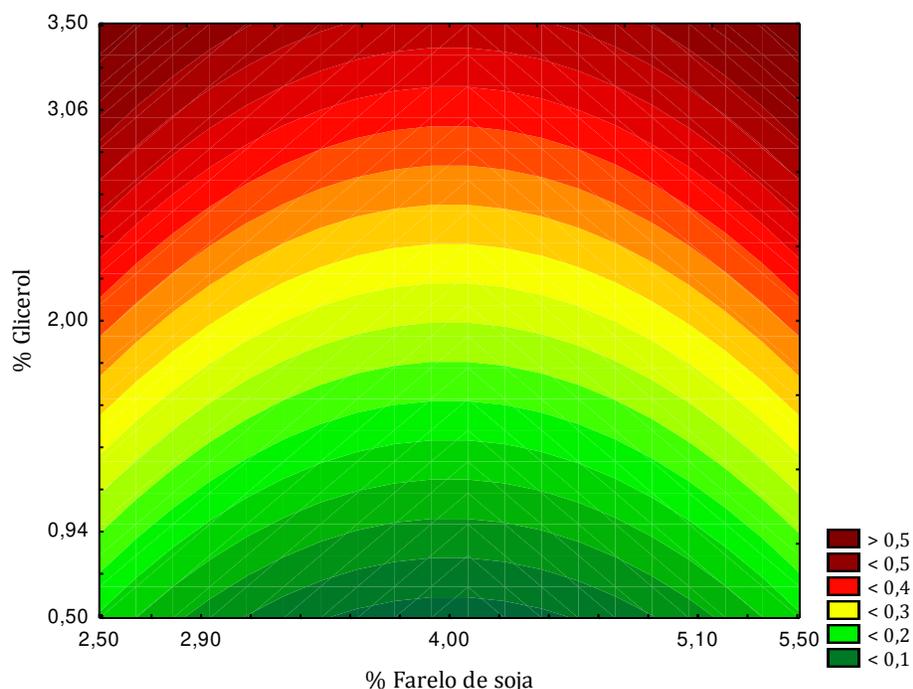


Figura I-13 – Curvas de contorno para o estudo do efeito da percentagem de glicerol e de farelo de soja no meio de cultura para a produção de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 após 96 horas de fermentação.

Após 96 horas de fermentação, elevados níveis de glicerol resultaram em maiores atividades de TGase. Quanto à percentagem de farelo de soja, existem dois pontos opostos que podem gerar bons resultados. Foi observado maior atividade de TGase no Experimento 3 (2,9% de farelo de soja; 3,1% de glicerol). Desta forma, priorizando o valor da atividade final obtida, a quantidade de glicerol a ser adicionada ao meio de cultivo deve estar em torno de 3,2% e a quantidade de farelo de soja em torno de 3% (a menor concentração permite menor custo do meio de cultivo). Estes resultados são próximos aos obtidos para o tempo de fermentação de 72 horas, no entanto a atividade enzimática obtida após 96 horas de fermentação foi superior.

A atividade máxima de TGase obtida nos ensaios do delineamento fatorial, com pontos centrais e axiais, foram inferiores àqueles obtidos com os meios de cultivo com adição de farelo de soja ou glicerol separadamente, no

entanto, os valores foram próximos aos obtidos utilizando-se o meio de cultivo padrão.

I.4.1.1. Delineamento fatorial 2^2 para estudo do efeito da porcentagem de farelo de algodão e glicerol no meio de cultura para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados

Foi realizado um delineamento fatorial 2^2 , com triplicata no ponto central a fim de estudar os efeitos da porcentagem de farelo de algodão e de glicerol no meio de cultivo fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 para produção de TGase. A **Figura I-14** apresenta a cinética de produção da enzima para cada ensaio do delineamento fatorial.

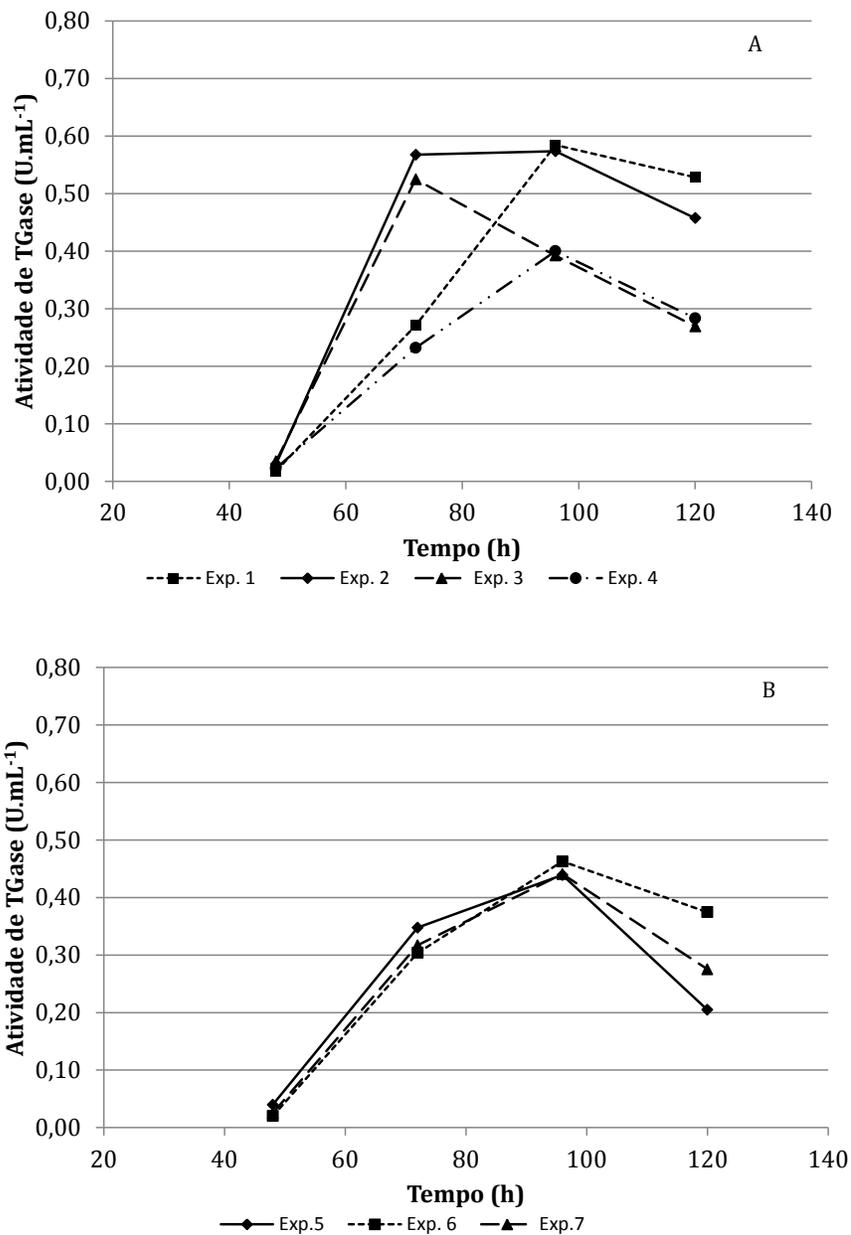


Figura I-14 - Cinética de produção da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 por fermentação utilizando meio de cultivo contendo farelo de algodão e glicerol. (A) ensaios do delineamento fatorial 2², (B) ensaios dos pontos centrais.

O modelo linear foi avaliado após 72 e 96 horas de fermentação uma vez que muitos dos ensaios atingiram o pico de atividade de TGase nesses tempos de fermentação.

A **Tabela I-12** apresenta os efeitos de cada variável e sua interação após 72 horas de fermentação.

Tabela I-12 – Efeitos das variáveis percentagem de farelo de algodão e glicerol no meio de cultivo para produção de TGase após 72 horas de fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837- modelo linear.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média	0,366	0,009	43,19	<0,01
Farelo de algodão(L)	0,002	0,022	0,08	0,94
Glicerol(L)	-0,041	0,022	-1,814	0,21
Farelo de algodão x Glicerol*	-0,295	0,022	-13,14	0,005

R² = 0,93

* Termos significativos

No modelo linear, como a interação entre os termos quantidade de glicerol e quantidade de farelo de algodão foi fortemente significativa, todos os termos foram considerados no modelo (Box et al., 1978). A **Tabela I-13** apresenta a análise de variância para modelo linear proposto e a equação do modelo.

Tabela I-13 – Análise de variância (ANOVA) do modelo linear proposto para a produção de TGase em meio contendo farelo de algodão e glicerol após o tempo de fermentação de 72 horas.

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados médios	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão*	0,089	3	0,029	8,11	5,39
Resíduo	0,011	3	0,004		
Falta de ajuste*	0,010	1	0,010	19,70	8,53
Erro puro	0,001	2	<0,001		
Total	0,099	6	0,017		

R²=0,89

* Termos significativos

Observou-se pela análise de variância que o modelo linear após 72 horas de fermentação apresentou regressão significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) porém com falta de ajuste do modelo significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$). O coeficiente de regressão foi de 0,89, indicando que o modelo representa 89% da variação experimental. Desta forma, para este tempo de fermentação a quantidade de farelo de algodão e glicerol adicionadas ao meio de cultivo para otimizar a produção da enzima deveria ser alterada, reduzindo-se a quantidade de farelo de algodão e elevando-se a quantidade de glicerol. No entanto, o modelo foi avaliado para o tempo de fermentação de 96 horas.

A **Tabela I-14** contém a análise dos efeitos calculados para cada variável após 96 horas de fermentação.

Tabela I-14 – Efeitos das variáveis percentagem de farelo de algodão e de glicerol no meio de cultura para a produção de TGase após 96 horas de fermentação submersa de *Streptomyces* sp. CBMAI-837-- modelo linear

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média	0,470	0,005	93,93	<0,01
Farelo de algodão(L)*	-0,002	0,013	-0,12	0,91
Glicerol(L)	-0,183	0,013	-13,80	0,01
Farelo de algodão x Glicerol	0,009	0,013	0,71	0,55

R² = 0,92

* Termos significativos

No modelo linear, apenas o termo percentagem de glicerol foi significativa e seu efeito sobre a atividade de TGase foi negativo. A análise da curvatura do modelo linear indicou que esta foi significativa a 90% de confiança, assim, os pontos axiais foram incluídos na análise de um modelo quadrático. Desta forma, 4 pontos axiais foram experimentados e suas cinéticas estão ilustradas na **Figura I-15**.

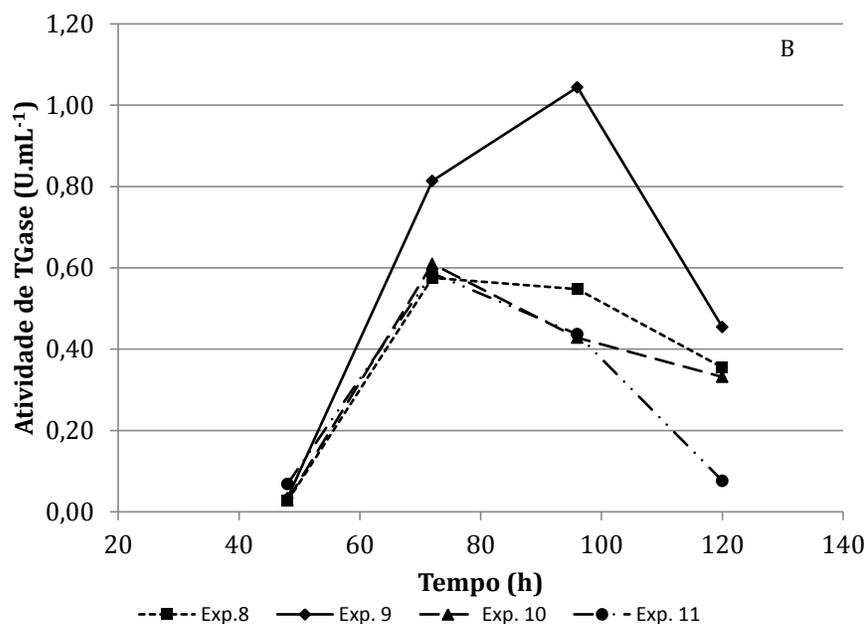


Figura I-15 – Cinética de produção da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando meio de cultivo contendo farelo de algodão e glicerol – Pontos axiais para compor o modelo quadrático após 96 horas de fermentação.

Os efeitos foram recalculados utilizando os pontos axiais (experimentos 8, 9, 10 e 11) e são apresentados na **Tabela I-15**.

Tabela I-15 Efeitos das variáveis percentagem de farelo de algodão e de glicerol no meio de cultura para a produção de TGase após 96 horas de fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837– modelo quadrático

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média*	0,4479	0,0076	58,56	<0,01
Farelo de algodão(L)*	0,1748	0,0094	18,63	<0,01
Farelo de soja(Q)*	0,2858	0,0112	25,53	<0,01
Glicerol(L)*	-0,0887	0,0094	-9,45	0,01
Glicerol(Q)*	-0,0798	0,0112	-7,12	0,02
Farelo de algodão x Glicerol	0,0094	0,0132	0,71	0,55

$R^2 = 0,67$

* Termos significativos

Apenas a interação entre as variáveis independentes não foram significativas. A ANOVA do modelo composto apenas de termos codificados significativos pode ser observada na **Tabela I-16**.

Tabela I-16 – Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático proposto para a produção de TGase em meio contendo farelo de algodão e glicerol após o tempo de fermentação de 96 horas.

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados médios	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,2316	4	0,0579	3,08	4,53
Resíduo	0,1129	6	0,0188		
Falta de ajuste	0,1126	4	0,0281	160,37	19,25
Erro puro	0,0004	2	0,0002		
Total	0,3446	10	0,0345		

R²=0,67

* Termos significativos

De forma similar ao observado para o modelo após 72 horas de fermentação, o modelo quadrático para 96 horas de fermentação apresentou falta de ajuste e a regressão não foi significativa a 90% de confiança. Desta forma, o modelo não é indicado para previsão dos valores ótimos da quantidade de farelo de algodão e glicerol para produção de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837.

Desta forma, dentro dos níveis avaliados para quantidade de farelo de algodão e glicerol adicionados no meio de cultivo, não foi possível encontrar um ponto ótimo entre eles. Ao observar os experimentos individualmente, observou-se que o experimento 9, composto de 3,50% de farelo de algodão e 2,5% de glicerol foi o que gerou a maior atividade de TGase (0,81 U.mL⁻¹) podendo ser uma orientação para novos estudos de otimização.

Ao se avaliar os resultados após 72 e 96 horas de fermentação em conjunto, podemos inferir que uma boa estratégia para otimizar o meio de cultivo composto de glicerol e farelo de algodão seria o aumento da quantidade de farelo de algodão e redução da quantidade de glicerol, visto que após 96 horas de fermentação o glicerol (tanto o termo linear quanto quadrático) passa a ter efeito negativo significativo sobre a atividade enzimática obtida e após 72 horas de fermentação a interação entre farelo de algodão e glicerol foi significativamente negativa. A avaliação do efeito da adição do farelo de algodão no meio de cultivo sem adição de fontes de carbono complementar também seria uma alternativa, uma vez que este apresenta 55% de carboidratos em sua composição.

I.4.2. Avaliação do uso de quitina no meio de cultura para fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados para produção de TGase

A adição de quitina no meio de cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foi avaliada para verificar a ocorrência de indução da produção de TGase.

Linhagens de *Streptomyces* são encontradas no solo e a quitina presente em fungos e resíduos de insetos, nesse ambiente, pode favorecer o crescimento desses micro-organismos, a diferenciação morfológica e induzir a síntese de metabólitos diversos (Chater et al., 2010).

A **Figura I-16** ilustra o crescimento da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em meio ISP2 contendo 1% (m:v) de quitina nativa (A) e sem quitina (A) em placas de Petri após 120 horas de incubação em estufa a 30°C.



Figura I-16 – Crescimento da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837, após 120 horas de incubação a 30°C em placas de Petri contendo meio ISP2 (A) com 1% de quitina; (B) sem quitina.

Observou-se que o meio de cultivo ISP2 contendo 1% de quitina mudou de coloração (de amarelado para marrom) mais rapidamente que o mesmo meio de cultivo sem a quitina. Essa mudança de coloração é observada nas placas contendo a linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em meio ISP2 após longo período de incubação (superior a 120 horas) a 30°C. Foi observada, também, a formação de uma superfície cotonosa intensa na cultura contendo 1% de quitina nativa, sugerindo a esporulação do micro-organismo superior à observada no meio sem a quitina.

Desta forma, foi avaliado o efeito da adição de 1% de quitina nativa, ao meio de cultivo padrão, na produção de TGase pela fermentação submersa da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837. A **Figura I-17** apresenta os resultados obtidos durante a fermentação para o meio de cultivo padrão adicionado de 1% de quitina.

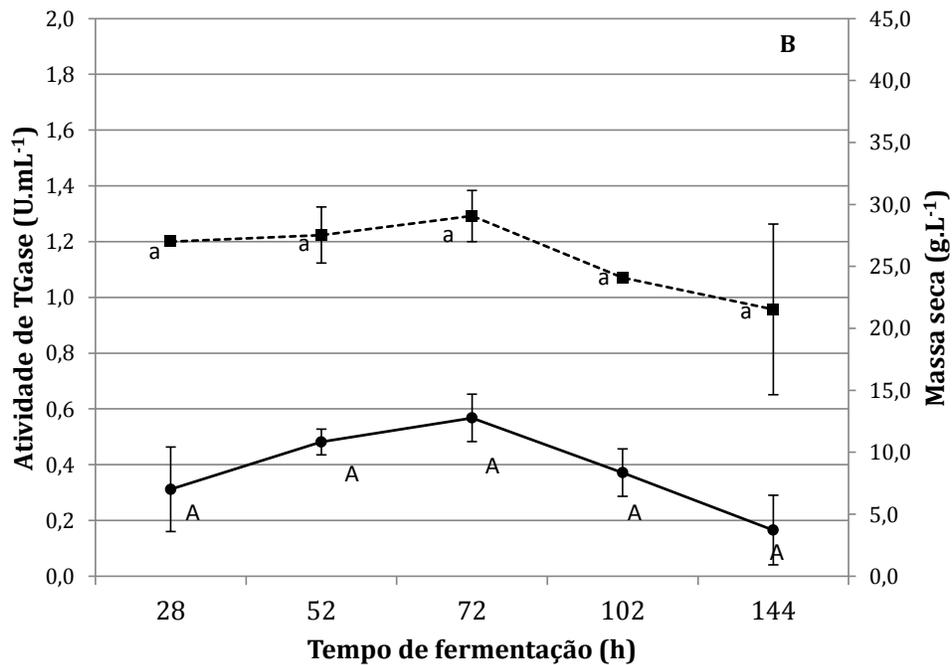
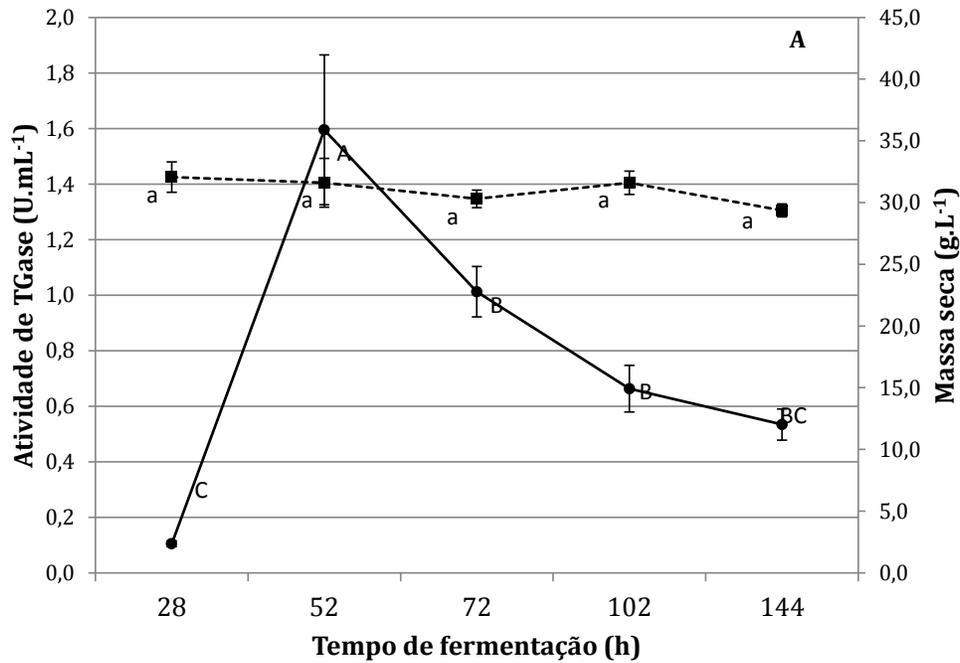


Figura I-17 - Cinética de crescimento microbiano e de produção da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 por fermentação submersa em meio de cultivo padrão (A) adicionado de 1% de quitina nativa (B) sem adição de quitina. Crescimento microbiano (linha pontilhada); Atividade de TGase (linha sólida).

A cinética de crescimento microbiano após 28 horas de fermentação indicou que o micro-organismo já havia atingido a fase estacionária, não sendo observada diferença significativa a 95% de confiança entre os pontos avaliados na cinética para os dois meios de cultivo.

Utilizando-se o meio de cultura padrão adicionado de 1% de quitina, a produção de TGase apresentou um pico após 52 horas de fermentação ($1,60 \text{ U.mL}^{-1}$) e foi decaindo gradativamente após este tempo. Nos ensaios realizados com o meio padrão (controle) foi obtida atividade máxima de TGase após 72 horas de fermentação ($0,57 \text{ U.mL}^{-1}$).

A máxima atividade de TGase obtida para o meio padrão adicionado de 1% de quitina foi 181% superior ao meio padrão sendo que o pico ocorreu 20 horas antes, fazendo com que a produtividade de TGase na fermentação da linhagem *Streptomyces* sp CBMAI-837 neste meio de cultivo fosse superior à do meio padrão em 283%.

Desta forma, a adição de quitina foi capaz de elevar a produção de TGase na fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837. Este fato pode ser explicado pelo fato da quitina estimular o metabolismo do micro-organismo uma vez que aproxima o meio de fermentação do habitat de origem do micro-organismo (solo) e do fato do micro-organismo poder ser produtor de quitinase e, neste caso, passaria a utilizar a quitina como fonte de carbono e nitrogênio adicional.

A quitina é um material de elevado custo para ser adicionado em sua forma pura no meio de cultivo, no entanto, pode ser adicionada como resíduos de casca de caranguejos e camarões oriundos da indústria de processamento desses animais. Segundo Mathur e Narang (1990) os subprodutos contendo o exoesqueleto de crustáceos apresenta em sua composição quitina (15 a 20%), proteínas (de 25 a 40%) e carbonato de cálcio (40 a 55%).

I.5. Conclusões

A produção de TGase pela linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 pôde ser estimulada por alterações no meio de cultivo da fermentação submersa que possibilitaram não apenas o aumento da atividade obtida por volume de meio de cultura mas também o aumento da produtividade de transglutaminase.

A substituição de 2,5% de farinha de soja por 2,5% de farelo de algodão no meio de cultivo padrão composto por 2,5% de farinha de soja, 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 , utilizado para fermentação submersa da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e produção de transglutaminase, possibilitou aumento da atividade de transglutaminase em $1,2 \text{ U.mL}^{-1}$ e a produtividade em 340%. A substituição de 0,1% de glicose e 2% de amido de batata, no mesmo meio de cultivo padrão, por 2% de glicerol permitiu o aumento da atividade de TGase em $0,94 \text{ U.mL}^{-1}$ e da produtividade em 256%.

A adição de 1% de quitina nativa ao meio de cultivo padrão, composto de 2,5% de farinha de soja, 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 , para fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em frascos agitados a 30°C , 150 rpm durante 52 horas resultou na produção de $1,6 \text{ U.mL}^{-1}$ de transglutaminase produtividade de $0,031 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$. No entanto esses resultados foram similares aos obtidos com o uso do farelo de algodão.

I.6. Sugestões para continuidade dos estudos

Avaliação da utilização dos resíduos agroindustriais na fermentação semi-sólida de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 para produção de TGase e de quitina proveniente de resíduos da indústria de crustáceos.

Avaliação da morfologia e crescimento celular da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI-837 cultivadas em meio de cultivo contendo resíduos agroindustriais ou quitina em comparação com o meio de cultivo padrão.

I.7. Referências bibliográficas

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2010. In: Horwitz, W. (Ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Agriculture Chemistry. AOAC, Washington, DC. Charney, J., Tomarelli, R.M., 1947.

Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H., Motoki, M., (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2613-2617.

Bagagli, M. P., (2009). Produção de transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20, caracterização e aplicação da enzima bruta. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 113 p.

Bagagli, M.P., Sato, H.H., (2013). Two-staged temperature and agitation strategy for the production of transglutaminase from a *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian soils. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(5), 1057-1065.

Cariello, L., Ristoratore, F., Zanetti, L., (1997). A new transglutaminase-like from the ascidian *Ciona intestinalis*. *FEBS Letters*, 408, 171-176.

Chater, K. F., Biro, S., Lee, K.J., Palmer, T., Shrempf, H., (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 171 – 198.

Chen, K., Zhang, D., Liu, S., Wang, N.S., Wang, M., Du, G., Chen, J., (2012). Improvement of transglutaminase production by extending differentiation phase of *Streptomyces hygroscopicus*: mechanism and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-012-4614-y.

Cui, L.; Du, G.; Zhang, D., (2007) Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. **Food Chemistry**, 105, 612-618.

Dash, B.C.; Mahor, Carroll, O.; Mathew, A.; Wang, W.; Woodhouse, K. A.; Pandit, A., (2011). Tunable elastin-like polypeptide hollow sphere as a high payload and controlled delivery gene depot. **Journal of Controlled Release**, 152, 382-392.

Fleuri, L.F.; Sato, H.H, (2005). Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, 28(5), 871-879.

Folk, J. E., (1980). Transglutaminases. **Annual Reviews Biochemistry**, 49, 517-531.

Folk, J. E., Cole, P. W., (1966). Mechanism of action of pig liver transglutaminase. **The Journal of Biological Chemistry**, 241, 5518-5525.

Junker, B. H.; Hesse, M.; Burgess, B.; Masurekar, P., (2004). Early phase process scale-up challenges for fungal and filamentous bacterial cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 119, 241-277.

Kim, H.; Jung, S.; Lee, I.; Yu, T., (2000). Production and characterization of a novel microbial transglutaminase from *Actinomadura* sp. T-2. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 10(2), 187-194.

Macedo, J. A., Sette, L. D., Sato, H. H, (2007). Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, 10(4), 618-626.

Mathur, N.K., Narang, K.C., (1990). Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, 67(11), 938.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, (2007). Balanço nacional da cana-de-açúcar e agroenergia. Biblioteca Nacional de Agricultura – BIMAGRI, Brasil

Nagy, V. e Szakacs, G., (2008). Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid-state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, 47(2), 122-127.

O'Cleirigh, C.; Casey, J. T.; Walsh, P. K.; O'Shea, D. G.,(2005). Morphological engineering of *Streptomyces hygroscopicus* var. geldanus: Regulation of pellet morphology through manipulation of broth viscosity. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 68, 305-310.

Portilla-Rivera, O.M.; Téllez-Luis, S.J.; León, J.A.R.; Vázquez, M., (2009). Production of microbial transglutaminase on media made from sugar cane molasses and glycerol. ***Food Technology and Biotechnology***, 47(1), 19–26.

Schrempf, H., (2001). Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. ***Antonie van Leeuwenhoek***, 79, 285 – 289.

Soares, L. H. B., Assmann, F., Ayub, M. A. Z., (2003). Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. ***Biotechnology and Applied Biochemistry***, 37, 295-299.

Soo-Hwan, Y.; Jung-Hoon, Y., Lee, D.L.; Kim, H.S., (2009). Screening and Identification of a *Streptomyces platensis* YK-2, a new transglutaminase producer. ***Journal of Microbiology and Biotechnology***, 19(6), 588–595.

Souza, C. F. V. de; Heck, J. X.; Ayub, M. A. Z., (2008). Solid state bioreactor production of transglutaminase by Amazonian *Bacillus circulans* BL32 strain. ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology***, 35 , 1677 - 1685.

Stambury, P. F., Whitaker, A., Hall, S. J.,(1995). ***Principles of Fermentation Technology***. Oxford, Butterworth Heinemann, 2a edição.

Tanaka, Y.; Doi, S.; Kamiya, N.; Kawata, N.; Kamiya, S.; Nakama, K.; Goto, M., (2008). A chemically modified glass surface that facilitates transglutaminase-mediated protein immobilization. ***Biotechnology Letters***, 30, 1025–1029.

Whitaker, A., (1992). Actinomycetes in submerged culture. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, 32, 23-35.

Yokoyama, K., Nio, N., Kikuchi, Y., (2004). Properties and application of microbial transglutaminase. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 64, 447-454.

Yu, J.Y., Wu, S.C., Chan, H.H., Chen, Y.C., Chen, Z.Y., Yang, M.T., (2008). Overproduction of soluble recombinant transglutaminase from *Streptomyces netropsis* in *Escherichia coli*. ***Applied Microbial Biotechnology***, 81, 523 – 532.

Zhang, L. Zhang, L. Han, X., Du, M., Zhang, Y., Feng, Z., Ti, H., Zhang, Y. (2012). Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive MgCl₂. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 93, 2335 – 2343.

Zhu, Y., Rizema, A., Tramper, J., Bol, J., (1995). Microbial transglutaminase-a review of its production and application in food processing. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 44, 277 – 282.

Zhu, Y.; Tramper, J., (2008). Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. ***Trends in Biotechnology***, 26(10), 559 – 565.

Zotzel, J.; Keller, P.; Fuchsbauer, H.L., (2003). Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. ***European Journal of Biochemistry***, 270, 3214 – 3222.

<http://www.alcancepecuaria.com.br/> acesso dia 20/03/2013

<http://www.cerealistasaojose.com.br/> acesso dia 20/03/2013

<http://www.egcreliant.com/food-ingredients.html> acesso dia
03/04/2013

II. Capítulo II – APLICAÇÃO DA TRANSGLUTAMINASE DE *Streptomyces sp.* CBMAI-837

Resumo

O trigo é o principal cereal da nutrição humana. A massa de farinha de trigo apresenta características viscoelásticas únicas, as quais são influenciadas pelas proteínas que compõe esse cereal. A gliadina e a glutenina são as principais frações da proteína do trigo e juntas formam o glúten. O glúten apresenta elevado teor de aminoácidos glutamina em sua composição e baixa quantidade de lisina. Os efeitos da aplicação da TGase de *Streptomyces sp.* CBMAI-837 nas características da massa de farinha de trigo mole (baixo teor proteico) e na fabricação de pães foram avaliados e os resultados foram comparados com a atuação de uma TGase comercial (BioBond) formulada para aplicação em cereais. A massa foi avaliada quanto às suas propriedades reológicas (resistência à extensão, máxima extensão e pegajosidade) e quanto as características bioquímicas das proteínas da massa (perfil eletroforético, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, cromatográfica de exclusão molecular das proteínas extraídas em 2% de dodecil sulfato de sódio e hidrofobicidade de superfície). Um delineamento de experimentos fatorial, com quatro réplicas no ponto central, foi realizado para avaliar as melhores condições de aplicação da enzima durante o processo de mistura. Foi utilizada a TGase comercial para avaliação. Verificou-se que a temperatura de mistura e descanso da massa a 30°C, a quantidade de TGase de 8U/g de proteína e o uso de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ com pH 6,5 foram boas condições para obtenção de massa com maior resistência a extensão. Estas condições foram utilizadas para comparar a atuação da TGase comercial e da TGase de *Streptomyces sp.* CBMAI-837, sendo que as massas foram feitas com o

tampão citrato e com água destilada (controle). De forma geral, as duas enzimas avaliadas tiveram o mesmo efeito sobre a massa quanto às suas propriedades reológicas, sendo observado aumento da resistência à extensão e redução da máxima extensão. Ambas reduziram a pegajosidade da massa em aproximadamente 21%. A hidrofobicidade de superfície das proteínas da massa foi reduzida pela adição da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, no entanto, foi elevada pela enzima comercial. De forma geral, as análises da estrutura proteica indicam a aglomeração das proteínas, ou seja, o aumento de sua massa molecular, o que é relacionado ao aumento da resistência à extensão da massa de farinha de trigo. As enzimas foram também aplicadas na formulação de pães, os quais foram avaliados quanto ao perfil de textura. A aplicação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em massa de pão de farinha de trigo mole promoveu a redução do volume do pão em 9% e o aumento da firmeza em 32%. A substituição da água destilada por tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH6,5 para formular os pães levou a redução do volume dos pães formulados com TGase em 11%, com aumento da firmeza em 59%. O aumento da quantidade de solvente adicionado na massa de 53% para 56% permitiu o aumento do volume dos pães, no entanto com pouca diferença dos parâmetros de textura em relação ao controle para a TGase comercial BioBond e para a TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837.

Abstract

Wheat is the main cereal used in human nutrition. Wheat flour dough has unique viscoelastic properties, which are influenced by the proteins contained in this cereal. Gliadin and glutenin are the main protein fractions of wheat and together they form the gluten, which contains a large amount of glutamine and small amount of lysine. The effects of the TGase from *Streptomyces* sp. CBMAI - 837 on the characteristics of soft wheat flour dough and on the manufacture of bread were evaluated, and the results were compared with the performance of a commercial TGase (BioBond) formulated for specific applications in cereal products. The doughs were evaluated for their rheological properties (resistance to extension, maximum extension and stickiness) and for the biochemical characteristics of the dough protein (electrophoretic profile, Fourier transform infrared spectroscopy, size exclusion chromatograph of the proteins extracted in 2 % SDS and surface hydrophobicity). A factorial experimental design with four replicates at the center point was carried out to determine the best conditions for the application of TGase during the mixing process. Commercial TGase was used for this evaluation. The maximum resistance to extension was achieved by mixing and resting the dough at 30°C, adding 8U of TGase per g of protein and using 0.05 mol.L⁻¹ citrate buffer at pH 6.5. These conditions were used to compare the performances of the commercial TGase with that from *Streptomyces* sp. CBMAI -837, making the doughs with citrate buffer in these cases and distilled water for the control. In general, both enzymes had the same effect on the rheological properties of the doughs, increasing the resistance to extension and reducing the maximum extension. Both reduced stickiness of the dough by approximately 21%. The surface hydrophobicity of the protein mass was reduced by the addition of TGase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 but increased by the addition of the

commercial enzyme. In general the analysis of the protein structure indicated an agglomeration of the proteins causing an increase in molecular weight, which is related to the increased resistance to extension of the dough. The enzymes were also applied in the formulation of bread loaves, which were evaluated from their texture profile. The TGase from *Streptomyces* sp. CBMAI - 837 decreased the bread volume by 9% and increased firmness by 32%. Substitution of the distilled water by 0.05 mol.L⁻¹ citrate buffer pH 6.5 to formulate the loaves, led to an 11% reduction in volume of the loaves made with TGase, and a 59% increase in firmness. Increasing the amount of solvent added to the dough from 53% to 56% increased the volume of the loaves, but resulted in little difference in the texture profiles of the loaves made with the addition of the commercial BioBond and *Streptomyces* sp. CBMAI - 837 TGases, in relation to the control.

II.1. Introdução

Produtos derivados de farinha de grãos e cereais são fontes de calorias e proteínas representativas na dieta humana. Entre os cereais, o trigo apresenta uma característica única para produção de pães devido à sua composição proteica, com destaque para as proteínas do glúten (Marchetti et al., 2012).

A aplicação da TGase em farinhas de cereais com diferentes conteúdos de proteínas pode influenciar na qualidade da massa obtida, uma vez que haverá a modificação da estrutura das proteínas que formarão a rede de glúten. No caso de farinhas que não apresentam glúten, é observada a formação de massas com características viscoelásticas aprimoradas, que podem reter bolhas de gás de forma similar à rede de glúten (Renzetti et al., 2008; Wang et al., 2011). Desta forma, a TGase tem sido aplicada em farinhas para melhorar as propriedades

funcionais de produtos de panificação, tal como a elasticidade e capacidade de retenção de água das massas.

A extensão do tratamento enzimático da TGase é dependente da quantidade de resíduos de glutamina e lisina presente na superfície das proteínas, ou seja, acessíveis à enzima, bem como das condições de pH e temperatura do meio em que está atuando. A exposição dos substratos da transglutaminase pode ser obtida pelo aumento da força iônica da solução, por tratamento térmico ou pela adição de agentes desnaturantes. Wang et al. (2007) observaram que o tratamento térmico das proteínas do glúten, realizado previamente ao tratamento com TGase, eleva o número de lisinas e glutaminas na superfície do glúten e melhoram o comportamento de gelificação e as propriedades do gel formado por estas proteínas.

Neste capítulo foi avaliada a capacidade da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 atuar nas proteínas do glúten de farinha de trigo mole (baixo teor protéico) em comparação com uma TGase comercial formulada para aplicação em produtos de panificação, estudando as condições de pH e temperatura que favorecessem sua atuação na massa de farinha e na formulação de pães de forma.

II.2. Revisão bibliográfica

II.2.1. Glúten: uma visão geral

O trigo é uma das mais importantes culturas agrícolas no mundo e sua farinha apresenta a habilidade de formar uma massa com características viscoelásticas únicas devido à formação de uma rede proteica denominada glúten (Shewry et al., 2001). Desta forma, a qualidade do glúten é um parâmetro importante para a avaliação do desempenho da farinha.

As proteínas que compõem o glúten são classificadas de acordo com os procedimentos de extração pelo método originalmente descrito por Osborne (Delcour et al., 2012). As duas principais frações proteicas do glúten de trigo são a gliadina e a glutenina, sendo que o balanço entre elas é fundamental para as características reológicas do glúten (Wrigley et al., 2006).

A gliadina é a fração extraída com solução aquosa de etanol, sendo proteínas monoméricas que apresentam ligações dissulfídicas intramoleculares, apresentam massa molecular de 30 a 80 kDa e são subdivididas em 4 grupos (α , β , γ e ω). A glutenina é a fração de proteínas que não se solubilizam nos solventes comuns, sendo extraídas na presença de um agente redutor. Esta fração é polimérica, apresenta grande quantidade de ligações dissulfídicas entre cadeias proteicas, podendo ser subdividida em subunidades de baixa massa molecular (LMW-GS) e subunidades de elevada massa molecular (HMW-GS) (Song & Zheng, 2011; Delcour et al., 2012).

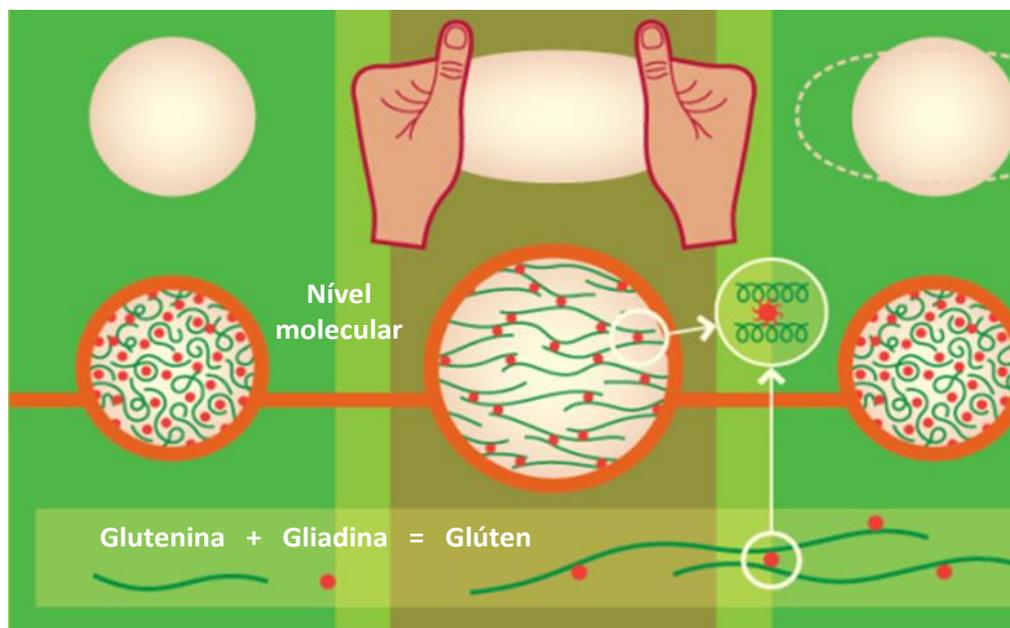
A quantidade e as características de cada fração proteica presentes nas farinhas de trigo irá variar de acordo com o cultivar e com os nutrientes presentes no solo. Em geral, gluteninas e gliadinas correspondem juntas a 80 – 90% do total de proteínas presentes na farinha e o restante são proteínas solúveis em água (albuminas) e em soluções salinas (globulinas) e são denominadas como não formadoras do glúten (Song & Zheng, 2011; Delcour et al., 2012).

As gluteninas tem sido associadas às propriedades de coesividade e elasticidade do glúten, uma vez que suas moléculas extensas e emaranhadas conferem continuidade à rede proteica. Por outro lado, as gliadinas reduzem as interações entre as gluteninas, atuando como um plastificante. A rede proteica formada pela interação destas duas frações proteicas durante hidratação e sob trabalho mecânico, ou seja, o glúten propriamente dito, conferirá propriedades únicas à massa de farinha de trigo, propiciando sua aplicação em diversos

produtos de panificação (Wrigley et al., 2006; Song & Zheng, 2011; Delcour et al., 2012). A **Figura II-1** ilustra esquematicamente a estrutura de cada fração bem como ilustra as características viscoelásticas de cada estrutura e do glúten.



(A)



(B)

Figura II-1- (A) Ilustração das propriedades viscoelásticas do glúten e de suas frações gluteninas e gliadinas (adaptado de Wrigley et al., 2006); (B) Modelo esquemático para a extensão da massa de farinha de trigo (adaptado de Ioana Urma)

Durante a mistura da farinha de trigo com água para formação de uma massa, a energia mecânica aplicada promove a formação e a quebra (processo

dinâmico) de ligações covalentes (ex. ligações dissulfídicas) e ligações não covalentes (como as ligações de hidrogênio), alterando a conformação da estrutura das proteínas do glúten. As interações químicas que se formam inter e intra-proteínas são fortemente relacionadas à força e as propriedades viscoelásticas da massa (Singh and MacRitchie, 2001; Sivam et al., 2011; Delcour et al., 2012).

Entre as interações moleculares mais importantes para as características da massa de farinha de trigo citam-se as ligações covalentes dissulfeto intra e inter gluteninas, as quais participam de um processo dinâmico de rearranjo (denominado de permuta SH-SS) durante a mistura e extensão da massa, causando uma redução aparente na rigidez da mesma. É importante salientar que as ligações dissulfídicas internas da estrutura de gliadina não participam das reações de permuta SH-SS. A **Figura II-2** ilustra a reação de rearranjo entre ligações dissulfeto (Hamer & Hosenev, 1998; Delcour et al., 2012).

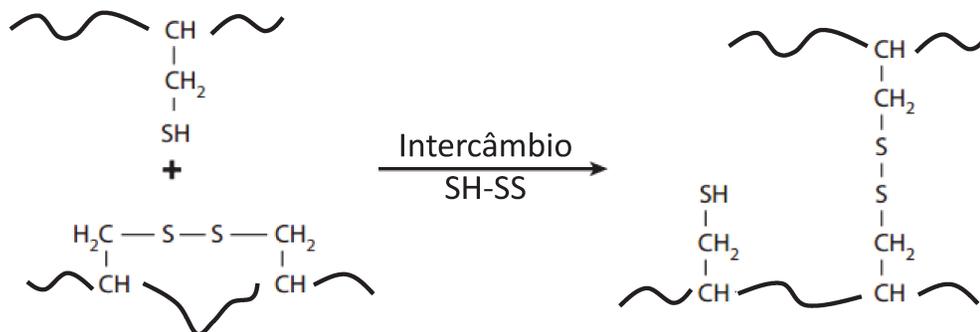


Figura II-2 - Reorientação das cadeias proteicas da massa durante o estresse mecânico da mistura devido às reações de intercâmbio das pontes dissulfeto iniciadas por um grupo sulfidril móvel (adaptado de Delcour et al., 2012).

Outra interação molecular importante para as características da rede de glúten são as ligações de hidrogênio entre proteínas e entre a água e as

proteínas que também sofrem rearranjo e que tem sido relacionadas com a elasticidade da glutenina (Delcour et al., 2012). De acordo com Hamer & Hoseney (1998), o comportamento da farinografia de massas de diferentes farinhas de trigo formuladas com óxido de hidrogênio (H_2O) e com óxido de deutério (D_2O) é distinto e pode-se observar o efeito da deficiência de ligações de hidrogênio entre soluto (farinha) e solvente (água) na estabilidade da massa. A **Figura II-3** ilustra este comportamento através das curvas do torque exercido durante o processo de mistura pelo tempo.

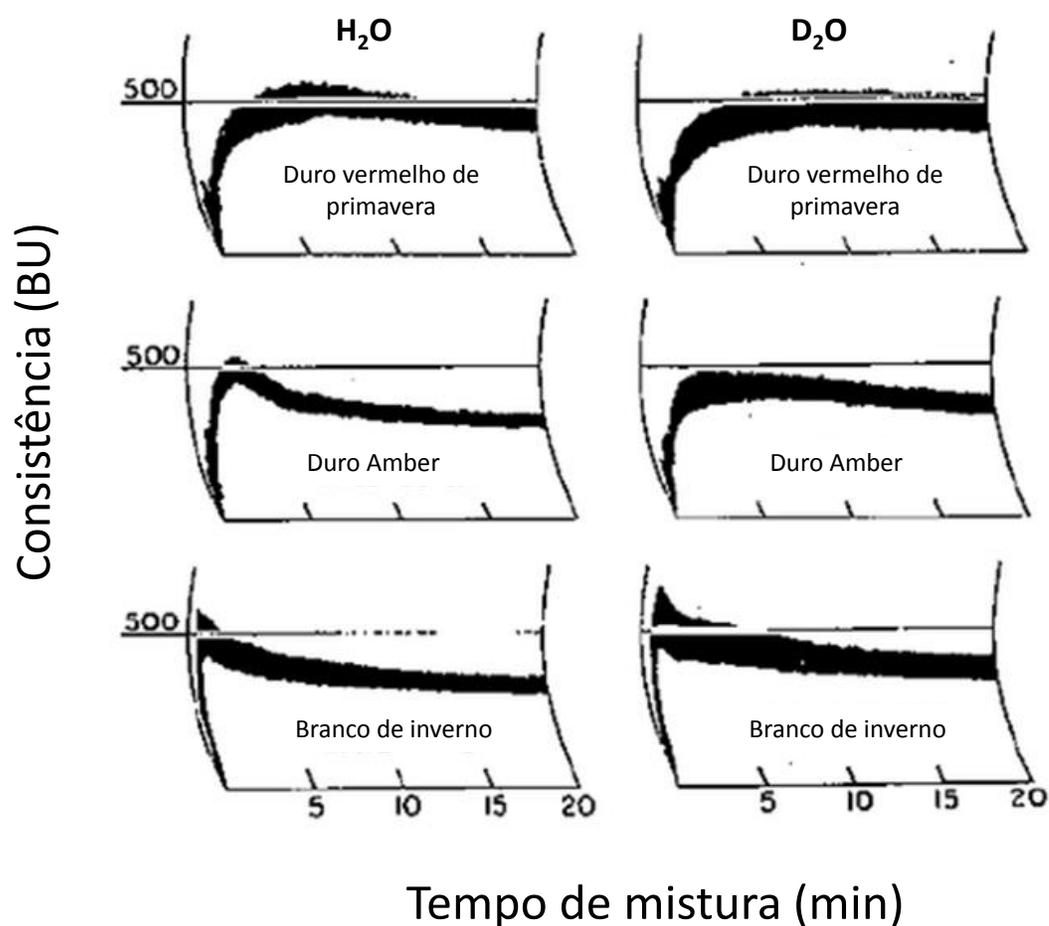


Figura II-3 – Farinograma para mistura de massas de diferentes farinhas de trigo formuladas com água e água deuterada (adaptado de Hamer & Hoseney, 1998).

Desta forma, a estrutura do glúten pode ser alterada pela presença de diversos aditivos e, como consequência, as propriedades reológicas e de produção de produtos de panificação serão afetadas ou manipuladas (Steffolani et al., 2010).

O uso de agentes redutores como a L-cisteína irá modificar as ligações dissulfídicas entre as estruturas da glutenina e estruturas de glutenina-gliadina, tornando a massa menos elástica e mais extensível (Delcour et al., 2012). A alteração do pH da massa pode alterar a carga dos resíduos de glutamina reduzindo a quantidade de ligações de hidrogênio na massa, da mesma forma que a ação da enzima TGase pode alterar o tipo de interação existente na rede de glúten, introduzindo ligações cruzadas (Tanaka et al., 1967; Bauer et al., 2003a e b). A introdução de sais na massa também modifica suas propriedades, pois o aumento da força iônica eleva as interações iônicas na proteína, além de interferir na hidratação das mesmas (Tanaka et al., 1967; Farahnaky & Hill, 2007).

II.2.2. Atuação da TGase em farinhas de trigo

Gliadinas e gluteninas são relatadas na literatura como substratos para a TGase microbiana, ainda que a quantidade de resíduos de lisina em relação à quantidade de resíduos de glutamina presente na farinha de trigo, de modo geral, seja baixo (Bauer et al., 2003a; Autio et al., 2005). A **Tabela II-1** apresenta a quantidade desses resíduos em duas farinhas de trigo duro (a quantidade de ácido glutâmico e ácido aspártico é indicada uma vez que foi quantificado o total de resíduos amida das amostras).

Tabela II-1 – Quantidade de resíduos de glutamina e lisina em farinha de trigo duro

Resíduos de aminoácidos	g mol de resíduos de aminoácidos por 100g de aminoácidos	
	Pawnee	Kaw
ε-amino (lisina)	2,1	2
amida (asparagina + glutamina)	32,1	31,4
Aminoácidos	g mol de aminoácidos por 100g de aminoácidos	
Ácido glutâmico	35	37,8
Ácido aspártico	4,4	4,2

Fonte: Pomeranz, et al. (1966)

A formação de ligações isopeptídicas mediadas pela TGase altera as características de massas de farinha de trigo, especialmente aquelas com baixo teor de proteínas, tal como as farinhas de trigo mole. A ação da TGase em proteína de farinhas que não apresentam glúten, como é o caso da farinha de arroz, melhora as características reológicas da massa e de seus produtos de panificação (Rodríguez et al., 2009; Renzetti et al., 2012).

Bauer et al. (2003a e b) estudaram os efeitos da TGase microbiana nas proteínas do glúten do trigo (farinha com 12% de proteínas), avaliando as alterações bioquímicas e reológicas em massas de farinha e água e também nas frações protéicas obtidas no fracionamento de Osborne. O estudo indicou a redução na extração de gliadinas e gluteninas da farinha e da massa tratada com a enzima, sugerindo que essas duas frações são substrato para a TGase. Do ponto de vista das propriedades reológicas, o aumento da quantidade de enzima adicionada à massa de farinha de trigo levou à redução da

extensibilidade, aumento da resistência à extensão e redução do volume de pães.

Autio *et al.* (2005) observaram que a adição de TGase tornou a massa de farinha de trigo mais rígida e menos extensível, além de retardar o crescimento das bolhas de ar durante a fermentação do pão, fato que foi relacionado à fortificação da rede de proteínas pela ação da TGase. Baixas quantidades de TGase aliada ao aumento da adição de água na formulação da massa de pães, conduziram ao aumento do volume dos pães, observação também evidenciada por Ribotta *et al.* (2010).

Rodríguez *et al.* (2009) avaliaram o efeito da TGase microbiana nas frações das proteínas de farinha de trigo duro, mole e *durum*, evidenciando que as proteínas do trigo mole foram mais susceptíveis à catálise da TGase e as proteínas do trigo durum foram menos. Não foi evidenciada a ação da TGase nas albuminas e globulinas das três farinhas estudadas.

Durante o congelamento e estocagem sob congelamento de massas de farinha de trigo pode ocorrer danos na rede do glúten causados pela ação de agentes redutores como a glutatona liberada pela levedura de panificação durante o processo de congelamento. As propriedades reológicas e de panificação de massas de farinha de trigo (13,5% de proteínas) congeladas foram melhoradas utilizando TGase microbiana no preparo de massas (Kim *et al.*, 2008).

A enzima TGase foi utilizada também para aprimorar as características de produtos de panificação formulados com farinha de trigo e farinha de soja e de aveia, aumentando o valor nutricional do alimento e as suas funcionalidades tecnológicas. Dentre as características tecnológicas aprimoradas pela adição da TGase a esses produtos destaca-se o aumento significativo do volume de pães (Bonet *et al.*, 2006; Ribotta *et al.*, 2010).

A extensão da atuação da TGase é dependente da quantidade de resíduos glutamina e lisina presentes na superfície das proteínas que estarão acessíveis à enzima. A exposição dos substratos da TGase pode ser obtido de diversas formas, tais como o aumento da força iônica, tratamentos térmicos, alteração de pH e uso de desnaturantes que não afetem a atuação da enzima.

A temperatura, o pH e a força iônica do solvente utilizado no preparo de massas de farinha de trigo influenciam a formação da rede de glúten (Tanaka et al., 1967; Bloksma & Nieman, 1975; Farahnaky & Hill, 2007) e o sítio catalítico da TGase (Kashiwagi et al., 2002; Macedo et al., 2010).

Wang et al. (2007) observaram que o tratamento térmico (100°C por 120 minutos) do glúten elevou o número de resíduos de lisina e glutamina presentes na superfície da proteína. A aplicação da TGase ao glúten tratado termicamente promoveu melhorias na gelificação destas proteínas reduzindo a concentração mínima de glúten para iniciar o processo e elevando a capacidade de retenção de água do gel.

II.2.3. Técnicas analíticas para identificação das alterações nas proteínas do trigo causadas pela TGase

Diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas para visualizar a ação da TGase nas proteínas do trigo ou em outras proteínas. Neste trabalho, estas técnicas serão divididas em técnicas para verificação das propriedades reológicas e técnicas para verificação das alterações moleculares das proteínas envolvidas.

II.2.3.1. Avaliação das propriedades reológicas

Diferentes conceitos podem ser utilizados para verificação de propriedades reológicas de materiais. Em geral, uma força é aplicada à uma amostra para deformá-la, podendo envolver pequenas ou grandes deformações.

As características físicas da massa já podem ser observadas durante seu processo de mistura, em que a força exercida pelas pás do misturador é registrada fornecendo informações sobre as características das farinhas em relação ao amassamento e absorção de água das farinhas. O misturador denominado farinógrafo permite misturar a massa com temperatura controlada e velocidade de rotação das pás constante e fornece uma curva que relaciona o torque exercido pelas pás de mistura ao longo do tempo de mistura. A **Figura II-4** ilustra o farinógrafo Brabender e uma curva genérica (farinograma) fornecida pelo equipamento durante a mistura da massa. Os métodos de avaliação de mistura são padronizados pela AACCC (American Association of Cereal Chemists). Diversos estudos envolvendo o uso de farinógrafos para avaliação de massas foram realizados, dentro os quais podemos citar Bloksma & Nieman (1975), Bauer et al. (2003a e b), Collar & Bollaín (2004), Autio et al. (2005) Farahnaky & Hill (2007), entre outros.

Os parâmetros consistência máxima, tempo de desenvolvimento, estabilidade e perda de consistência, indicados no farinograma da **Figura II-4**, são os mais comumente avaliados. Outros podem ser extraídos destes gráficos. A consistência máxima (C_m) é tipicamente convencionada em 500 unidades Brabender (BU) para uma consistência ideal. Ela faz referência à máxima consistência atingida pela massa durante o processo de mistura. O tempo de desenvolvimento (TDM) faz referência ao tempo necessário para a consistência da massa atingir o valor máximo. A estabilidade (EST), relacionada à resistência da rede de glúten à ação de forças mecânicas, indica o tempo em que a massa permanecerá em C_m ao ser misturada constantemente. Este parâmetro é de grande importância na definição dos tempos de amassamento ou batimento das

massas, uma vez que a estrutura da mesma deve estar íntegra para suportar o processo fermentativo posterior (Létang & Verdier, 1999).

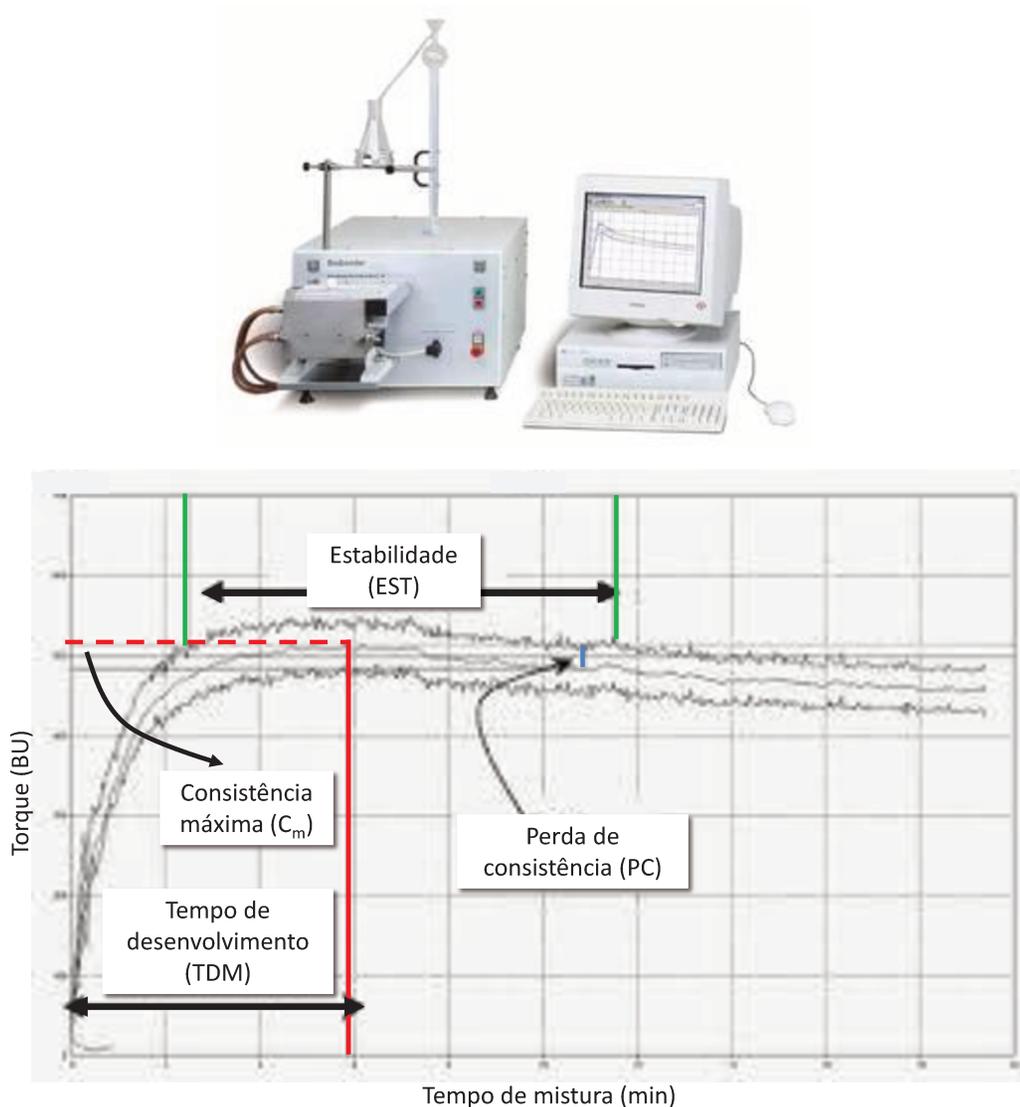


Figura II-4 - Ilustração do farinógrafo Brabender e de um farinograma genérico.

No caso da massa de farinha de trigo, é comum avaliar os parâmetros de extensibilidade da massa, avaliando a resistência à extensão e a distância máxima de extensão antes do rompimento da massa. Estes parâmetros são importantes para prever o comportamento das massas durante seu processamento e os valores desejados irão variar de acordo com o produto

final, por exemplo, para produção de pães é necessário uma massa forte (boa resistência a extensão), porém com boa extensibilidade para suportar o processo de fermentação, retendo o máximo de gás entre a estrutura da massa. Estes ensaios envolvem grandes deformações da amostra, podendo-se utilizar um extensógrafo (grande quantidade de amostra) ou um texturômetro com sondas específicas para fazer a análise de micro-extensão (teste de Kieffer), conforme ilustrado na **Figura II-5** **Erro! Fonte de referência não encontrada..** Estes ensaios, no entanto, fornecem uma visão unidimensional da extensibilidade, mas tem apresentado boa correlação com a característica dos produtos finais obtidos (Bauer et al., 2003b e Ribotta et al., 2010).



Figura II-5 - Texturômetro acoplado com a sonda SMS/Kieffer para análise de micro-extensão de massas de farinha de trigo.

A análise de pegajosidade, que também envolve grandes deformações da amostra, é indicada para caracterizar massas de farinhas de trigo, uma vez que este parâmetro interfere diretamente nos equipamentos e maquinários industriais que são utilizados para o preparo de produtos de panificação. Esta análise é feita com auxílio de um texturômetro acoplado com a célula de Chen e

Hoseney, e avalia a força necessária para a massa comprimida desprender da sonda. Quanto mais pegajosa a massa maior será a força.

Com relação aos produtos finais de panificação, tal como pães, é comum avaliar a textura através da análise de perfil de textura (TPA) utilizando um texturômetro acoplado de sondas específicas. Essa análise simula duas mordidas na amostra através de duas compressões sucessivas com um cilindro. Uma curva genérica obtida do ensaio de perfil de textura pode ser observada na **Figura II-6**.

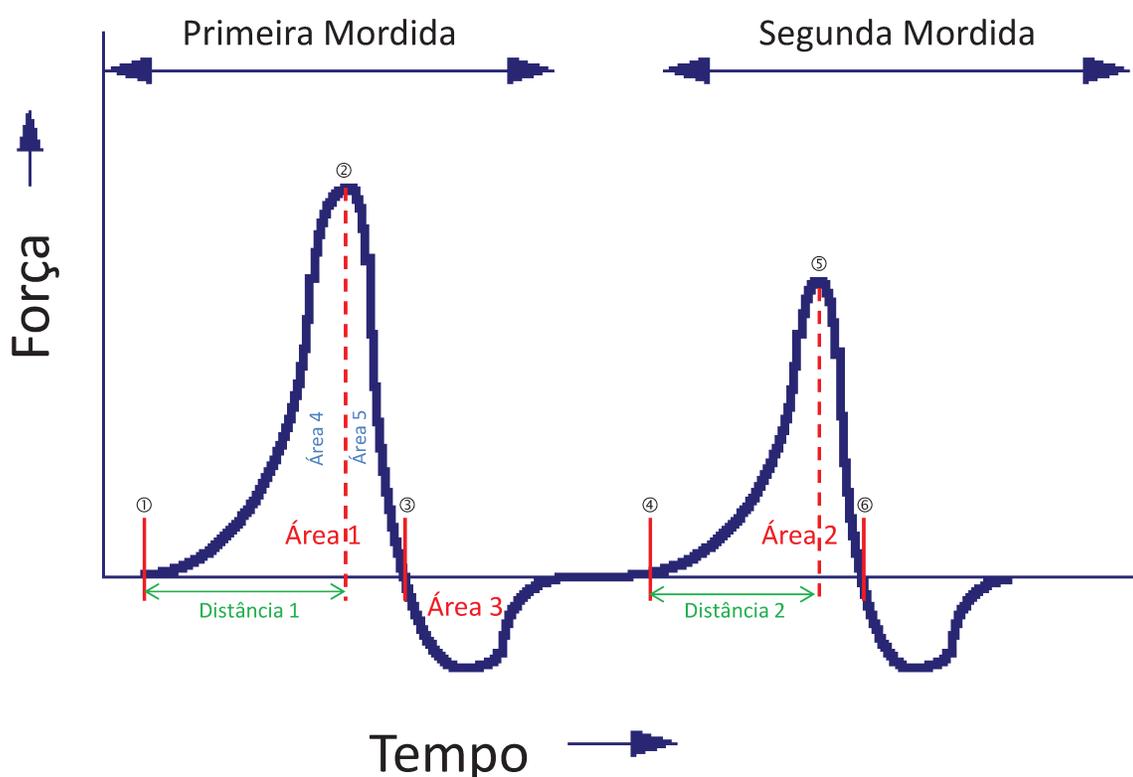


Figura II-6 - Curva genérica de um ensaio TPA (adaptada de Armero & Collar, 1997).

A **Tabela II-2** apresenta alguns parâmetros que podem ser avaliados através dos dados fornecidos pela curva da **Figura II-6**.

Tabela II-2 – Parâmetros avaliados através da curva de TPA para amostras de pão.

Parâmetro	Interpretação
Firmeza (Hardness)	Força máxima obtida na primeira penetração da sonda, ou seja, a força referente ao ponto ② da curva. Representa a força necessária para comprimir a amostra entre os molares.
Coesividade (cohesiveness)	É uma medida do quão bem a estrutura do produto suporta a deformação. É calculada pela relação entre as áreas 2 (área entre os pontos ④ e ⑥) e 1 (área entre os pontos ① e ③) da Figura II-6 .
Elasticidade (Springness)	É uma medida de como a estrutura da amostra fisicamente retorna a sua posição após a compressão. É calculada pela relação entre as distâncias 1 e 2 da Figura II-6 .
Mastigabilidade (Chewiness)	Representa a energia necessária para mastigar uma amostra ao ponto de engolir-la. É calculada pela multiplicação da firmeza, coesividade e elasticidade da amostra.
Resiliência (Resilience)	Representa como a amostra se recupera da deformação. Pode-se pensar neste parâmetro como uma elasticidade instantânea. É calculada pela relação entre área 5 (entre os pontos ② e ③) e Área 4 (entre os pontos ① e ②).

II.2.3.2. Avaliação das alterações moleculares decorrentes da ação da TGase

As técnicas mais comuns de visualização da ação da TGase em proteínas de farinhas de cereais são as que verificam o aumento da massa molecular das estruturas proteicas, uma vez que as ligações isopeptídicas catalisadas pela enzima promovem a aglomeração proteica e consequente aumento da massa molecular.

Para tanto é utilizado o perfil eletroforético das proteínas (SDS-PAGE ou eletroforese capilar) que é uma técnica muito bem estabelecida na literatura (Laemmli, 1970; Bauer et al., 2003a, Renzetti et al., 2012). Outra técnica utilizada é a cromatografia líquida por exclusão molecular, em que as proteínas são extraídas em diferentes condições. Através desta técnica é possível ainda avaliar a solubilidade (ou extractabilidade) das proteínas do glúten da massa (Mujoo & Ng, 2003).

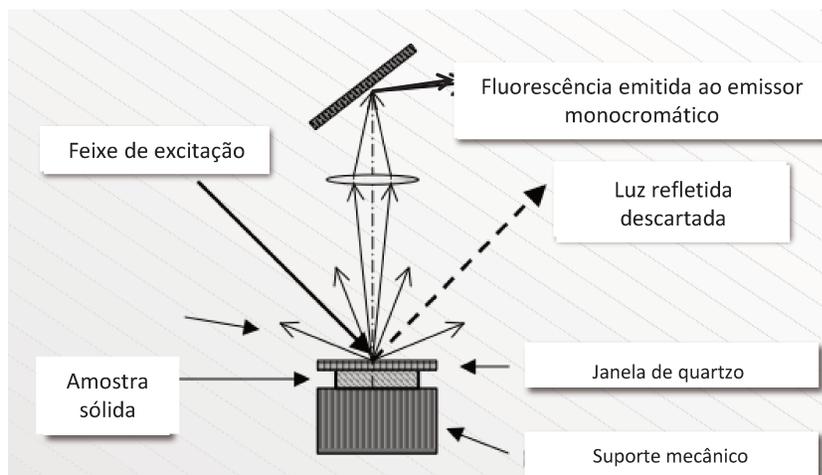
As ligações isopeptídicas podem ainda serem estimadas pela quantificação dos grupos amino livres nas proteínas através do método do OPA (o-fitaldialdeído) (Huang et al., 2010). Este método, no entanto, envolve reagentes tóxicos e sofre interferência da amônia liberada na reação da TGase, podendo levar a resultados equivocados.

A análise de grupos hidrofóbicos na superfície da proteína é uma opção analítica que indica alterações moleculares decorrentes das ligações cruzadas catalisadas pela TGase. Embora a enzima não atue diretamente nos resíduos hidrofóbicos, ao promover a formação de ligações isopeptídicas, a estrutura secundária da proteína sofrerá alterações sendo que estes grupos podem estar no interior da estrutura proteica ou expostos à superfície (Babiker et al., 1996).

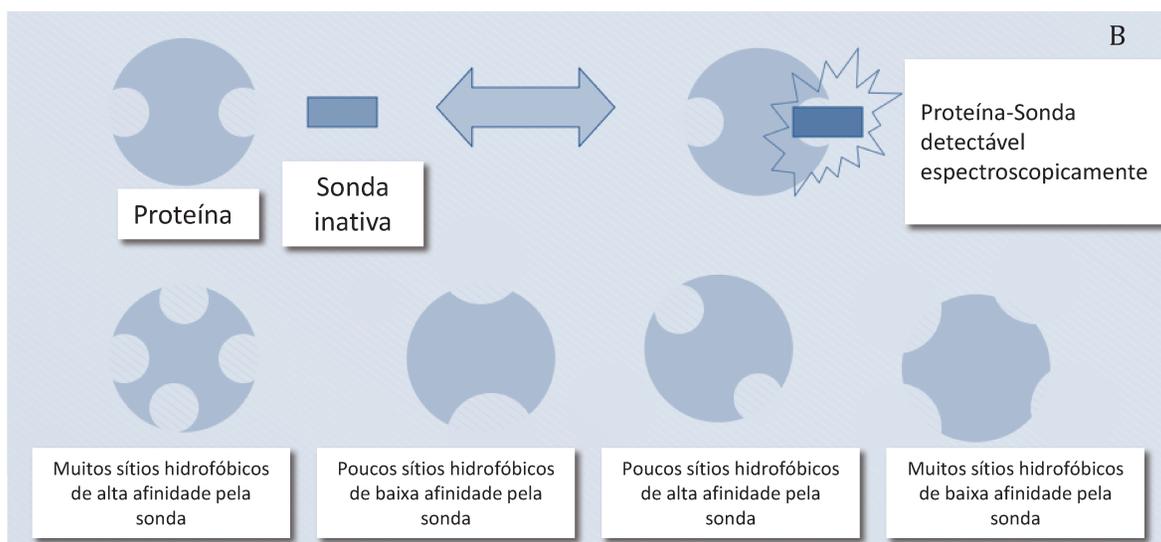
As interações hidrofóbicas são forças intrínsecas fracas que ocorrem entre cadeias laterais não polares dos aminoácidos que compõem as proteínas. Os resíduos hidrofóbicos podem estar expostos na superfície das proteínas ou no interior de sua estrutura, interferindo drasticamente na ordenação das moléculas de água na solução proteica (Whitford, 2005). O 8-anilino 1-

naftaleno sulfonato (ANS) atua como uma sonda fluorescente que se liga aos grupos hidrofóbicos presentes na superfície das proteínas exibindo a característica de comprimento de onda máximo (λ_{\max}) que se altera quando a sonda é colocada em um ambiente polar (Whitford, 2005).

A análise de hidrofobicidade de superfície em massas de farinha de trigo apresenta uma metodologia baseada no uso da fluorescência de face frontal, em que se utiliza uma amostra sólida/semi sólida adicionada de ANS que se liga aos grupos hidrofóbicos emitindo luz após excitação (Bonomi et al., 2004). A **Figura II-7** ilustra o modelo de fluorescência para estimar a hidrofobicidade de superfície em massas de farinhas de trigo.



A



B

Figura II-7 – (A) Ilustração do mecanismo de fluorescência de face frontal; (B) Atuação da sonda espectroscópica na análise de hidrofobicidade. (adaptado de Iametti).

Através desta técnica é possível avaliar a afinidade dos grupos hidrofóbicos de superfície à sonda ANS e a quantidade de grupos hidrofóbicos presentes (Bonomi et al., 2004).

A estrutura secundária das proteínas do glúten pode ser avaliada através da análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, sendo que a principal região avaliada é a Amida I ($1610-1700\text{ cm}^{-1}$). Esta técnica identifica os tipos de interações/ligações químicas presentes nas

estruturas avaliadas, sendo que o meio em que a amostra está presente influencia os espectros obtidos (Georget e Belton, 2006; Seabourn et al., 2008).

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica que avalia os modos vibracionais das moléculas que compõem a amostra e pode fornecer informações sobre a estrutura química das moléculas, tal como a protonação de cadeias laterais de proteínas, o estado redox, comprimento, força, ângulos e conformação das ligações químicas, presença de ligações de hidrogênio, entre outras (Barth and Zscherp, 2002).

Hu et al. (2011), avaliaram o espectro de infravermelho com transformada de Fourier para amostras de proteína de amendoim isoladas, microfluidizadas e tratadas com TGase microbiana, sendo observado que a enzima provocou o desdobramento das proteínas do amendoim reduzindo os teores de estruturas α -hélice e aumentando as estruturas randômicas e folhas- β .

II.3. Material e métodos

II.3.1. Farinha

A farinha de trigo mole (*Triticum aestivum*) utilizada em todos os ensaios foi a farinha enriquecida *Everlite* (Kraft Canada, Mississauga, ON, Canada). Esta farinha foi caracterizada quanto aos teores de proteína (7,44%), teor de umidade (12,3%) e cinzas (0,66%), seguindo metodologias descritas pela AACC (AACC, 2008).

II.3.2. Enzimas

A formulação enzimática comercial Biobond™ TG-M (BioBond), formulada com a enzima TGase e amido como veículo, foi adquirida da empresa *Kinry Food Ingredients Co.* (China).

O extrato enzimático bruto liofilizado de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 (EEBC), produzido de acordo com o item I.3.2.1, foi utilizado para os ensaios comparativos com a atuação da formulação comercial em farinha de trigo.

O EEBC foi analisado quanto à atividade de proteases pelo método da azocaseína em três valores de pH distintos (5,0, 7,0 e 9,0) não sendo identificada atividade de protease significativa.

A atividade de TGase foi testada pelo método colorimétrico de formação de ácido hidroxâmico, conforme descrito no item I.3.1.1.

II.3.3. Atuação da TGase microbiana nas proteínas da farinha de trigo mole (*Triticum aestivum*)

Inicialmente a enzima comercial foi utilizada para determinação dos efeitos da temperatura, quantidade de enzima e do pH do solvente empregado na mistura da massa de farinha. Para tanto, um delineamento fatorial 2³ com três repetições no ponto central foi conduzido, sendo avaliadas como resposta as propriedades de mistura da massa, de textura e bioquímicas.

II.3.3.1. Preparo da massa de farinha de trigo

As massas de farinha de trigo mole foram todas preparadas em um farinógrafo (C.W. Brabender Inc., Hackensack, NJ, USA) utilizando o misturador

de 50 g. A velocidade de rotação das pás de mistura foi fixada em 63 rpm e todas as massas foram misturadas por 6 minutos.

A quantidade de solvente adicionada à farinha foi de 53%(m:v) para todos os ensaios realizados, sendo que este valor foi determinado com base na absorção de água destilada pela farinha de trigo mole, misturada a 30°C nas mesmas condições descritas acima para o farinógrafo, que permitisse que o torque máximo da massa atingisse 500 unidades Brabender (BU). Desta forma, a massa foi composta de 50 g de farinha e 26,5 mL de solvente.

Os solventes utilizados no preparo das massas foram todos ajustados à temperatura de cada experimento (**Tabela II-4**). Antes da adição destes solventes à massa, a farinha foi misturada no farinógrafo à temperatura de mistura por 1 minuto. Nos ensaios em que foi adicionada a enzima, esta foi misturada à farinha durante o período de ambientalização da farinha no farinógrafo.

Logo após a mistura, parte das massas foi utilizada prontamente para análises das propriedades mecânicas e espectroscópicas. O restante foi congelado a -80°C e liofilizado. O tamanho das partículas foi padronizado (utilizando um moinho de pás acoplado a uma tela) em 0,5mm para realização das demais análises bioquímicas.

II.3.3.2. Avaliação do efeito da quantidade de TGase, pH e temperatura na massa de farinha de trigo mole

Os efeitos da quantidade de enzima adicionada à massa durante o processo de mistura, o pH do tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ e a temperatura de mistura e descanso da massa foram avaliados por meio de um delineamento fatorial 2³ com três repetições no ponto central, sendo os níveis de estudo para cada variável independente apresentados na **Tabela II-3**. Todas as análises

estatísticas foram feitas com 90% de significância utilizando o Software Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

Tabela II-3 – Níveis de estudo das variáveis quantidade de TGase, pH do tampão citrato e temperatura para o estudo do efeito em massa de farinha de trigo mole

Variáveis Independentes	-1	0	+1
Quantidade de Enzima (U/g de proteína)	2,0	5,0	8,0
pH do tampão	4,5	5,5	6,5
Temperatura (°C)	30,0	33,5	37,0

A quantidade de enzima utilizada foi definida como unidades de atividade de TGase por grama de proteína presente na farinha de trigo utilizada para fazer a massa.

Nos ensaios preliminares, foi utilizado com solvente apenas o tampão citrato 0,05M com pH variando de 4,5 a 6,5. Esta variável independente apresenta importância tanto na modificação das proteínas do glúten, podendo alterar o alcance de atuação da enzima expondo os grupos em que ela atua (glutamina e lisina), bem como na modificação da estrutura da própria enzima elevando ou reduzindo sua atividade catalítica. A mesma observação pode ser feita em relação à ação da temperatura de mistura e descanso da massa.

A **Tabela II-4** apresenta os ensaios realizados para o delineamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central.

Tabela II-4 – Ensaio do delineamento fatorial 2³ para o estudo do efeito da quantidade de transglutaminase, pH do tampão citrato e temperatura de mistura e descanso da massa de farinha de trigo mole em suas propriedades mecânicas e bioquímicas. Valores codificados encontram-se entre parênteses.

Ensaio	Quantidade de enzima (U/g de proteína)	pH do tampão citrato 0,05M	Temperatura (°C)
1	2,0 (-1)	4,5 (-1)	30,0 (-1)
2	8,0 (1)	4,5 (-1)	30,0 (-1)
3	2,0 (-1)	6,5 (1)	30,0 (-1)
4	8,0 (1)	6,5 (1)	30,0 (-1)
5	2,0 (-1)	4,5 (-1)	37,0 (1)
6	8,0 (1)	4,5 (-1)	37,0 (1)
7	2,0 (-1)	6,5 (1)	37,0 (1)
8	8,0 (1)	6,5 (1)	37,0 (1)
9	5,0 (0)	5,5 (0)	33,5 (0)
10	5,0 (0)	5,5 (0)	33,5 (0)
11	5,0 (0)	5,5 (0)	33,5 (0)
12	5,0 (0)	5,5 (0)	33,5 (0)

As respostas avaliadas foram divididas em dois grupos: análises das propriedades mecânicas e análises bioquímicas da massa.

II.3.3.2.1. Análises da mistura da massa de farinha de trigo mole no farinógrafo

Os seguintes parâmetros foram avaliados para cada ensaio de delineamento fatorial realizado: Consistência máxima (C_m), tempo de desenvolvimento da massa (TDM), estabilidade (EST) e a perda de consistência (PC) da massa. Esses parâmetros podem ser visualizados na **Figura II-4**.

II.3.3.2.2. Análise das respostas de extensibilidade das massas de farinha de trigo mole

Os ensaios de extensibilidade foram conduzidos em um texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, RU) utilizando a sonda SMS/Kieffer (célula de carga de 5 kg). As amostras de massa foram colocadas em uma forma de teflon (para obtenção de filetes padronizados de massa) e deixadas em repouso por 40 minutos. Os filetes foram então colocados na plataforma e estendidos a 3,3 m/s. Sete medidas foram realizadas para cada amostra do delineamento fatorial 2³. Os parâmetros de resistência à extensão (R_m), de extensibilidade máxima (E_m) bem como a área sob a curva de extensibilidade (A) foram calculados utilizando o software Texture Exponent 32 (Stable Micro Systems, RU). As amostras foram avaliadas logo após o tempo de repouso, no farinógrafo, de 30 minutos.

II.3.3.2.3. Análise da pegajosidade da massa de farinha de trigo mole

Os ensaios de pegajosidade foram conduzidos em um texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, RU) utilizando a sonda SMS/Chen-Hoseney e um cilindro de *perspex* 25 mm (célula de carga de 5 kg). Sete análises foram realizadas para cada amostra do delineamento fatorial 2³. As medidas foram conduzidas utilizando força de 40 g ao longo de uma distância de 4 mm, com velocidade de teste de 0,5 mm/s e velocidade pós teste de 10 mm/s. A força máxima para liberar a sonda da massa (pegajosidade) foi automaticamente determinada utilizando o software Texture Exponent 32 (Stable Micro Systems,

RU). As amostras foram avaliadas logo após o tempo de repouso de 30 minutos no farinógrafo.

II.3.3.2.4. Análise da solubilidade das proteínas do glúten presentes na massa de farinha de trigo mole

Amostras de 20 mg das massas preparadas no delineamento fatorial 2^3 liofilizadas foram diluídas em tampão fosfato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,8, contendo 2% de SDS, e agitadas durante 1 hora a 25°C . Após o aquecimento, as amostras foram centrifugadas a $9.000 \times g$ por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi filtrado a $0,45 \mu\text{m}$.

A solubilidade das proteínas do glúten em solução de SDS foi avaliada através da cromatografia líquida de alta eficiência (LC 10A, Shimadzu Co. Japão) acoplado com uma coluna de exclusão molecular BioSep-SEC-s4000 (Phenomenex, USA) com dimensões de $300 \times 7,8\text{mm}$ e a um detector de luz UV-visível (SPD 10A, Shimadzu Co., Japão).

Alíquotas de $50 \mu\text{L}$ das amostras centrifugadas e filtradas foram injetadas na coluna e as proteínas foram eluídas isocraticamente com solução aquosa de acetonitrila 50% (v:v) acidificada com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). O fluxo aplicado foi de 1mL.min^{-1} e o tempo de cada corrida foi de 30 minutos. A absorbância foi registrada a 214 nm. As áreas sob o cromatograma foram avaliadas através do software fornecido pela Shimadzu.

II.3.3.2.5. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas da massa de farinha de trigo mole

A eletroforese foi conduzida na presença de agente redutor utilizando gel de 10% (m:v) de poliacrilamida pré-preparado (10% Mini-PROTEAN® TGXTM, BioRad).

Para cada amostra do planejamento factorial 23, 11mg de massa liofilizada foi dissolvida em 400µL de tampão da amostra (Laemmli Sample Buffer, 161-0737EDU, BioRad) adicionado de 50 mmol.L-1 de ditioneitol (DTT). As amostras foram agitadas sutilmente e aquecidas a 95°C por 4 minutos. Após resfriado, 10 µL de amostra foram injetados nos poços do gel e após 5 minutos de repouso, foi aplicada corrente elétrica de 120V e a corrida foi conduzida até que a marcação atingisse a base da placa de gel. O tampão de corrida utilizado foi o tris-glicina-SDS pH 8,3 (10x Tris/Glycine/SDS Electrophoresis buffer, 161-0732EDU, BioRad) diluído 10 vezes.

O padrão de massas moleculares (10 – 250kDa) utilizado foi o Precision Plus Protein (161-0363EDU, BioRad). As proteínas, após o término da corrida, foram coradas com Coomassie Blue (Bio-Safe Coomassie Stain, 161-0787EDU, BioRad).

O gel foi escaneado utilizando o equipamento Gel DocTMEZ imager (Bio-Rad Laboratories, Inc., EUA).

II.3.3.2.6. Avaliação da estrutura secundária das proteínas da massa de farinha de trigo mole por espectroscopia por infravermelho (EIVTF)

Amostras da massa fresca foram cuidadosamente removidas do misturador após 30 minutos de descanso e colocadas sobre um cristal (limpo e seco) de diamante com um detector DKATGS (*deuterated L-alanina doped tri-glycin sulfate*). Os espectros (100 leituras) foram coletados na região de 600 – 4000 cm⁻¹, com resolução de 2 cm⁻¹, utilizando um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (IRPrestige-21, Shimadzu Corporation, Japão), a temperatura ambiente.

Os espectros foram normalizados e foi realizada a correção da linha de base antes das análises. A análise dos espectros foi realizada utilizando o software OPUS 7.0 (Bruker Optics, Inc., Billerica, EUA).

Misturas de H₂O e D₂O foram utilizadas como padrões, de acordo com o método de Bock e Damodaran (2012) para eliminação do efeito da água no espectro na região Amida I. A segunda derivada dos espectros foi calculada utilizando a função de Savitsky-Golay (cinco pontos) e foi utilizada para o estudo das alterações na estrutura do glúten das massas de farinha de trigo mole tratadas com tampão citrato e TGase, de acordo com o delineamento fatorial 2³. A área sob a segunda derivada dos espectros foi associada com cada estrutura secundária (Bock e Damodaran, 2012).

II.3.4. Comparação da atuação da TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 nas proteínas da farinha de trigo mole

A atuação da formulação comercial de transglutaminase em farinha de trigo mole foi comparada com a atuação do EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando 2 solventes para preparo de massas, sendo eles a água destilada e o tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5. A água destilada utilizada apresentou pH 5,5.

As massas foram produzidas da mesma forma descrita no item II.3.3.1, sendo a temperatura de mistura e de descanso fixada em 30°C e a quantidade de solvente adicionada até 53% (m:v). A enzima comercial BioBond e o EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foram misturados à farinha na proporção fixa de 8U por grama de proteína presente na farinha de trigo mole utilizada.

Parte da massa foi analisada prontamente quanto às propriedades mecânicas no texturômetro e parte da massa foi congelada a -80°C e liofilizada para as análises bioquímicas.

II.3.4.1.1. Avaliação das propriedades mecânicas das massas de farinha de trigo mole tratadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

II.3.4.1.1.1. Análise das respostas de extensibilidade das massas de farinha de trigo mole

Os ensaios de extensibilidade foram conduzidos em um texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, RU) conforme descrito no item II.3.3.2.2.

II.3.4.1.1.2. Análise da pegajosidade das massas de farinha de trigo mole

Os ensaios de pegajosidade foram conduzidos em um texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, RU) de acordo com o método descrito no item II.3.3.2.3.

II.3.4.1.2. Avaliação das características bioquímicas da massa de trigo mole

II.3.4.1.2.1. Avaliação da solubilidade das proteínas e glúten presentes na massa de trigo mole

Amostras de 20 mg das massas liofilizadas foram preparadas conforme descrito no item II.3.3.2.4.

A solubilidade das proteínas do glúten em solução de SDS foi avaliada através da cromatografia líquida de alta eficiência (LC 10A, Shimadzu Co. Japão)

acoplado com uma coluna de exclusão molecular BioSep-SEC-s4000 (Phenomenex, USA) com dimensões de 300 x 7,8mm e a um detector de luz UV-visível (SPD 10A, Shimadzu Co., Japão).

Alíquotas de 50µL das amostras centrifugadas e filtradas foram injetadas na coluna e as proteínas foram eluídas isocraticamente com solução aquosa de acetonitrila 50% (v:v) acidificada com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). O fluxo aplicado foi de 0,7mL/min e o tempo de cada corrida de 30 minutos. A absorbância foi registrada a 214nm.

As áreas sob o cromatograma foram avaliadas através do software do equipamento.

II.3.4.1.2.2. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas da massa de trigo mole

A eletroforese foi conduzida de acordo com o método descrito no item II.3.3.2.5.

II.3.4.1.2.3. Avaliação da estrutura secundária das proteínas da massa de farinha de trigo mole por espectroscopia por infravermelho (EIVTF)

Amostras das massas liofilizadas foram colocadas sobre um cristal (limpo e seco) de diamante com um detector DKATGS (*deuterated L-alanina doped tri-glycin sulfate*). Os espectros (100 leituras) foram coletados na região de 600 – 4000 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} , utilizando um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (IRPrestige-21, Shimadzu Corporation, Japão) a temperatura ambiente. Cada amostra foi lida em duplicata.

Os espectros foram normalizados e foi feita a correção da linha de base antes das análises. Os espectros da enzima comercial e o EEBC foram também avaliados e descontados das médias dos espectros na proporção em que estavam presente na massa. A análise dos espectros tratados foi realizada utilizando o software OPUS 7.0 (Bruker Optics, Inc., Billerica, EUA).

A derivada segunda dos espectros foi calculada utilizando a função de Savitsky-Golay (cinco pontos) e foi utilizada para o estudo das alterações na estrutura do glúten das massas de farinha de trigo mole. A área sob a segunda derivada dos espectros foi associada com cada estrutura secundária (Bock e Damodaran, 2012).

II.3.4.1.2.4. Hidrofobicidade de superfície da massa de farinha de trigo mole

A hidrofobicidade de superfície foi avaliada nas massas liofilizadas dissolvidas em solução de ANS (8-anilino 1-naftaleno sulfonato) com concentração variando de 0,05 mol.L⁻¹ a 0,4 mol.L⁻¹. A solução de ANS foi adicionada às amostras de 2,5 g de massa liofilizada (3% de umidade) na quantidade de 0,5 mL, sendo misturada com bastão de vidro por 3 minutos. A massa formada foi então colocada em uma célula de quartzo padrão. O fluorímetro RF-5301 (Shimadzu, Japan) foi utilizado para leitura da emissão na região de 400 a 600 nm após excitação a 390 nm.

II.3.4.2. Avaliação da produção de pão de forma com farinha de trigo mole e transglutaminase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando água destilada ou tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH6,5 na formulação

Pães de forma foram preparados com as TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CbMAI-837 utilizando-se água destilada ou tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH6,5 na formulação. A quantidade de enzima adicionada a massa foi fixada em 2 U/g de proteína com base nos resultados dos ensaios de extensibilidade da massa. Foram utilizadas 3 quantidades de água ou tampão distintas na formulação, sendo elas 53% (m/m) (valor sugerido pelo farinograma como absorção da farinha de trigo mole misturada com água destilada a 30°C), 56% (m/m) e 59% (m/m).

A **Tabela II-5** apresenta a quantidade de ingrediente para cada pão formulado.

Tabela II-5 - Formulação dos pães contendo TGase microbiana e controles

Ingrediente	Quantidade
Farinha de trigo mole	100g
Levedura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> liofilizada comercial)	5,3g
Açúcar granulado	6,0g
Gordura vegetal hidrogenada	3,0g
Sal (NaCl)	1,5g
Água destilada ou Tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH6,5	Variável*
TGase (comercial ou de <i>Streptomyces</i> sp. CBAMI-837)	2U/g de proteína

* Foram utilizadas as quantidades de 53g, 56g e 59g de água ou tampão citrato.

Os pães foram formulados tendo como base o procedimento AACC 10-10.03, modificado para evitar que a rede de glúten da massa fosse danificada durante o processo de sova, uma vez que a farinha utilizada apresenta baixo teor de proteínas, caracterizando uma massa que suporta pouco trabalho mecânico, além do que, devido à perda da elasticidade da massa inerente à atuação da transglutaminase, a massa não se recupera bem da etapa de moldagem, perdendo volume. O procedimento padrão é ideal para farinha com

elevado teor de proteínas destinadas a fabricação de pães. A **Figura II-8** apresenta o fluxograma de preparo dos pães 100g.

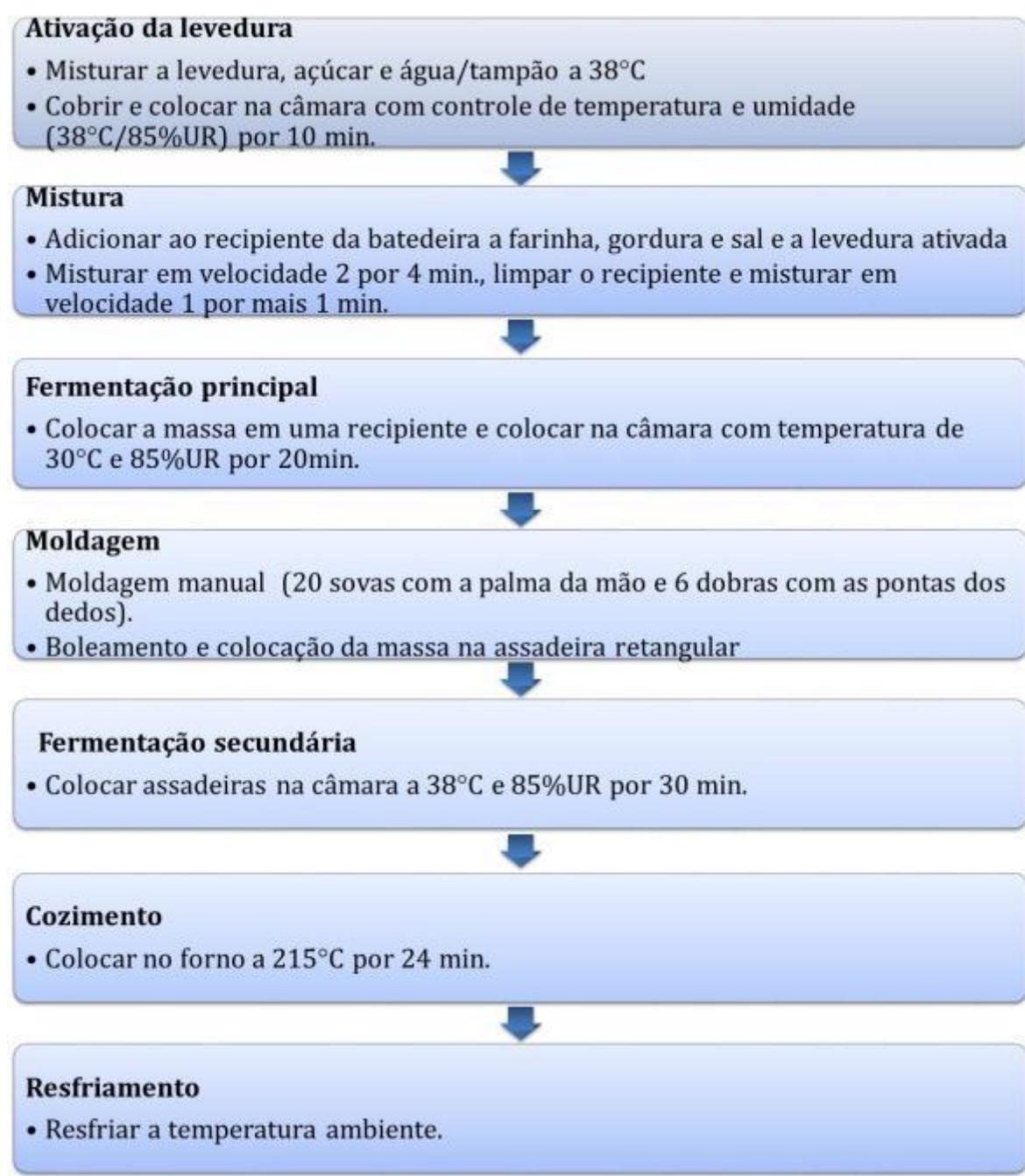


Figura II-8 - Fluxograma do preparo dos pães.

Para os pães formulados com TGase, a enzima liofilizada foi adicionada na etapa de mistura, juntamente com a farinha. Foi formulado, também, um pão com farinha de trigo duro (13% m/m de proteínas) sem adição de TGase, a fim

de se ter um referencial de textura para os pães. A formulação foi composta de 100 g de farinha de trigo duro; 63 g de água destilada (conforme indicado na absorção de água pela farinha pelo farinograma); 5,3 g de levedura liofilizada comercial (*Saccharomyces cerevisiae*); 6,0 g de açúcar granulado; 3,0 g de gordura vegetal hidrogenada e 1,5 g de sal (NaCl). A etapa de fermentação principal consistiu em 52 minutos a 38°C/85% UR, seguido de 3 moldagens sequenciais (idêntica a descrita na **Figura II-8**) e mais 13 minutos a 38°C/85% UR. A segunda fermentação foi de 33 minutos.

Os pães de 100 g, formulados em duplicata, foram armazenados em sacos plásticos com zíper por 18 horas (20°C) e então foram submetidos à análise do perfil de textura (TPA) utilizando o texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, RU) acoplado de cilindro de alumínio 36mm (célula de carga de 25kg). Foi calculada a média das medidas.

Foram cortadas 3 fatias (descartando-se as extremidades) de 2,5 cm de altura de cada réplica dos pães. Essas fatias foram colocadas centralizadas na base plana do texturômetro e submetidas a duas compressões sequenciais, simulando duas mordidas no miolo do pão. A compressão máxima foi de 40% com velocidade de 1mm/s. O perfil das compressões foi avaliado pelo software Texture Exponent 32 (Stable Micro Systems, RU).

O volume específico dos pães foi calculado pela razão entre o peso de cada pão e seu volume. O volume foi calculado pelo deslocamento de sementes de canola, em duplicata.

II.4. Resultados e discussões

II.4.1. Atuação da TGase microbiana nas proteínas da farinha de trigo mole

A atuação da TGase comercial (BioBond) nas proteínas da farinha de trigo mole foi avaliada em um sistema de massa formada pela adição da farinha e de solvente em um farinógrafo e misturada por 6 minutos. A massa foi submetida à avaliação de suas propriedades físicas e químicas. Os resultados e discussões serão divididos entre os resultados das respostas relacionadas à reologia da massa e aos relacionados à bioquímica da massa.

II.4.1.1. Delineamento fatorial 2^3 para o preparo da massa de farinha de trigo mole e análises das propriedades mecânicas

A **Tabela II-6** apresenta os valores obtidos para cada parâmetro da mistura da massa e relativos à textura avaliada pelo delineamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central.

Tabela II-6 – Consistência máxima (BU), tempo de desenvolvimento (min), estabilidade (min), perda da consistência (BU), resistência à extensão (g), extensibilidade (mm), trabalho realizado (g.mm) e pegajosidade da massa (g) de farinha de trigo mole

Ensaio	Dados Farinógrafo				Dados texturômetro			
	C _m (BU)	TDM (min)	EST (min)	PC (BU)	R _m (g)	E _m (mm)	A (g.mm)	Pegajosidade (g)
1	478	1,5	3,0	66,33	6,96	34,95	220,29	57,95
2	522	1,4	2,7	82,67	10,93	42,87	413,32	46,91
3	467	1,5	5,0	24,00	17,82	45,73	633,30	46,50
4	500	1,7	5,2	30,67	24,07	36,99	701,90	46,36
5	369	1,7	2,7	44,67	7,70	27,78	193,48	60,76
6	366	1,7	3,2	46,00	10,62	33,30	312,36	63,41
7	364	1,7	5,0	18,33	15,04	38,07	291,30	56,34
8	418	1,5	5,2	25,33	26,13	26,42	524,66	48,32
9	446	1,5	3,0	37,00	15,96	35,58	486,20	34,15
10	430	1,5	4,1	36,67	14,00	47,63	565,55	49,24
11	440	1,5	4,6	35,00	15,57	37,63	496,56	48,52
12	420	1,4	4,8	26,67	15,19	41,88	507,25	55,82

II.4.1.1.1. Análise da mistura da massa de farinha de trigo mole tratada com TGase no farinógrafo

As curvas de torque (BU) versus tempo de mistura (min) para cada ensaio realizado no planejamento fatorial 2³ estão apresentadas na **Figura II-9 A e B**.

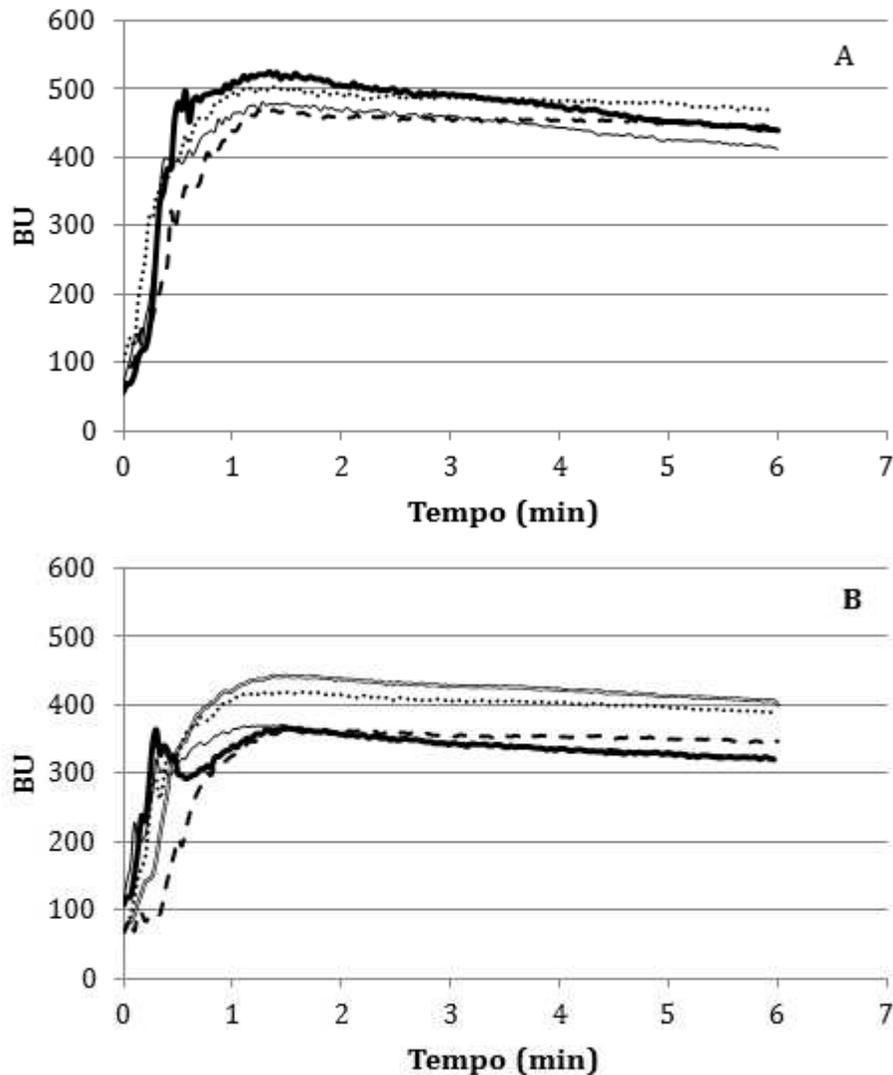


Figura II-9 - Farinogramas das massas de farinha de trigo mole tratada com TGase dos ensaios do delineamento fatorial 2^3 (A) temperatura de 30°C e (B) temperatura de 37°C e ponto central. (—) 8 U/g de proteína e pH 4,5; (—) 2U/g de proteína e pH 4,5; (···) 8U/g de proteína e pH 6,5; (- - -) 2U/g de proteína e pH 6,5; (- · -) 5U/g de proteína e pH 5,5.

A **Tabela II-7** apresenta os efeitos e o valor p de cada variável e suas interações nos parâmetros de mistura da massa de farinha de trigo mole tratadas com TGase.

Tabela II-7 – Efeitos da quantidade de TGase, pH do tampão citrato e temperatura nos parâmetros de formação da massa de farinha de trigo mole no farinógrafo

Fatores	C _m		TDM		EST		PC	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
Média	435,00*	<0,01	1,55*	<0,01	4,04*	<0,01	39,44*	<0,01
Enzima	32,00*	0,02	-0,03	0,78	0,15	0,76	7,83	0,20
pH do tampão	3,50	0,74	0,03	0,78	2,20*	<0,01	-35,33*	<0,01
Temperatura	-112,50*	<0,01	0,13	0,20	0,05	0,92	-17,33*	0,02
Enzima x pH do tampão	11,50	0,30	0,03	0,78	0,05	0,92	-1,00	0,86
Enzima x Temperatura	-6,50	0,54	-0,07	0,42	0,20	0,68	-3,67	0,53
pH do tampão x Temperatura	20,00*	0,10	-0,13	0,20	-0,05	0,92	11,83*	0,08
R²	0,97		0,52		0,83		0,92	

* Efeitos significativos

O maior efeito significativo, com 90% de significância, sobre a consistência máxima (C_m) da massa de farinha de trigo mole durante o processo de mistura foi o da mudança da temperatura. O aumento da temperatura de mistura reduziu a consistência da massa (a quantidade de solvente foi fixada em 53%) o que pode estar relacionado ao aumento da absorção do solvente pelos componentes da massa. A quantidade de transglutaminase adicionada à mistura apresentou efeito positivo e significativo na consistência da massa, indicando que a enzima já começa a atuar durante o processo de mistura da massa. O pH do tampão citrato não apresentou efeito significativo sobre esse parâmetro, nos níveis estudados, no entanto a interação entre pH e temperatura apresentou um efeito positivo e significativo, a 90% de significância.

Quanto ao tempo de desenvolvimento da massa (TDM) o modelo proposto não foi adequado para realizar previsões de como os fatores avaliados atuam neste parâmetro. Apenas 52% dos resultados podem ser previsto pelo

modelo proposto, o que corresponde a um valor baixo. A média do tempo para desenvolvimento da massa foi de 1,55 minutos, valor coerente para farinhas muito fracas, com baixo teor de proteínas.

A estabilidade da consistência da massa foi afetada significativamente apenas pelo pH do tampão citrato. A massa composta por tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5 foi menos susceptível a quebra durante a mistura no farinógrafo, sugerindo um fortalecimento da rede proteica da massa. No pH 6,5, gluteninas e gliadinas estão acima do seu ponto isoelétrico, passando gradativamente para sua forma carregada, sendo que as ligações de hidrogênio deixam de ser favorecidas.

Perda da consistência (PC), que diz respeito ao quanto a massa perdeu de consistência após a mistura de 6 minutos de mistura, foi significativamente influenciada pelo pH do tampão do solvente adicionado à massa, sendo que o aumento do pH conduziu à redução do valor deste parâmetro reafirmando o aumento da estabilidade da massa à mistura. A temperatura também apresentou efeito significativo sobre este parâmetro e de forma similar ao pH, o aumento da temperatura conduziu à redução da perda da consistência. A interação entre pH e temperatura apresentou efeito positivo sobre a perda da consistência indicando que estes dois fatores em conjunto proporcionam maior perda de consistência da massa após 6 minutos de mistura, no entanto, o efeito da interação foi inferior ao efeito individual do pH e temperatura sobre PC. A TGase não afetou a PC da massa assim como não influenciou na estabilidade da massa à mistura (EST). No entanto, como o efeito do pH sobre estes dois parâmetros foi elevado ele pode ter mascarado o efeito dos demais fatores dentro dos níveis estudados.

A estabilidade da massa à mistura (EST) é um fator importante para se determinar o processo de mistura dos produtos desenvolvidos com a farinha. Quanto maior o valor de EST, mais tempo a massa pode ser submetida ao

estresse mecânico do batimento da massa sem sofrer grandes danos na sua estrutura proteica, sendo a massa capaz de reter as bolhas de gás durante o processo fermentativo posterior.

Desta forma, pelas características da massa atribuídas pelo farinograma, observa-se que a adição de TGase na massa elevou o ganho de consistência da massa e a formulação com tampão citrato 0,05M pH 6,5 elevou a sua estabilidade a qual deixa de ser característica de farinhas destinadas à bolos (1 a 4 minutos) e passa a ter características de estabilidade de massas para biscoito fermentado (de 5 a 12 minutos).

II.4.1.1.2. Análise das respostas de extensibilidade das massas de farinha de trigo mole

As curvas obtidas do texturômetro para o ensaio de micro-extensão da massa fresca utilizando a sonda SMS/Kieffer rig (célula de carga de 5kg) estão ilustradas na **Figura 10 A e B**.

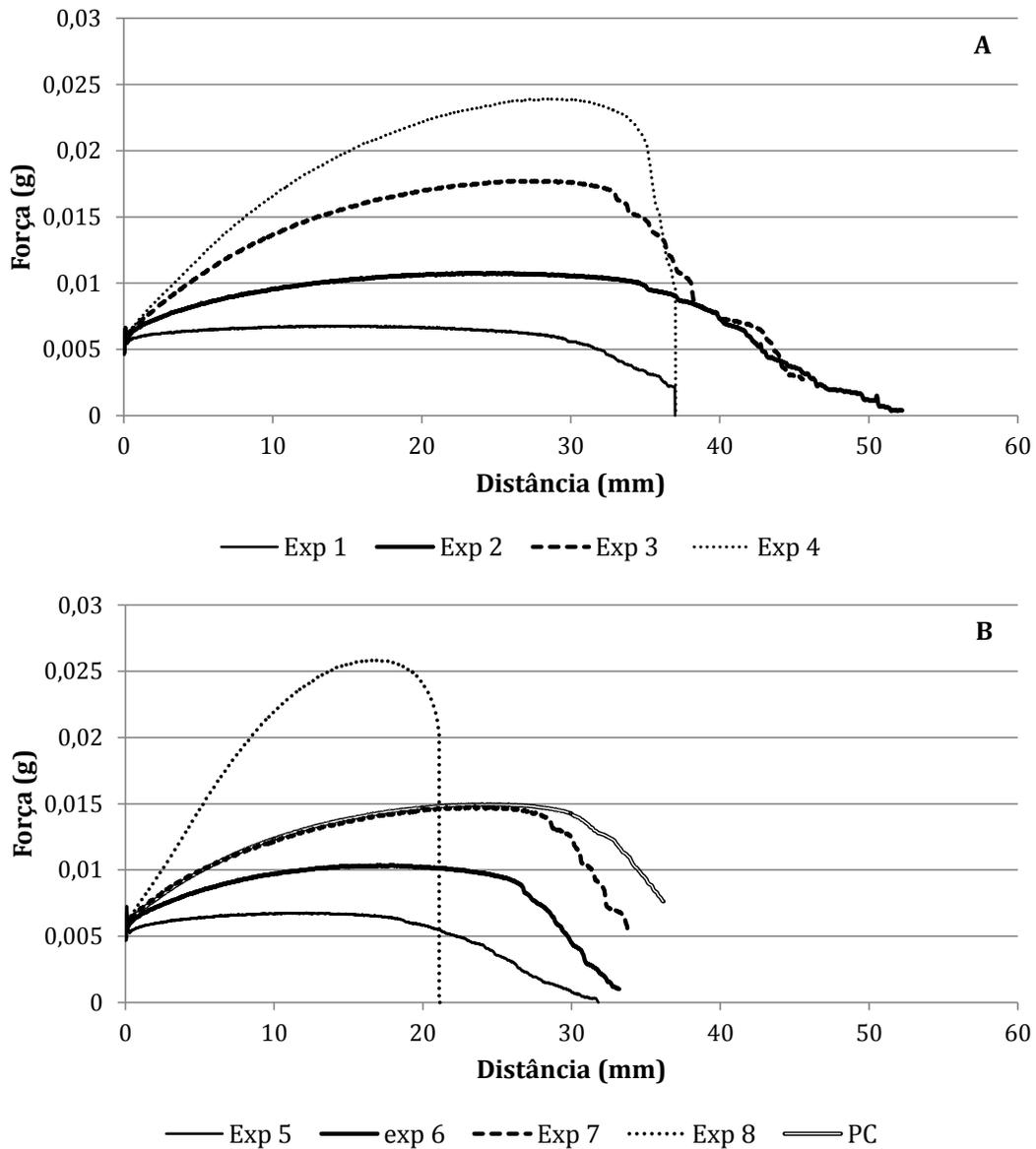


Figura II-10 - Micro-extensogramas das massas de farinha de trigo mole (A) 30°C (B) 37°C.

A **Tabela II-8** apresenta os efeitos das variáveis estudadas nas características de extensibilidade da massa de farinha de trigo mole.

Tabela II-8 – Efeitos da quantidade de TGase, pH do tampão citrato e temperatura na resistência à extensão (R_m), extensibilidade (E_m) e trabalho para estender a massa (A) de farinha de trigo mole

Fatores	R_m		E_m		A	
	Efeito	P	Efeito	p	Efeito	p
Média	14,99*	<0,01	36,47*	<0,01	445,52*	<0,01
Enzima	6,06*	<0,01	-1,74	0,46	153,47*	0,06
pH do tampão	11,71*	<0,01	2,08	0,38	252,93*	0,01
Temperatura	-0,07	0,93	-8,74*	0,01	-161,76*	0,05
Enzima x pH do tampão	2,61*	0,02	-8,46*	0,02	-2,49	0,97
Enzima x Temperatura	0,95	0,30	-1,33	0,56	22,65	0,73
pH do tampão x Temperatura	-0,29	0,74	-0,37	0,87	-97,87	0,18
R²	0,98		0,68		0,86	

* Efeitos significativos

A resistência à extensão (R_m) sofreu efeito positivo da quantidade de TGase adicionada à massa e do pH do tampão citrato sendo que o aumento da quantidade de enzima e o aumento do pH do tampão conduziram ao aumento da R_m indicando o fortalecimento de sua estrutura. Esses dois fatores atuam também de forma sinérgica como mostra o efeito da interação entre eles que foi significativo e positivo a 90% de significância. Desta forma, pode-se sugerir que o pH 6,5 altera a estrutura da rede de glúten fortalecendo-a e de certa forma permitindo maior atuação da enzima TGase, seja pela exposição dos substratos da enzima presentes no glúten seja pela conformação da estrutura da TGase de forma favorável a sua atuação, uma vez que 6,5 é o pH ótimo para atuação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 (Bagagli, 2009).

De fato neste pH as proteínas do glúten (gluteninas e gliadinas) estão acima do seu ponto isoelétrico (5,5 e 6,4, respectivamente) e, portanto, a carga total das proteínas é negativa e, devido à concentração de cargas de mesmo valor, há o aumento das forças eletrostáticas repulsivas fazendo com que a

estrutura proteica se abra, expondo as cadeias residuais dos aminoácidos que compõe a estrutura proteica e elevando a solubilização da proteína no meio aquoso.

De acordo com Kashiwagi et al. (2010) a cadeia lateral da cisteína presente no sítio ativo da enzima atua em sua forma reduzida, que em pH 6,5 começa a apresentar cargas negativas (pK_a 8,3), favorecendo o ataque nucleofílico do tiolato ao grupo doador de acil (cadeia lateral de aminoácidos glutamina).

A extensibilidade máxima (E_m) foi significativamente influenciada pela temperatura de mistura da massa, sendo que quanto maior a temperatura empregada, menor E_m . A interação entre pH do tampão citrato e a quantidade de enzima aplicada na massa também apresentou efeito significativo e negativo nesta resposta. Os demais termos não foram significativos dentro dos níveis avaliados ($p < 0,1$).

Uma observação interessante ocorre no experimento 8 (quantidade de enzima 8U/g de proteína, pH 6,5 e temperatura 37°C) em que a análise do farinograma indica que a quantidade de água adicionada foi superior à necessária para atingir a consistência de 500 BU (considerada padrão para a consistência de massas com absorção ótima de solvente), no entanto, o micro-extensograma da massa após o repouso de 30 minutos a 37°C, indicou baixa extensibilidade e elevada resistência à extensão (R_m) e o formato da curva ilustrada na **Figura II-10** para este experimento são características de uma massa que não foi totalmente hidratada, ou seja, não há solvente suficiente para hidratar a rede de glúten e permitir que se comporte como um fluido viscoelástico, suas características passam a ser mais próximas à de um sólido, como foi sugerido por Bauer et al. (2003b) ao avaliar a aplicação da TGase em massa de farinha de trigo (11,9% m/m de proteína e 63% m/v de absorção de água) com água adicionada de 3,2% (m/v) de NaCl.

O polímero de glúten é tido como “borrachoso”, sendo elástico e resistente. Sua estrutura é desordenada e em sua forma relaxada existem muitas possibilidades de arranjá-la. Quando uma força externa é aplicada o polímero é esticado, reduzindo as formas de arranjo estruturais e como consequência o polímero tende a restaurar o estado relaxado após a suspensão da força externa (Singh & MacRitchie, 2001; Rauscher & Pomès, 2011). A glutenina (proteína de grande massa molecular presente no glúten) é considerada importante para as características únicas de elasticidade do glúten por conferir uma estrutura contínua (Delcour et al., 2012). A glutenina apresenta em sua estrutura grande número de ligações covalentes do tipo dissulfeto as quais contribuem para a rede de glúten apresentar suas propriedades elásticas, uma vez que durante o processo de aplicação de forças externas as ligações dissulfídicas se quebram e se formam novamente em processo dinâmico (**Figura II-2**).

Em oposição às ligações dissulfídicas das ligações de hidrogênio, principal interação envolvida nas propriedades de elasticidade das gluteninas (Delcour et al, 2012), as ligações isopeptídicas ϵ -(γ -glutaminil)-lisina apresentam estrutura muito similar à ligação peptídica, sendo planares e rígidas. Levando em consideração o mecanismo de ação da TGase e as características das ligações cruzadas originadas de sua ação aliadas às observações da extensibilidade da massa tratada com a enzima, podemos propor que a rede de glúten é travada, reduzindo as possibilidades de movimentação das moléculas constituintes e, conseqüentemente, perdendo a estrutura flexível. A **Figura II-11** ilustra a introdução das ligações ϵ -(γ -glutaminil)-lisina pela TGase nas proteínas do glúten, propondo um modelo para redução da extensibilidade da massa

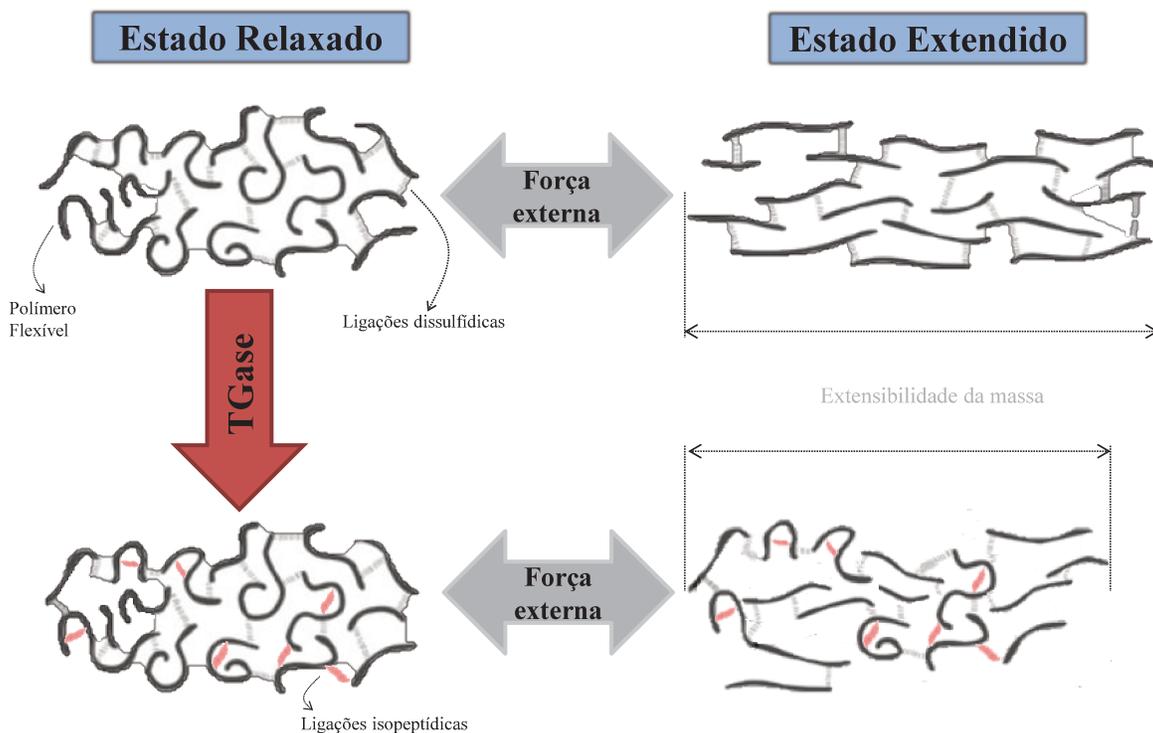


Figura II-11 - Ilustração da interferência das ligações isopeptídicas ϵ -(γ -glutaminil)-lisina na extensibilidade do glúten (adaptado de Rauscher & Pomès, 2011).

Além de reduzir a mobilidade das moléculas devido à maior rigidez da estrutura, as ligações isopeptídicas podem ainda alterar a exposição de grupos hidrofóbicos na superfície da proteína o que pode levar à maior ou menor solvatação da rede de glúten. Nesta etapa, não foram realizadas análises de hidrofobicidade de superfície.

II.4.1.1.3. Análise da pegajosidade da massa de farinha de trigo mole tratada com TGase

A **Tabela II-9** apresenta os efeitos das variáveis sobre a pegajosidade da massa de farinha de trigo mole obtida em cada ensaio do planejamento fatorial 2³.

Tabela II-9 – Efeitos da quantidade de TGase, pH do tampão citrato e temperatura na pegajosidade da massa de trigo mole

Fatores	R_m	
	Efeito	p
Média	51,20*	<0,01
Enzima	-4,14	0,55
pH do tampão	-7,88	0,28
Temperatura	7,77	0,28
Enzima x pH do tampão	0,06	0,99
Enzima x Temperatura	1,45	0,83
pH do tampão x Temperatura	-1,88	0,78
R^2	0,98	

* Efeitos significativos

Não foram observados efeitos significativos dentro dos níveis avaliados para a pegajosidade da massa de farinha de trigo mole.

A transglutaminase em geral reduz a pegajosidade das massas a base de farinha o que é vantajoso para a indústria de panificação devido à melhoria na maquineabilidade do produto (Ribotta et al, 2010).

II.4.1.2. Delineamento fatorial 2^3 para as análises bioquímicas da massa de farinha de trigo mole tratada com TGase

A **Tabela II-10** apresenta os valores obtidos para cada resposta avaliada pelo delineamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central.

Tabela II-10- Respostas obtidas da cromatografia de exclusão molecular e da análise da estrutura secundária das proteínas da massa de farinha de trigo mole realizada por FTIR

Ensaio	Dados SE-HPLC			Dados FTIR			
	Área total (x1000)	Área 1 (x1000)	Área 2 (x1000)	α -hélice (%)	folhas- β (%)	randômica (%)	voltas- β (%)
1	88572,17	48245	33816,34	8,71	44,78	30,94	15,57
2	78701,31	42690,45	28810	13,21	46,38	29,42	10,99
3	83518,91	46395,02	29076,18	10,45	42,14	37,50	9,918
4	79288,8	43951,82	28201,26	7,89	49,57	27,00	15,54
5	90771,07	47580,76	35233,29	8,88	41,06	37,45	12,61
6	82196,8	43540,18	30944,49	10,87	43,74	34,66	10,73
7	82196,8	42378,04	24891,03	11,92	43,82	30,75	13,52
8	77796,49	43968,25	26324,27	10,15	50,81	29,80	9,24
9	85130,59	45267,48	31765,83	9,42	43,87	30,97	15,74
10	82921,12	45600,33	30504,01	9,67	47,21	33,24	9,88
11	85542,96	45840,01	30701,41	13,53	47,00	30,17	9,31
12	81209,08	44934,82	29501,79	10,09	45,29	31,60	13,02

II.4.1.2.1. Análise da solubilidade das proteínas do glúten presentes na massa de farinha de trigo mole tratada com TGase

A **Figura II-12** apresenta os cromatogramas de exclusão molecular para as proteínas extraídas das massas de farinha de trigo mole preparadas em cada ensaio do delineamento fatorial 2³. O ponto central está representado pela curva média da quadruplicata.

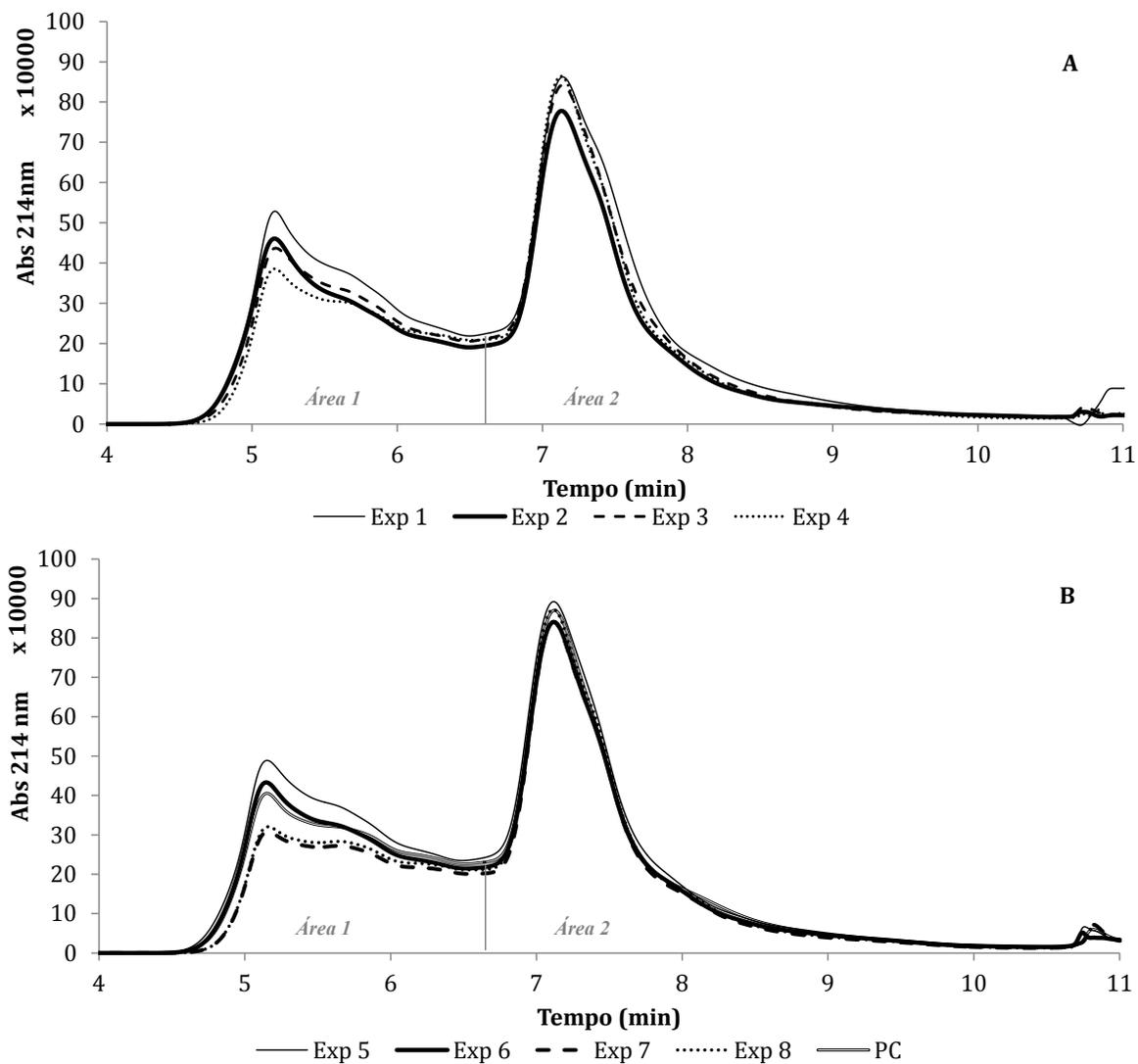


Figura II-12 – Cromatogramas de exclusão molecular para as proteínas extraídas das massas de farinha de trigo mole preparadas no delineamento fatorial 2^3 (A) ensaios a 30°C e (B) ensaios a 37°C.

As curvas foram divididas em duas áreas principais, sendo que a Área 1 sob a curva é associada à fração de glutenina de alta massa molecular (HMW-GS), às proteínas altamente agregadas e a pequenos agregados proteicos com massa molecular constante. A Área 2 sob a curva é relacionada à proteína monomérica e às frações de menores massa molecular (Mujoo & Ng, 2003; Zalm et al., 2010).

A área total sob a curva é uma forma indireta de determinar a solubilidade das proteínas do glúten em tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,8 contendo 2% (m/v) de SDS. A **Tabela II-11** apresenta os efeitos de cada variável na área total e nos valores das áreas 1 e 2 de cada ensaio realizado bem como os valores p a 90% de significância.

Tabela II-11 – Efeito da quantidade de enzima, pH do tampão e temperatura do preparo e descanso da massa sobre solubilidade das proteínas da massa de farinha de trigo mole

Fatores	Área total (x1000)		Área 1 (x1000)		Área 2 (x1000)	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	P
Média	83153,84*	<0,01	29980,82*	<0,01	45032,68*	<0,01
Enzima	-6768,89*	<0,01	-2184,21*	0,03	-2612,03*	<0,01
pH do tampão	-4360,10*	0,02	-5077,85*	<0,01	-1340,82*	0,03
Temperatura	719,99	0,57	-627,68	0,43	-953,76*	0,09
Enzima x pH do tampão	2453,68*	0,09	2463,37*	0,02	2185,54*	<0,01
Enzima x Temperatura	281,60	0,82	756,42	0,35	1386,84*	0,03
pH do tampão x Temperatura	-2127,20	0,14	-2403,40*	0,02	-1046,51*	0,07
R²	0,91		0,94		0,94	

* Efeitos significativos

Observou-se que a quantidade de enzima aplicada à massa apresentou efeito significativo e negativo em todas as áreas avaliadas do cromatograma de exclusão molecular com 90% de significância. Desta forma, a TGase leva à redução da solubilidade das proteínas da massa de farinha de trigo mole, atuando tanto nas frações de elevada massa molecular ou elevado grau de agregação quanto nas frações menores do glúten.

A redução da solubilidade ou da capacidade de extrair as frações proteicas do glúten pode ser relacionada ao aumento do tamanho da estrutura proteica em que a TGase atua, uma vez que catalisa reações de cruzadas entre

as proteínas. Outro ponto que pode ser apontado é a modificação da estrutura superficial das proteínas, expondo grupamentos hidrofóbicos ou dificultando o acesso do SDS à parte interna da estrutura.

Bauer et al (2003a) observaram o aumento de proteínas na fração de resíduos do fracionamento de Osborne realizado em massas contendo elevada quantidade de TGase comercial (900mg de enzima por kg de farinha de trigo), indicando juntamente com o perfil eletroforético das frações que as reações cruzadas catalisadas pela enzima reduzem a solubilidade proteica elevando o tamanho das estruturas presentes na rede de glúten.

Mujoo & Ng (2003) observaram que a TGase atua com maior intensidade na fração de glutenina com elevada massa molecular (HMW-GS), reduzindo sua capacidade de ser extraída da massa de farinha.

O pH do tampão citrato utilizado para produzir a massa também teve efeito significativo e negativo na quantidade de proteína extraída da massa. O pH e a força iônica a que proteínas são expostas interferem diretamente em sua conformação uma vez que alteram as interações eletrostáticas inter e intramoleculares. Létang & Verdier (1999) relacionaram as propriedades da massa de farinha com as ligações não covalentes (tais como as interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio) presente na rede de glúten, sendo que as interações eletrostáticas seriam as de menor contribuição uma vez que o glúten é composto por poucos aminoácidos ionizáveis.

Os resultados apresentados na **Tabela II-11** indicam que a presença do tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 6,5 (acima do pI das proteínas do glúten) influenciou a estrutura da rede de proteínas da massa e, aliado aos resultados obtidos durante a mistura (dados apresentados no item II.4.1.1.1) sugerindo que as interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, altamente influenciadas pela carga dos aminoácidos, contribuem para a estabilização da rede de glúten e conseqüentemente para seu fortalecimento.

O efeito da temperatura foi significativo, a 90% de significância, apenas para a Área 2, ou seja, a mudança na temperatura de mistura e descanso da massa afetou as estruturas poliméricas menores ou monoméricas do glúten, levando à redução da capacidade de serem extraídas da massa. No entanto, notou-se que a interação da temperatura com o pH do tampão apresentou efeito significativo e negativo na área 1 e área 2 a 90% de significância, e na área total a 86% de significância. O aumento da temperatura da mistura pode elevar as taxas de reação (ou interação) intra e intermoleculares favorecendo o agrupamento molecular na rede de glúten e dificultando sua extração.

A interação da temperatura com a quantidade de enzima adicionada à massa foi significativa apenas para a área 2, sendo que o efeito sinérgico foi oposto ao efeito individual de cada variável separadamente.

A interação entre a quantidade de enzima adicionada e o pH do tampão afetou significativamente todas as áreas avaliadas no cromatograma de exclusão molecular, sendo que o aumento simultâneo dos dois fatores conduziu ao aumento da quantidade de proteínas totais extraídas da massa, sendo o efeito similar entre as duas frações estudadas. Embora o pH 6,5 favoreça a atuação da enzima (Bagagli, 2009) as modificações provocadas pela introdução de ligações isopeptídicas ϵ -(γ -glutaminil)-lisina simultânea às modificações causadas pelas ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas devido o pH do tampão invertem o efeito individual de cada interação na massa.

A TGase, conforme citado anteriormente, catalisa além da transamidação a reação de desamidação, a qual conduz à conversão de resíduos de glutamina em resíduos de ácido glutâmico. As glutaminas são aminoácidos neutros, porém polares, que participam em geral de ligações de hidrogênio para estabilizar a estrutura secundária proteica. O ácido glutâmico é um aminoácido carregado negativamente, o qual participa de interações eletrostáticas na estrutura proteica secundária. O aumento do número de ácidos glutâmicos em relação ao

número de glutaminas presentes na estrutura do glúten pode levar ao aumento da repulsão eletrostática na estrutura, elevando sua abertura e aumentando a sua capacidade de ser solubilizada. Embora não haja nesse trabalho evidências experimentais de que as reações de desamidação não tenham ocorrido, as supostas modificações que causariam à proteína podem ser um indício que venha a justificar o efeito sinérgico observado entre a quantidade de enzima adicionada à massa e o pH do tampão. Outro fato que pode reforçar esta suposição é o da proporção entre glutaminas residuais e lisinas presentes na farinha de trigo ser elevada (**Tabela II-1**).

II.4.1.2.2. Perfil eletroforético das proteínas da massa de farinha de trigo mole tratadas com TGase (SDS-PAGE)

As proteínas das massas de farinha de trigo mole de cada ensaio foram extraídas em tampão Laemmli contendo 50 mmol.L⁻¹ de DTT e aplicadas ao gel de poliacrilamida 10% em condições reduzidas, conforme descrito no item II.3.3.2.5. A **Figura II-13** apresenta o perfil eletroforético das proteínas extraídas das massas de farinha de trigo mole para os ensaios do planejamento fatorial 2³.

A linha P corresponde aos padrões de massa molecular. As linhas numeradas correspondem aos experimentos do planejamento fatorial 2³ sendo que o ponto central foi representado pelo ensaio 9.

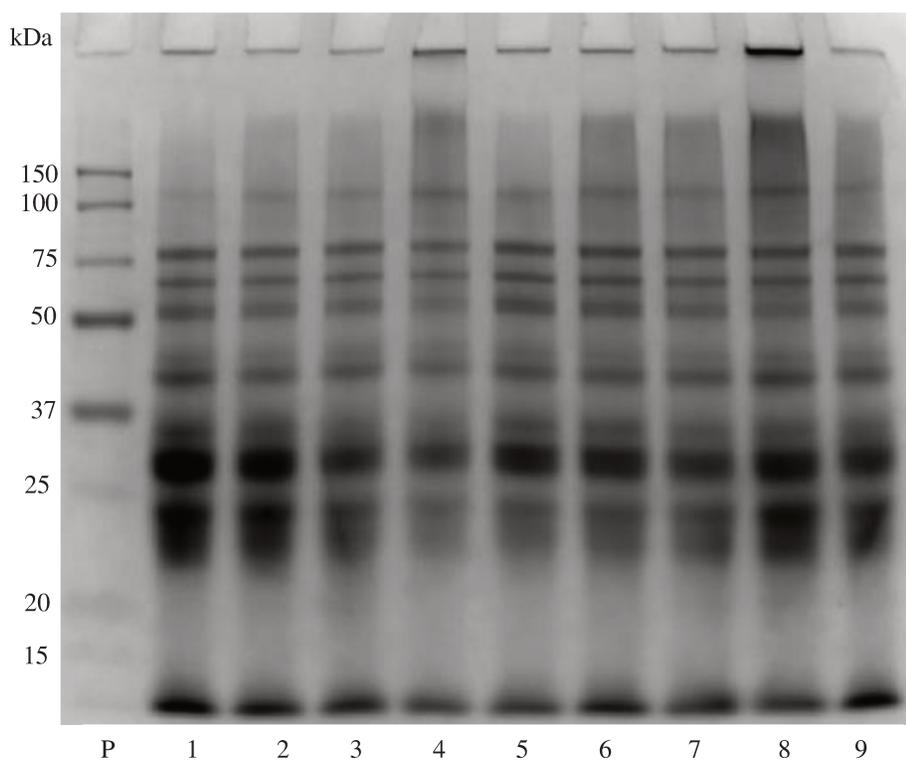


Figura II-13 – SDS-PAGE das proteínas das massas de farinha de trigo mole para cada ensaio do delineamento fatorial 2³.

Nas amostras das linhas 4 e 8 do gel, observou-se a redução da intensidade das bandas de 50 kDa e um aumento nas bandas de 100 kDa em comparação às demais massas.

Outro fato importante observado nessas amostras foi o grande acúmulo de proteínas na parte superior do gel que não o permearam, sendo a banda mais intensa para o ensaio 8. Este fato sugere que no ensaio 8, em que foi utilizada temperatura de mistura e descanso mais elevada (37°C), houve maior formação de proteínas de alta massa molecular, que não permeou no gel, comparado com o ensaio 4, em que foi usada temperatura de 30°C para mistura e descanso da massa de farinha de trigo mole.

Assim, essas massas apresentaram maior quantidade de proteínas de alta massa molecular, fato que vem a sustentar as hipóteses sugeridas nas análises

de textura de que o aumento da força da rede de glúten estaria relacionado ao aumento da aglomeração proteica ou da massa molecular das proteínas.

Autio et al. (2005) observaram que a fração de glutenina, extraída da farinha de trigo com 13,7% de proteínas, foram altamente polimerizadas pelo tratamento com TGase sendo que as bandas observadas entre 66 e 120 kDa não foram mais observadas utilizando-se elevadas quantidades da enzima.

II.4.1.2.3. Avaliação da estrutura secundária das proteínas das massas de farinha de trigo mole tratada com TGase por espectroscopia por infravermelho (EIVTF)

A estrutura secundária das proteínas das amostras das massas de farinha de trigo mole foi estimada através da análise de espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (EIVTF). A identificação da contribuição de cada estrutura foi realizada através da área sob a curva da segunda derivada do espectro obtido na região entre 1600 e 1700 cm^{-1} que é a região do espectro relacionado aos grupos amida (região amida I) e que tem sido utilizado para determinação da estrutura secundária das proteínas (Bock & Damodaran, 2012). A **Figura II-14** apresenta a derivada segunda dos espectros (tratados de acordo com o II.3.3.2.6) obtidos para cada ensaio do planejamento fatorial 2³.

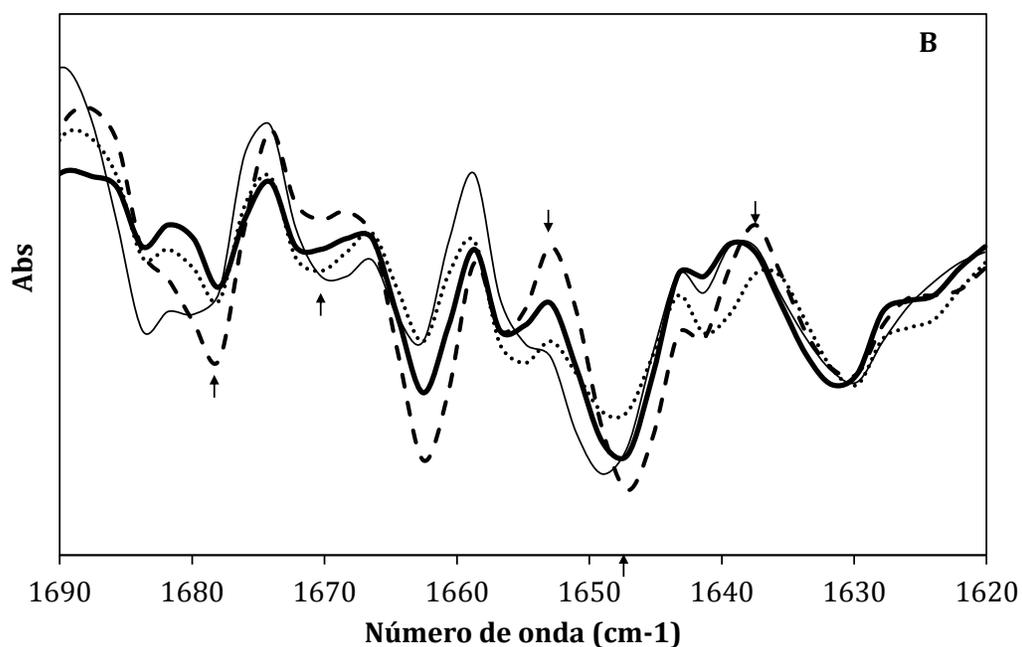
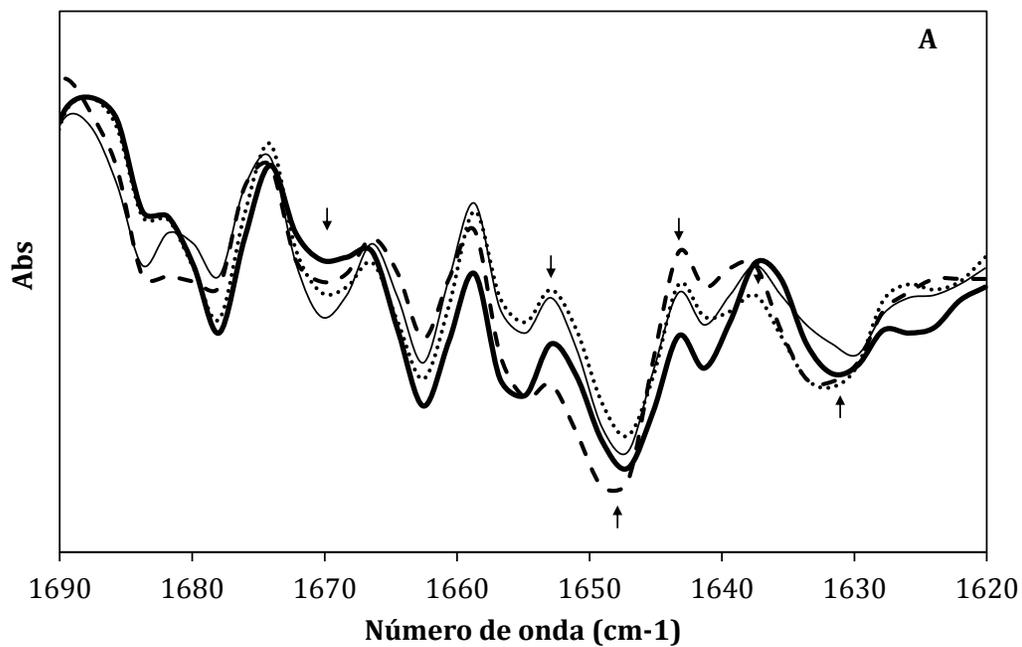


Figura II-14 - Derivada segunda dos espectros infravermelho com transformada de Fourier para as amostras de massas de farinha de trigo mole obtidas nos ensaios do delineamento fatorial 2^3 .

A **Tabela II-12** apresenta a percentagem de contribuição de cada tipo de estrutura secundária na estrutura das proteínas das amostras de massa de farinha de trigo mole do delineamento fatorial 2³.

Tabela II-12 - Percentagem de estruturas α -hélice, folhas- β , randômica e volta- β estimadas para a estrutura secundária das proteínas das massas de farinha de trigo mole do delineamento fatorial 2³

Ensaio	α-hélice (%)	folhas-β (%)	randômica (%)	volta-β (%)
1	8,71	44,78	30,94	15,57
2	13,21	46,38	29,42	10,99
3	10,45	42,14	37,50	9,92
4	7,89	49,57	27,00	15,54
5	8,88	41,06	37,45	12,61
6	10,87	43,74	34,66	10,73
7	11,92	43,82	30,75	13,52
8	10,15	50,81	29,80	9,24
9	9,42	43,87	30,97	15,74
10	9,67	47,21	33,24	9,88
11	13,53	47,00	30,17	9,31
12	10,09	45,29	31,60	13,02

A **Tabela II-13** apresenta os efeitos e p-valores de cada fator estudado na distribuição dos arranjos das proteínas em sua estrutura secundária para as massas de farinha de trigo mole.

Tabela II-13 – Efeito da quantidade de TGase, pH do tampão e temperatura na estrutura secundária das proteínas das massas de farinha de trigo mole preparadas no planejamento fatorial 2³

Fatores	α -hélice		folhas- β		randômica		voltas- β	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
Média	10,40*	<0,01	45,47*	<0,01	31,96*	<0,01	12,17*	<0,01
Enzima	0,54	0,65	4,68*	<0,01	-3,94*	0,04	-1,28	0,58
pH do tampão	-0,32	0,79	2,59*	0,04	-1,86	0,26	-0,42	0,85
Temperatura	0,40	0,74	-0,86	0,39	1,95	0,24	-1,48	0,53
Enzima x pH do tampão	-2,70*	0,06	2,53*	0,04	-1,78	0,27	1,95	0,41
Enzima x Temperatura	-0,43	0,72	0,16	0,87	2,07	0,21	-1,80	0,44
pH do tampão x Temperatura	1,47	0,25	2,32*	0,05	-3,93*	0,04	0,13	0,95
R²	0,61		0,91		0,81		0,32	

O modelo linear avaliado apresentou baixa correlação com a quantidade de estruturas do tipo volta- β , sendo capaz de representar apenas 32% da variação das respostas experimentais. O melhor coeficiente de correlação foi obtido para as estruturas do tipo folhas- β e randômica e serão as mais focadas nas discussões seguintes.

A **Figura II-14** ilustra que há grande diferença entre os espectros na região próxima ao de número de onda 1683cm⁻¹, que é atribuída a estruturas do tipo folhas- β associadas ao processo de agregação proteica.

A principal estrutura afetada pela quantidade de TGase adicionada à massa foram as folhas- β , sendo observado um aumento da quantidade dessas estruturas nas proteínas da massa com o aumento da quantidade de enzima adicionada. Observou-se também efeito significativo e negativo da quantidade de enzima nas estruturas randômicas.

A interação entre a quantidade de enzima adicionada e o pH do tampão citrato apresentou efeito significativo e negativo, a 90% de significância, sobre as estruturas α -hélice. Já nas estruturas folhas- β , o efeito foi positivo. Desta

forma a interação entre estes fatores parece interconverter estruturas α -hélice em estruturas folhas- β , o que do ponto de vista das alterações moleculares das proteínas seria plausível.

As estruturas do tipo α -hélice apresentam uma relação de contato (distância média entre todos os pares de resíduos que entram em contato, normalizada pelo comprimento total da sequência de aminoácidos da proteína) menor do que para as estruturas folhas- β . Desta forma, a estrutura folhas- β apresenta maior número de interações entre resíduos impossibilitando o giro da estrutura para formação da hélice (Whitford, 2005).

A TGase, ao catalisar reações de transaminação pode elevar o número de contatos entre os resíduos de aminoácidos, seja pela introdução da ligação cruzada ϵ -(γ -glutaminil)-lisina seja por aproximar partes da estrutura proteica após a catálise favorecendo outras interações, elevando a ordem de contato da estrutura e dificultando a manutenção da estrutura em forma de hélice. No entanto, o efeito da TGase sobre a estrutura secundária do tipo α -hélice só foi percebida em presença do tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH6,5, fato que vem a concordar com as observações anteriores de que a presença do tampão age de forma sinérgica com a TGase alterando o comportamento reológico da massa de farinha de trigo mole.

Georget & Belton (2006) observaram uma variação substancial na região do espectro de 1680 a 1655 cm^{-1} (que apresenta forte influência das estruturas folhas- β) para o glúten hidratado a 47% e termicamente tratado 25 a 85°C . No entanto, foi evidenciado efeito significativo da temperatura, dentro dos níveis avaliados (30 a 37°C), nas estruturas secundárias estudadas. A interação entre temperatura e o pH do tampão citrato adicionado elevou significativamente o número de estruturas do tipo folha- β , desta forma a temperatura dentro da faixa estudada não interferiu diretamente na estrutura proteica, no entanto

favoreceu as modificações proporcionadas pela presença do tampão citrato na massa.

II.4.2. Comparação da atuação da TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 nas proteínas da farinha de trigo mole (*Triticum aestivum*)

A atuação da enzima TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 nas proteínas da farinha de trigo mole foi comparada à atuação da enzima comercial BioBond. Dois solventes foram utilizados, a água destilada e o tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5. A água destilada foi utilizada pelo fato de que no caso da extensibilidade, que é um parâmetro de grande relevância para produtos de panificação, a enzima e tampão sozinhos não apresentam efeito significativo sobre esta resposta, no entanto a interação entre eles foi significativa. Desta forma, sem o efeito do tampão (seja devido ao valor do pH, seja devido a força iônica conferida ao sistema) será possível avaliar a atuação da enzima sozinha na massa. Baseado no delineamento fatorial discutido no item II.4.1 foram produzidas massas de farinha de trigo mole com tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5, com a adição de 8 U/g de proteína de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e BioBond. Foram produzidas duas massas controles, sendo uma composta de farinha e água destilada e outra de farinha e tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5, conforme descrito no item II.3.4.2.

II.4.2.1. Avaliação das propriedades mecânicas das massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

A **Figura II-15** ilustra as curvas obtidas nos ensaios de micro-extensão das massas preparadas. Cada curva ilustra a média das medidas realizadas (de 8 a 10 medidas para cada formulação).

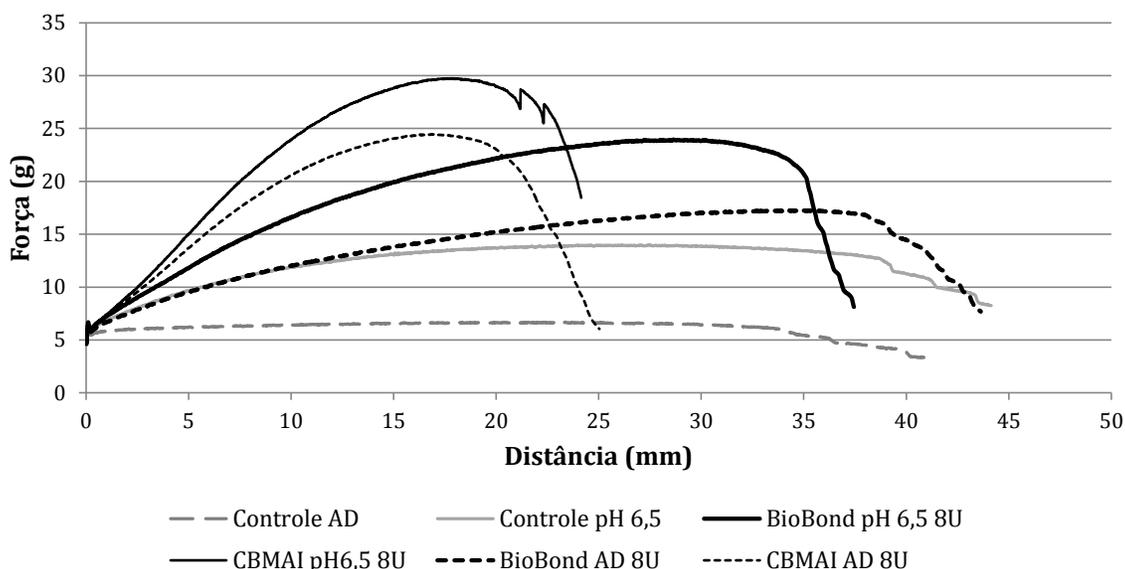


Figura II-15 - Micro-Extensogramas para as massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial (BioBond) e EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837.

A **Tabela II-14** apresenta os valores e desvios padrão para a resistência à extensão (R_m), extensibilidade (E_m), trabalho para estender a massa (A) e também para a pegajosidade das massas contendo a transglutaminase comercial (BioBond) ou EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 (CBMAI) em sistema tamponado (pH 6,5) e em presença de água destilada (AD). A comparação estatística entre as médias de cada resposta foi feita através do teste de Tukey e está representada por letras na tabela, sendo que letras iguais representam médias que não diferem estatisticamente entre si com 90% de confiança.

Tabela II-14 – Resistência à extensão (R_m), máxima extensão (E_m) e o trabalho realizado (g.mm) para massas de farinha de trigo mole formuladas com TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e com TGase comercial.

Amostra	R_m (g)	E_m(mm)	A (g.mm)
Controle AD	6,85 ± 0,29 ^e	38,36 ± 2,33 ^{bc}	253,22 ± 21,78 ^e
Controle pH6,5	13,97 ± 1,24 ^d	43,87 ± 3,68 ^a	564,28 ± 57,27 ^c
CBMAI AD 8U	24,48 ± 1,49 ^b	25,71 ± 1,68 ^d	443,65 ± 43,73 ^d
BioBond AD 8U	17,51 ± 0,79 ^c	40,58 ± 1,21 ^b	611,62 ± 39,40 ^b
CBMAI pH6,5 8U	30,01 ± 1,50 ^a	24,54 ± 0,31 ^d	542,17 ± 45,30 ^c
BioBond pH6,5 8U	24,07 ± 2,00 ^b	35,92 ± 0,74 ^c	701,90 ± 52,63 ^a

A resistência à extensão da massa preparada apenas com água destilada (Controle AD) foi significativamente inferior a das demais massas. A substituição da água destilada pela solução tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5 elevou significativamente a força da rede de glúten da massa, reforçando a discussão do item II.4.1 de que as características da massa de farinha de trigo mole em pH acima do ponto isoelétrico das proteínas do glúten e a força iônica introduzida pela solução tampão alteram as interações intra e intermoleculares, estabilizando e reforçando a rede de glúten.

A TGase comercial BioBond elevou a R_m da massa tamponada e não tamponada, sendo que seu efeito foi mais pronunciado em pH 6,5. O mesmo foi observado quando a massa foi produzida com a TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, no entanto, a R_m foi significativamente maior que o resultado apresentado pela enzima comercial nas mesmas condições de processo.

Em relação à extensibilidade máxima (E_m) o extrato enzimático contendo TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 reduziu significativamente a extensibilidade da massa quando comparada à aplicação da formulação comercial e aos controles sem enzima.

As massas de farinha de trigo mole preparadas com a TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 apresentaram extensibilidade inferior à massa

controle preparada apenas com água destilada ou tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5, sem no entanto haver diferença significativa entre as massas com enzima mais tampão e com enzima sem tampão. Os resultados obtidos com a enzima comercial foram diferentes, uma vez que a massa apresentou extensibilidade similar aos controles. A massa contendo a enzima BioBond e tampão apresentou a mesma extensibilidade do controle preparado com água destilada, no entanto ela foi mais resistente à extensão, sendo que o aumento da R_m sem perdas na E_m é um indicativo de melhoria da farinha de trigo mole e elevando a abrangência de aplicações industriais.

As áreas sob a curva força versus distância da **Figura II-15** representam o trabalho necessário para estender a massa, indicando que de modo geral a aplicação de TGase à massa de farinha de trigo mole eleva o valor de A significativamente em relação à massa controle feita com água destilada.

A maior intensidade no aumento da R_m e na redução de E_m observada na aplicação do extrato de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 pode estar relacionado ao fato do extrato bruto conter outras substâncias que podem influenciar na atuação da enzima ou mesmo na interação entre as proteínas do glúten.

A **Tabela II-15** apresenta os valores e desvios padrões para a pegajosidade das massas formuladas com tampão e TGase em comparação com as massas formuladas sem enzima.

Tabela II-15 – Pegajosidade (g) das massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

Amostra	Pegajosidade (g)
Controle AD	67,60 ± 10,70 ^a
Controle pH6,5	56,69 ± 4,79 ^b
CBMAI pH6,5 8U	50,99 ± 5,11 ^{bc}
BioBond pH6,5 8U	44,68 ± 4,84 ^c

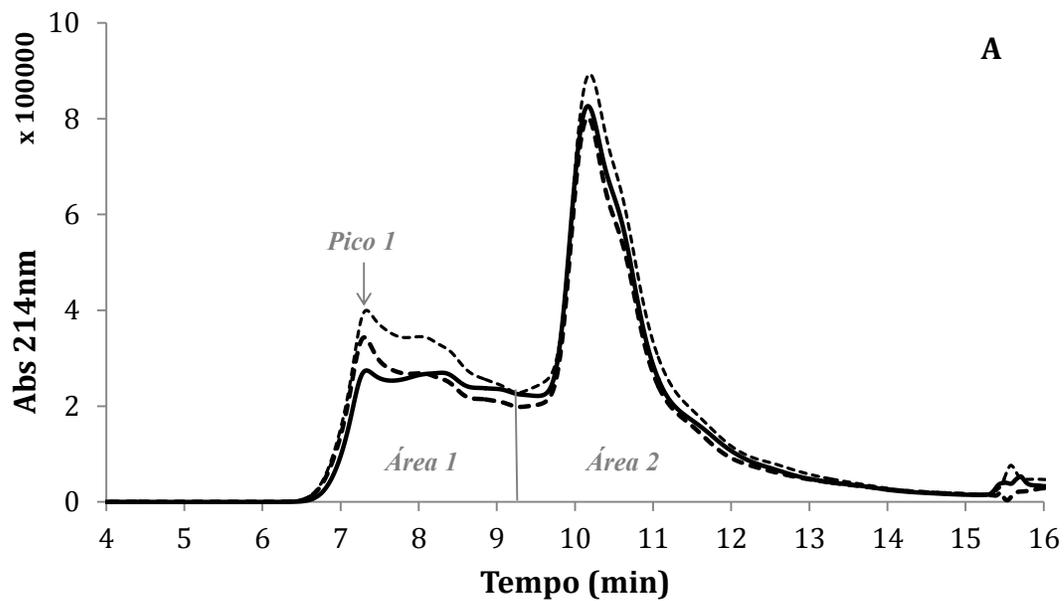
A massa controle formulada com água destilada apresentou pegajosidade elevada em comparação às demais. A substituição da água por tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5 reduziu significativamente esta característica assim como o fez a adição de TGase. Não houve diferença significativa entre as duas enzimas estudadas.

Conforme discutido anteriormente, a pegajosidade é uma característica importante para a indústria de panificação e cereais, sendo que massas muito pegajosas aderem aos equipamentos, elevando as perdas de processo e dificultando a manipulação e limpeza. Desta forma, a TGase é uma enzima que pode ser aplicada para a melhoria da maquineabilidade de massas produzidas com farinhas de trigo mole ou farinhas com características pegajosas (Ribotta et al., 2010).

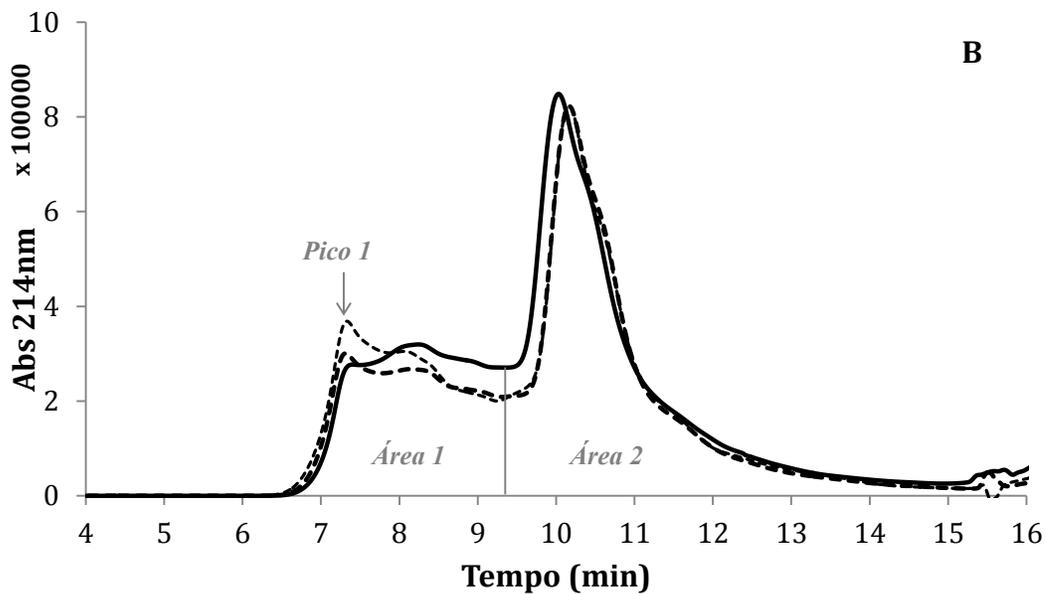
II.4.2.2. Avaliação bioquímica das massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

II.4.2.2.1. Avaliação da solubilidade das proteínas e glúten presentes nas massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

A solubilidade das proteínas do glúten (em tampão fosfato pH 6,8 com 2% m/v de SDS) das massas preparadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foram estimadas por meio das áreas do cromatograma de exclusão molecular de cada amostra. A **Figura II-16** ilustra os cromatogramas de cada amostra. A divisão das áreas apresentada na figura é ilustrativa, não representando os valores reais para cada área.



----- Controle AD - - - - BioBond AD 8U ——— CBMAI AD 8U



----- Controle pH6,5 - - - - BioBond pH6,5 8U ——— CBMAI pH6,5 8U

Figura II-16 - Cromatogramas de exclusão molecular para as proteínas extraídas das massas de farinha de trigo mole preparadas sem e com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 (A) em água destilada (B) em tampão citrato 0,05M pH6,5

A **Tabela II-16** apresenta os valores para a área total e a área relativa a cada fração identificada nos cromatogramas (Área 1 e Área 2) e os desvios. As extrações foram efetuadas em duplicata para cada amostra.

Tabela II-16 - Áreas estimadas sob as curvas da cromatografia de exclusão molecular para as proteínas extraídas das massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

Amostra	Área total (x 10000)	Área 1 (x 10000)	Área 2 (x 10000)
Controle AD	12308,71 ± 396,71 ^a	4593,83 ± 98,65 ^a	7714,88 ± 298,07 ^a
BioBond AD 8U	9869,14 ± 495,03 ^b	3630,42 ± 319,03 ^b	6238,73 ± 176,00 ^b
CBMAI AD 8U	10068,90 ± 92,49 ^b	3764,23 ± 168,81 ^b	6304,68 ± 8,60 ^b
Controle pH6,5	10522,98 ± 639,06 ^A	3738,52 ± 229,82 ^A	6784,45 ± 409,24 ^A
BioBond pH6,5 8U	10040,57 ± 285,56 ^A	3603,18 ± 155,39 ^A	6437,39 ± 130,16 ^A
CBMAI pH6,5 8U	10989,72 ± 425,18 ^A	4058,34 ± 168,81 ^A	6931,38 ± 256,37 ^A

Os dados foram agrupados de acordo com o solvente utilizado para o preparo da cada massa. As letras na **Tabela II-16** indicam essa comparação pelo teste de Tukey a 90% de confiança.

A aplicação da TGase nas massas de farinha de trigo mole formuladas com água destilada levou a redução significativa das proteínas extraídas da massa em presença de SDS, sendo que na fração representada pela Área 1 houve uma redução de cerca de 20% e na Área 2 cerca de 29%. Não houve diferença significativa entre a ação da TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 para estes parâmetros.

A aplicação da enzima nas massas de farinha de trigo mole formuladas com tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5 não levou a alterações significativas na quantidade de proteína extraída da massa. Ao observarmos os resultados do item II.4.1.2 verificou-se efeito positivo e significativo da interação entre pH e enzima bem como efeitos negativos e significativos entre a atuação individual

da enzima e do pH utilizado. Desta forma, os efeitos individuais e da interação entre a quantidade de enzima de 8 U/g de proteína e o pH 6,5 do tampão podem ser complementares, não permitindo diferenciar os resultados apresentados para extração das proteínas. Outro fato importante é que o método cromatográfico, realizado em duplicatas, apresentou elevado desvio, o que dificulta identificar diferença entre as amostras.

Embora a comparação matemática dos valores não tenha permitido a distinção entre alguns resultados, ao se observar os cromatogramas, notou-se uma tendência à redução do pico 1 (seta indicativa na **Figura II-16**) com a aplicação da TGase, não sendo verificadas grandes diferenças entre as duas enzimas utilizadas no estudo.

II.4.2.2.2. Perfil eletroforético das proteínas das massas de farinha de trigo mole tratadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 (SDS-PAGE)

A **Figura II-17** apresenta o perfil eletroforético das proteínas das massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, de cada ensaio, extraídas em tampão Laemmli contendo 50 mmol.L⁻¹ de DTT e aplicadas ao gel de poliacrilamida 10% em condições reduzidas.

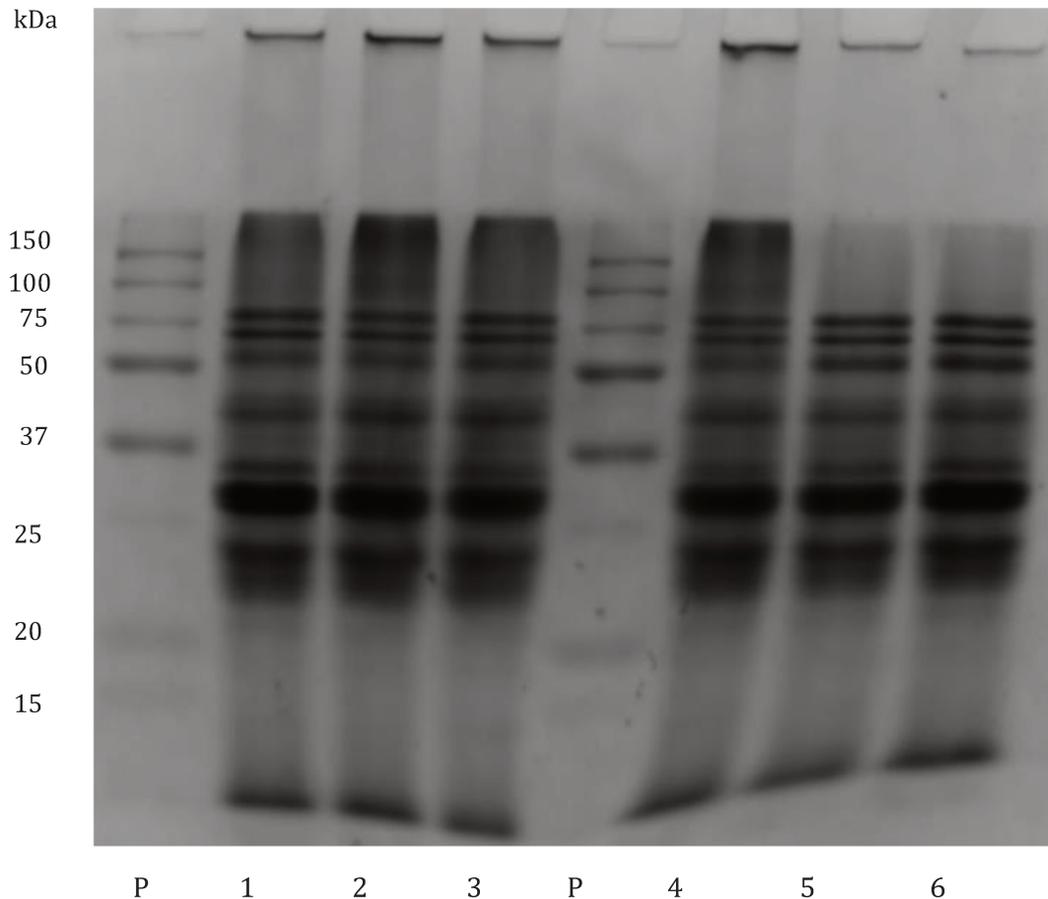


Figura II-17 – SDS-PAGE das proteínas das massas de farinha de trigo mole. Coluna 1 – CBMAI AD 8U; Coluna 2 – CBMAI pH6,5 8U; Coluna 3 – BioBond AD 8U; Coluna 4 – BioBond pH6,5 8U, Coluna 5 – Controle AD; Coluna 6 – Controle pH6,5, Coluna P – Padrões de massa molecular (10 – 250kDa).

As amostras controle formuladas com água destilada (Coluna 5) e tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 (coluna 6) apresentaram perfis eletroforéticos das proteínas similares.

Todas as amostras de massa formuladas com TGase apresentaram na parte superior do gel um elevado acúmulo de proteínas que não permearam o gel 4% de poliacrilamida, indicando a formação de proteínas de alta massa molecular. Foi observado também aumento da intensidade da coloração na região de massa molecular de 100 – 150 kDa, em especial nas colunas 2 e 4.

De forma similar ao observado no item II.4.1.2.2 as bandas correspondentes a massa molecular de 50 kDA apresentaram intensidade inferior para as 4 amostras tratadas com a enzima quando comparadas com os controles.

Pelos perfis apresentados no gel não foi possível encontrar grandes diferenças entre as proteínas das massas de farinha de trigo mole formuladas com a TGase comercial e com o extrato enzimático bruto de *Streptomyces* sp. CBMAI-837.

II.4.2.2.3. Avaliação da estrutura secundária das proteínas das massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 por espectroscopia por infravermelho (EIVTF)

De forma similar ao descrito no item II.4.1.2.3, a estrutura secundária das proteínas das massas foi investigada através da análise dos espectros de infravermelho com transformada de Fourier, porém neste caso as amostras foram avaliadas em sua forma liofilizada. A avaliação do espectro das amostras desidratadas difere das amostras hidratadas devido às interações entre solvente e proteínas que interferem significativamente nas intensidades e número de onda dos picos de absorção do infravermelho (Georget & Belton, 2006).

Como os espectros foram muito influenciados pelo tipo de solvente utilizado no preparo da massa, provavelmente pela presença dos componentes do tampão nas amostras com ele formuladas, os dados foram agrupados por solvente. A **Figura II-18** ilustra a derivada segunda dos espectros para cada massa e as curvas foram apresentadas de forma sobreposta para facilitar a visualização dos deslocamentos dos picos.

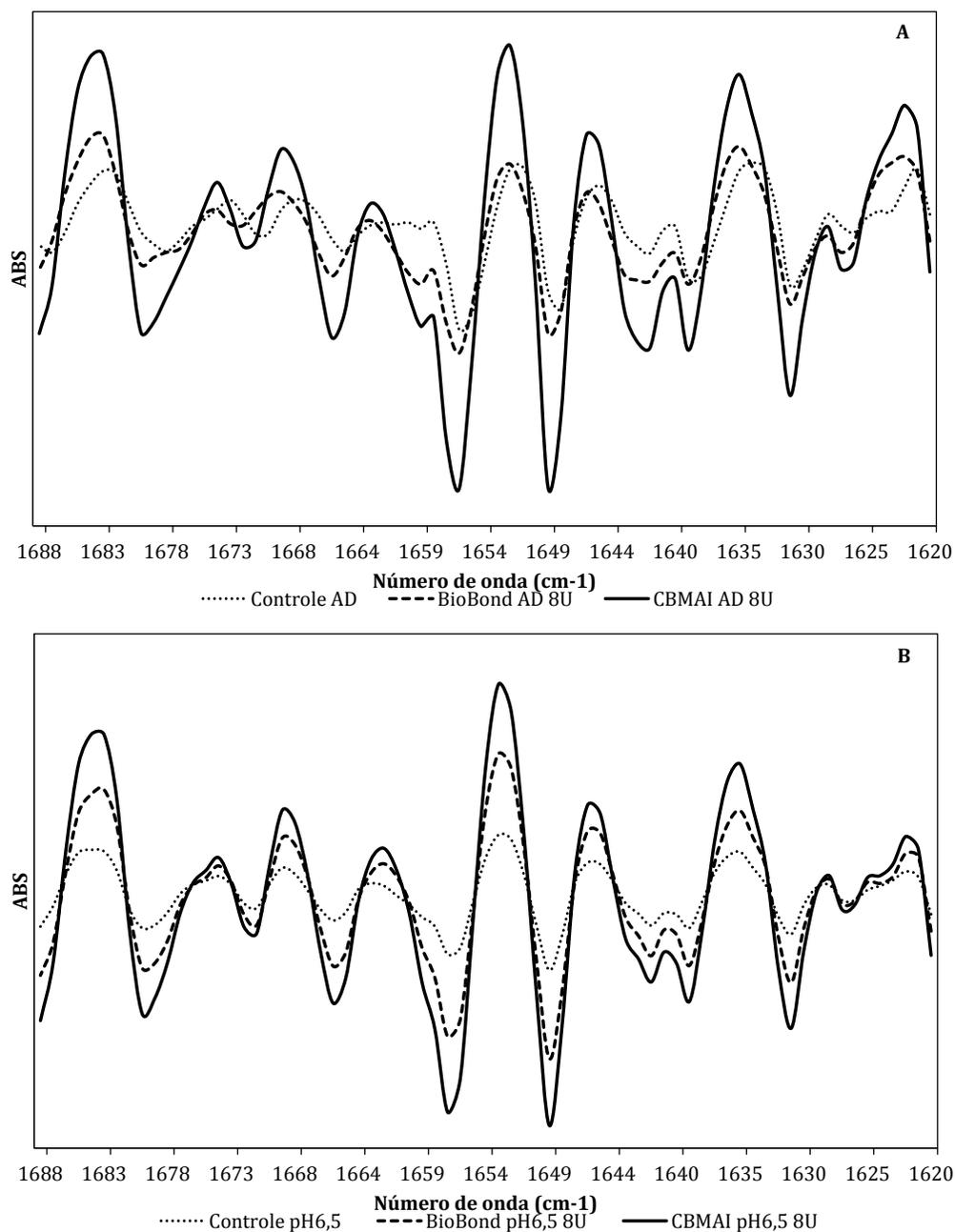


Figura II-18 - Derivada segunda dos espectros infravermelho com transformada de Fourier para as massas de farinha de trigo mole tratadas com TGase comercial BioBond e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 (A) preparadas com água destilada (B) preparadas com tampão citrato 0,05M pH6,5.

As amostras de farinha de trigo mole formuladas com o tampão citrato 0,05M pH6,5 apresentaram derivadas segundas do espectro muito similares.

Foi observado um deslocamento da curva na região entre os números de onda 1645 e 1640 cm^{-1} , sendo que a amostra contendo a enzima de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 os picos foram menos intensos e mais amplos. Analisando-se a região próxima a 1658 cm^{-1} , pode-se supor que o efeito dos componentes do tampão nos espectros pode ter se sobreposto às diferenças entre as amostras dificultando a análise de EIVTF.

Para as amostras formuladas com água destilada, as curvas das derivadas segundas são muito diferentes entre as amostras, com deslocamento significativos de alguns picos como é o caso dos picos entre 1659 e 1654 cm^{-1} , entre 1668 e 1664 cm^{-1} e entre 1628 e 1626 cm^{-1} .

As áreas dos picos das derivadas segundas foram calculadas a fim de se estimar a percentagem de cada estrutura secundária (**Tabela II-17**).

Tabela II-17 – Percentagem de estruturas α -hélice, folhas- β , randômica e volta- β estimadas para a estrutura secundária das proteínas das massas de farinha de trigo mole formuladas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

Amostra	α -hélice (%)	folhas- β (%)	randômica (%)	volta- β (%)
Controle AD	20,66 \pm 0,30 ^b	44,30 \pm 0,04 ^B	22,42 \pm 0,19 ^B	12,63 \pm 0,08 ^C
BioBond AD 8U	16,08 \pm 0,16 ^a	44,82 \pm 0,02 ^A	13,22 \pm 0,01 ^C	25,89 \pm 0,18 ^A
CBMAI AD 8U	19,79 \pm 0,42 ^c	38,80 \pm 0,01 ^C	24,32 \pm 0,50 ^A	17,08 \pm 0,07 ^B
Controle pH6,5	20,64 \pm 0,22 ^b	39,04 \pm 0,08 ^a	23,51 \pm 0,38 ^a	16,81 \pm 0,08 ^c
BioBond pH6,58U	23,41 \pm 0,24 ^a	32,59 \pm 0,23 ^b	22,80 \pm 0,40 ^a	21,20 \pm 0,05 ^a
CBMAI pH6,5 8U	23,10 \pm 0,24 ^a	38,78 \pm 0,29 ^a	18,96 \pm 0,07 ^b	19,17 \pm 0,12 ^b

A **Tabela II-18** apresenta os números de onda para os principais picos de cada grupo de estrutura secundária.

Tabela II-18 – Número de onda (cm⁻¹) dos principais picos encontrados nas curvas da derivada segunda dos espectros infravermelhos com transformada de Fourier

	α -hélice	folhas- β	randômica	volta- β
Controle AD	1656,09	1623,17	1648,37	1665,60
BioBond AD 8U	1657,05	1630,88	1650,31	1665,60
CBMAI AD 8U	1656,09	1630,88	1649,34	1665,60
Controle pH6,5	1656,09	1634,70	1649,20	1664,77
BioBond pH6,58U	1656,92	1630,90	1649,20	1658,98
CBMAI pH6,5 8U	1656,92	1634,70	1649,20	1665,74

A presença de tampão na massa de farinha de trigo mole causou o deslocamento do pico atribuído às estruturas do tipo folhas- β em -9 cm^{-1} . As duas transglutaminases avaliadas, quando presentes na massa formulada com água destilada, deslocaram o número de onda em 7 cm^{-1} , enquanto que para as massas formuladas com tampão citrato $0,05\text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5, apenas as amostras contendo a enzima BioBond deslocou a posição do espectro.

Quanto às estruturas do tipo volta- β , a adição da TGase (comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837) à massa formulada com água destilada não provocou o deslocamento do espectro. No entanto analisando-se a área do espectros verificou-se que esta banda ($1658\text{ a }1673\text{cm}^{-1}$) é maior para a amostra tratada com a enzima BioBond e com a enzima de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, embora o efeito desta última tenha sido inferior ao observado para a enzima comercial. O uso do tampão citrato $0,05\text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 na formulação da massa provocou o deslocamento do pico para a massa formulada com a enzima BioBond de cerca de 6 cm^{-1} , já para a enzima de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 deslocou o pico em -1cm^{-1} . O comportamento das áreas foi similar ao discutido para a massa formulada com água destilada.

Observou-se que a amostra formulada com o EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em água ou em tampão foram muito similares, o que não ocorreu para as amostras controle e formuladas com a enzima comercial BioBond. Este

fato pode ter ocorrido devido à presença de sais no extrato enzimático que podem interferir e acentuar a modificação das proteínas e, conseqüentemente, o espectro.

De modo geral a TGase alterou a estrutura secundária das proteínas do glúten tanto para as massas de farinha de trigo mole formuladas com tampão quanto com água destilada.

II.4.2.2.4. Hidrofobicidade de superfície das proteínas das massas de farinha de trigo mole preparadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

A **Figura II-19** ilustra os espectros de emissão de fluorescência na região de 400 a 600nm das proteínas ligadas à sonda de fluorescência ANS, das amostras das massas de farinha de trigo mole, tratadas com TGase comercial BioBond e EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837. As massas liofilizadas de cada amostra foram hidratadas com água destilada e com soluções de ANS de 0,05 0,05 mol.L⁻¹ a 0,4 mol.L⁻¹ para estudo da hidrofobicidade de superfície das proteínas do glúten.

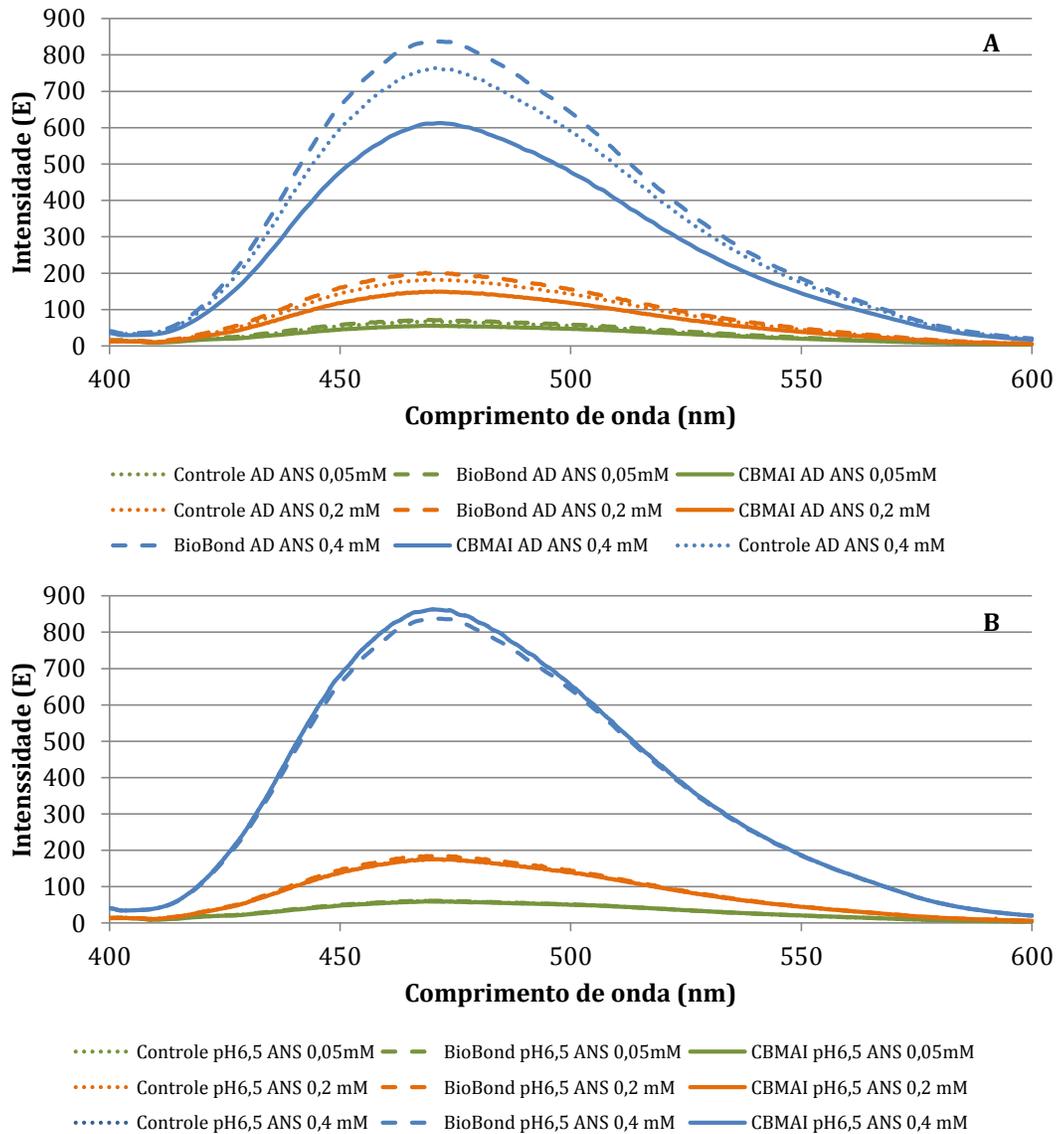


Figura II-19 - Espectro de fluorescência das proteínas do glúten (ligadas a sonda de fluorescência ANS) das massas de farinha de trigo mole tratadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 (A) e água destilada; (B) e tampão citrato 0,05M pH6,5.

Os comprimentos de onda nos quais foram observadas as maiores intensidades de emissão, em média, foram a 470 nm sendo que não houve diferença significativa a 90% de confiança entre as amostras. A **Figura II-20** apresenta os valores da intensidade da emissão (em unidades arbitrárias) observados no comprimento de onda de 470 nm para cada concentração de

ANS nas massas de farinha de trigo mole tratadas com TGase comercial BioBond e EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 preparadas com água destilada ou com solução tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5.

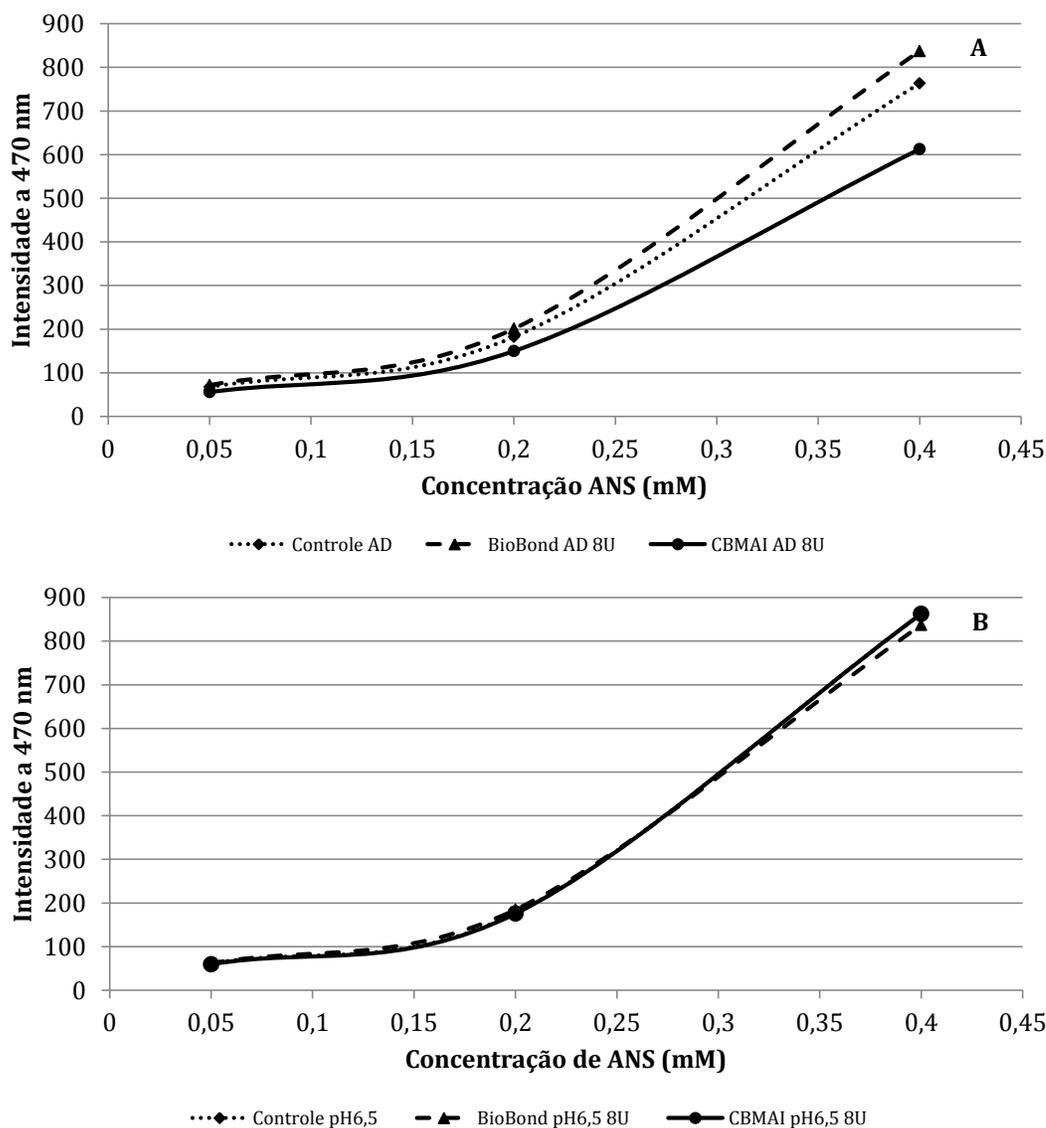


Figura II-20 - Intensidade de emissão a 470nm para as diferentes concentrações de ANS adicionadas às massas de farinha de trigo mole formuladas com TGase comercial BioBond e EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837(A) com água destilada e (B) com tampão citrato 0,05M pH6,5

O perfil dos espectros de emissão das amostras de massa de farinha de trigo mole formuladas com tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 diferiram das amostras formuladas com água destilada, no sentido de que todas as amostras formuladas com tampão não diferiram significativamente em termos de intensidade máxima e comprimento de onda da máxima intensidade de emissão. Desta forma, não se observou efeito da TGase nos sítios hidrofóbicos das proteínas do glúten para massas formuladas com o tampão ou o efeito do tampão se sobrepôs ao da TGase.

Nas amostras formuladas com água destilada, observou-se que a amostra que continha TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 apresentou a intensidade da emissão máxima a 470 nm inferior à apresentada para a amostra controle e formulada com TGase BioBond.

O extrato enzimático bruto de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 reduziu a intensidade de emissão à 470nm tanto para concentração de $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ de ANS (relacionada a constante de dissociação da proteína-sonda e indicando uma menor afinidade dos sítios hidrofóbicos na superfície da proteína pela sonda) quanto para a concentração de $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ (indicando baixa quantidade de sítios hidrofóbicos disponíveis na superfície da proteína) em comparação ao controle e à amostra com TGase comercial.

Diante destas observações, duas hipóteses podem ser consideradas. A primeira seria que o extrato enzimático bruto de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 atuaria nas proteínas do glúten escondendo os sítios hidrofóbicos dentro da rede proteica. A segunda seria o fato da elevada exposição de grupos hidrofóbicos na superfície promover o agrupamento proteico via interações hidrofóbicas, e neste caso a coerência com os resultados apresentados pela análise de solubilidade das proteínas em SDS seria maior, uma vez que a solubilidade das amostras tratadas com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foi estatisticamente igual (90% de confiança). Há também maior

coerência com os resultados apresentados na análise de resistência à extensão da massa (R_m) uma vez que o aumento da agregação proteica promove o aumento da força da rede de glúten (Delcour et al., 2012).

Renzetti et al. (2012) observaram comportamento similar para as proteínas da farinha de arroz integral tratadas com transglutaminase em um sistema semilíquido. A intensidade de emissão máxima foi reduzida, indicando menor exposição dos resíduos hidrofóbicos em relação ao controle. Essa redução foi relacionada ao aumento das interações hidrofóbicas entre as proteínas.

Hu et al. (2011) observaram que as proteínas isoladas de amendoim tratadas com transglutaminase microbiana tiveram a quantidade de grupos hidrofóbicos na superfície das proteínas elevados em relação ao controle o que conduziu a modificações na estrutura secundária das proteínas.

II.4.2.3. Avaliação da adição de TGase na produção de pão de forma de farinha de trigo mole

A análise de perfil de textura (TPA) foi conduzida para avaliação dos pães formulados com TGase (comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837). Pães formulados com farinha de trigo duro foram utilizados como forma de comparação dos resultados obtidos com a farinha de trigo mole, não indicada para o preparo de pães. Os dados foram agrupados pelo tipo de solvente utilizado no preparo da massa do pão.

A **Figura II-21** ilustra o interior dos pães formulados com farinha de trigo mole e água destilada em três volumes distintos (53%, 56% e 59%) com a adição de TGase comercial BioBond e EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e os respectivos controles sem a adição de enzimas.

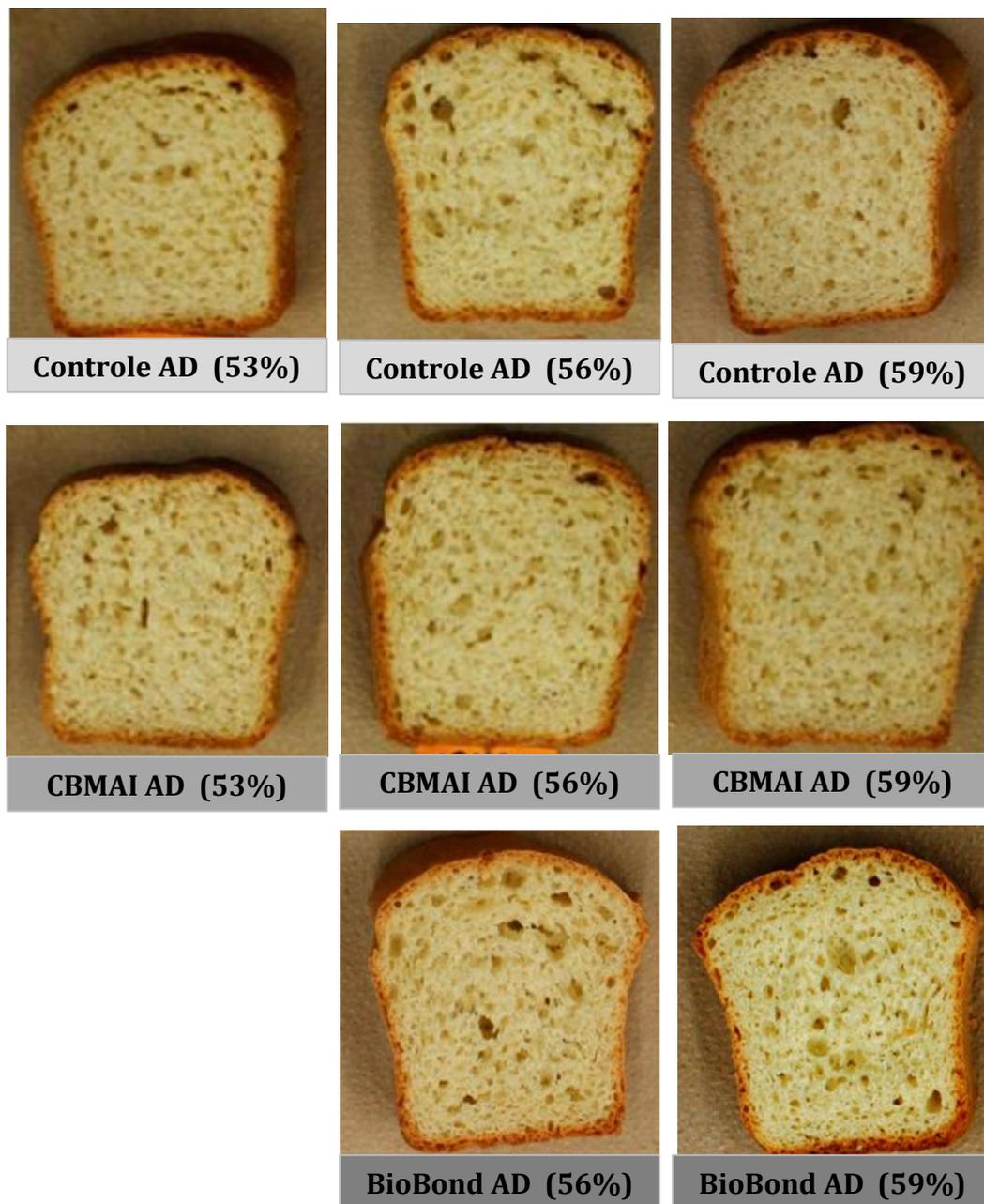


Figura II-21 - Fatia central dos pães de forma formulados com farinha de trigo mole e água destilada na presença de TGase comercial Biobond e EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

A **Figura II-22** apresenta os valores médios dos parâmetros de textura avaliados para cada amostra de pão formuladas com água destilada (AD) na presença de TGase comercial (BioBond) ou extrato bruto liofilizado de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 (CBMAI). As amostras formuladas com água

destilada foram comparadas entre si através do teste de Tukey (90% de confiança). O resultado do teste de Tukey está representado pelas letras dentro das figuras. A amostra do pão preparado com TGase comercial BioBond com 53% de água destilada foi danificada e não pode ser avaliada.

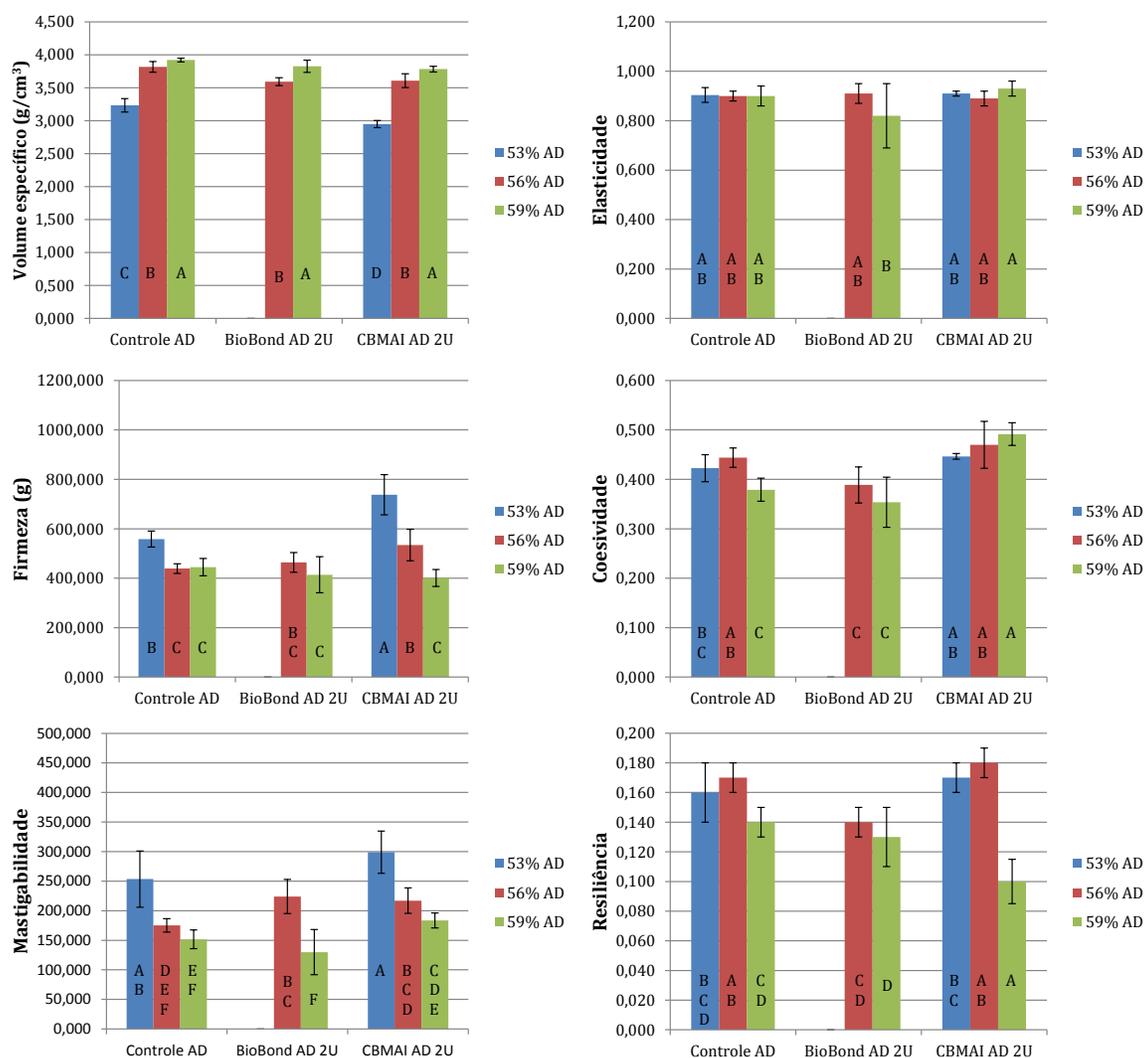


Figura II-22 – Volume específico e resultados da análise de textura (TPA) para os pães formulados com farinha de trigo mole e com TGase (comercial ou de *Streptomyces* sp. CBMAI-837) em presença de água destilada (pH5,0).

Com relação aos pães formulados com água destilada, observou-se que para a adição da quantidade de água sugerida pelo farinograma como absorção

da farinha (53%) a enzima de *Streptomyces* sp CBMAI-837 provocou a redução do volume dos pães em 9%. Relatos na literatura indicam que a TGase microbiana reduz o volume de pães de farinha de trigo dependendo das condições de aplicação (Basman et al., 2002; Bauer et al., 2003b).

No entanto ao se elevar a quantidade de água adicionada na formulação, foi observado o aumento do volume específico dos pães o qual foi estatisticamente equiparável aos volumes controle, não havendo diferenças significativas entre os pães formulados com TGase BioBond e EEBC para as mesmas quantidades de água destilada adicionada. Para os níveis de água adicionada à mistura, o simples aumento da quantidade foi suficiente para elevar o volume dos pães.

Autio et al. (2005), utilizando delineamento fatorial, observaram que o aumento da quantidade de água adicionada à massa em relação ao indicado pelo farinograma (10% a mais) provocou o aumento do volume dos pães formulados com TGase microbiana em baixas concentrações, sendo que a água sozinha não apresentou efeito no volume específico dos pães.

Desta forma, o aumento da quantidade de água na massa elimina o efeito negativo da TGase no volume final dos pães. Uma possível explicação para este fato é que a introdução de ligações cruzadas ϵ -(γ -glutaminil)-lisina modifica a temperatura de transição vítrea (T_g) da rede de glúten, o que reflete na baixa mobilidade molecular das proteínas e a perda de elasticidade (Verbeek & Berg, 2009). No entanto, o aumento da quantidade de água na massa pode, geralmente, reduzir a T_g fazendo com que o polímero recupere suas características elastoméricas (Deulcor et al. 2012).

Com relação à firmeza dos miolos a adição de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 elevou significativamente este parâmetro para as massas com 53% de água. Isso significa que é necessária maior força para comprimir o miolo do pão entre os dentes molares. A adição de água resultou na redução da firmeza

das amostras sendo que com 59% de água as formulações com enzima (comercial ou de *Streptomyces* sp. CBMAI-837) foram estatisticamente iguais ao padrão.

De forma geral não foram evidenciadas alterações significativas entre as amostras formuladas com ou sem TGase, para cada quantidade de água adicionada, no que diz respeito à mastigabilidade das amostras.

A elasticidade do miolo dos pães foi pouco afetada pela quantidade de água presente nas formulações, no entanto, houve diferença significativa entre as amostras formuladas com 59% de água e com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, sendo que a adição da enzima BioBond resultou em redução da elasticidade do miolo.

Com relação à coesividade dos miolos das amostras, que se refere ao quanto um material pode ser deformado antes da ruptura, observou-se que para a amostra controle houve a redução do parâmetro quando se adicionou 59% de água na formulação. A adição de BioBond reduziu a coesividade da massa com 56% de água em relação à amostra controle, a qual apresentou valor estatisticamente igual à amostra controle com 59% de água. As amostras que continham TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 apresentaram a mesma coesividade independentemente da quantidade de água adicionada na massa, no entanto, apresentaram os maiores valores de coesividade. Desta forma, o efeito da TGase BioBond e da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foram diferentes quanto à coesividade, no entanto pouca diferença foi observada em relação às amostras controle. Autio et al. (2005) observaram que as proteínas do miolo de pães formulados com TGase apresentaram mais interações entre as fibras o que melhorou o desenvolvimento da rede de glúten.

Quanto à resiliência, que diz respeito a como uma amostra se recupera da deformação sofrida, foi observado que as amostras formuladas com TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 apresentaram uma tendência à serem mais

resilientes com o aumento do teor de água adicionado na massa, o que não foi observado para as amostras controle e adicionadas de TGase BioBond nas quais a tendência foi de redução com o aumento da quantidade de água. Desta forma, embora as diferenças estatísticas entre as médias de cada amostra não tenha sido grande, observou-se que há a tendência da TGase BioBond e da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 atuarem de forma distinta na resiliência do miolo dos pães em relação à quantidade de água adicionada.

De forma geral, a adição de TGase na formulação de pães de farinha de trigo mole na quantidade de 2U/g de proteína influenciou negativamente o seu volume específico, fato que pode ser superado com a uso de 3% a mais de água na fórmula. Em relação aos parâmetros de textura, pouca diferença foi observada entre as amostras controle e as amostras adicionadas de TGase. Com relação à firmeza e mastigabilidade, a enzima comercial e a de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 apresentaram tendências similares. Para elasticidade, coesividade e resiliência, as tendências foram inversas com o aumento da quantidade de água na mistura.

Basman et al. (2002) observaram que a adição de baixas dosagens de TGase (0,5% m/m) microbiana à formulação de pães com farinha de trigo mole reduziram a firmeza dos miolos e elevaram o volume dos pães em relação ao controle sem enzima.

A **Figura II-23** ilustra o interior dos pães formulados com farinha de trigo mole e tampão citrato em três volumes distintos (53%, 56% e 59%) com a adição de TGase comercial BioBond e EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e os respectivos controles sem a adição de enzimas.

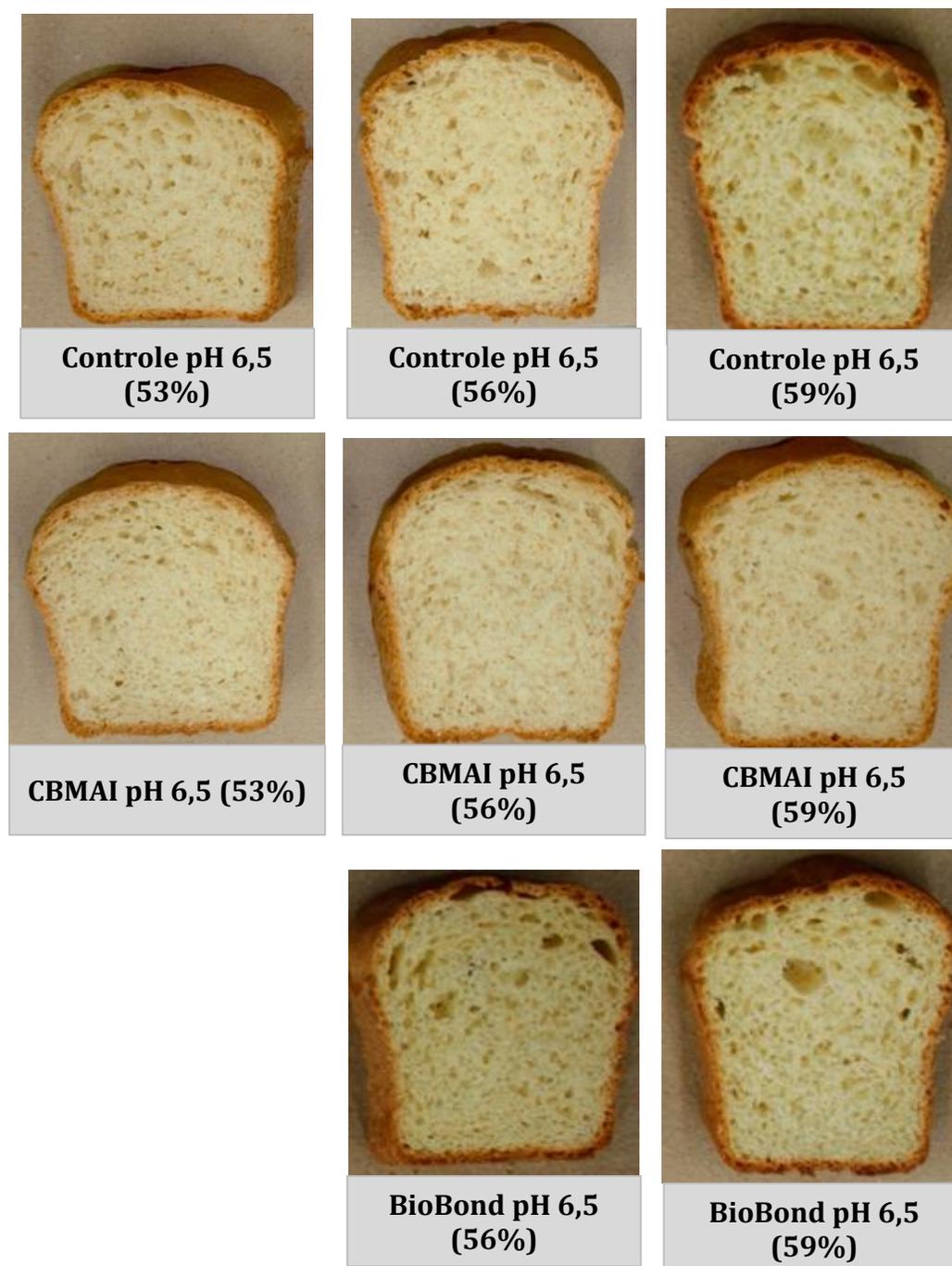


Figura II-23 – Fatia central dos pães de forma formulados com farinha de trigo mole e tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 na presença de TGase comercial Biobond e EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

A **Figura II-24** apresenta os valores médios dos parâmetros de textura avaliados para cada amostra de pão formuladas com tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 na presença de TGase comercial (BioBond) ou do extrato bruto

lío-filizado de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 (CBMAI). As amostras formuladas com tampão foram comparadas entre si através do teste de Tukey (90% de confiança). O resultado do teste de Tukey está representado pelas letras dentro das figuras.

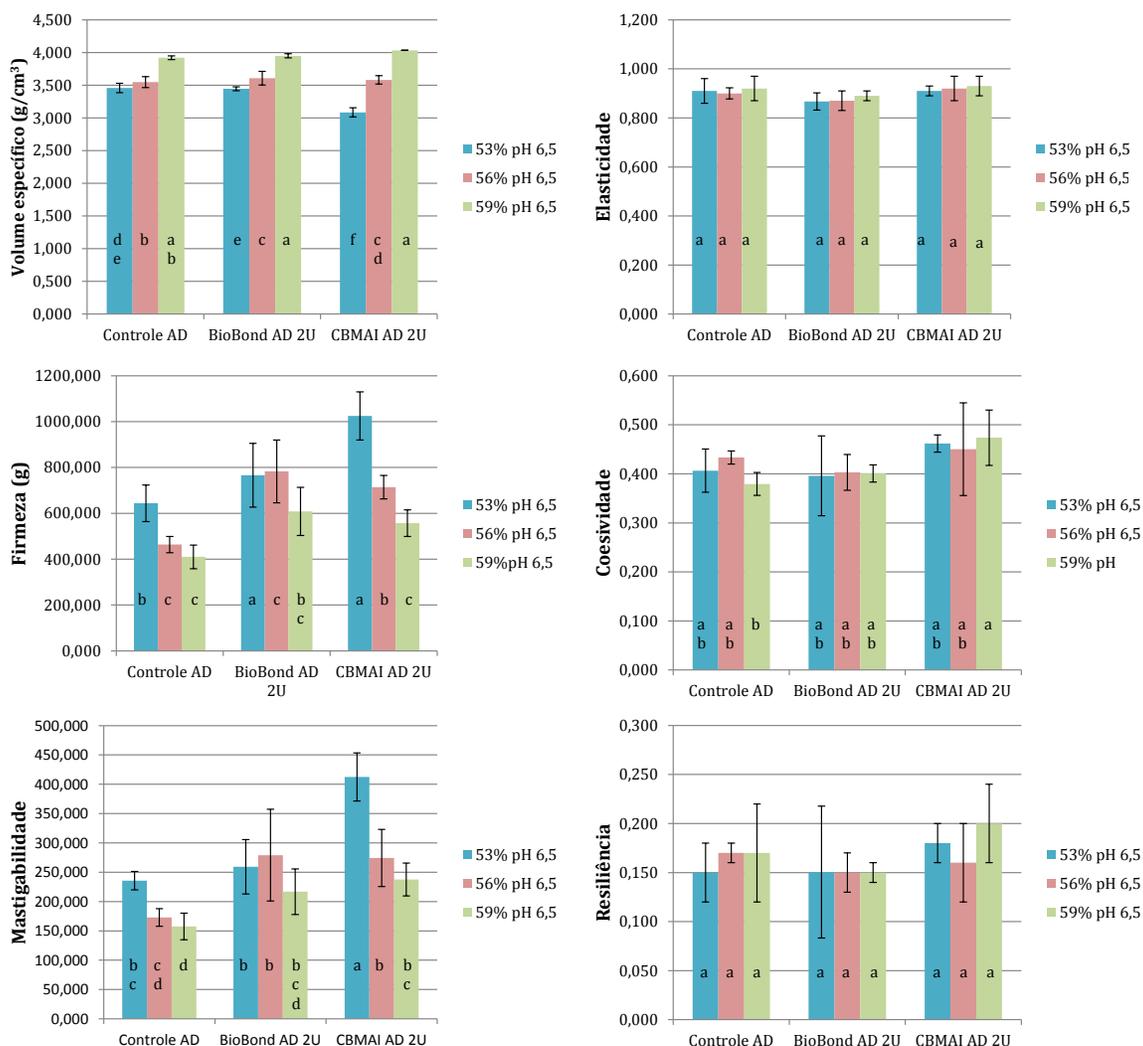


Figura II-24 – Volume específico e resultados da análise de textura (TPA) para os pães formulados com farinha de trigo mole e com TGase (comercial ou de *Streptomyces* sp. CBMAI-837) em presença de tampão citrato 0,05M pH6,5.

A adição de TGase comercial BioBond 2U/g de proteína e 53% de tampão não provocou a redução do volume específico dos pães em relação ao controle, já a adição do EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 conduziu à redução de

aproximadamente 11% no volume dos pães. Desta forma a redução no volume específico dos pães formulados com TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 (EEBC) foi mais acentuada (3%) para as formulações contendo tampão citrato 0,05M pH6,5 que para as formulações contendo água destilada. Não houve diferença significativa entre os volumes específicos dos pães formulados com a TGase comercial e o controle.

De forma geral, o aumento da quantidade de tampão adicionada nas massas controle e com TGase provocou o aumento do volume específico dos pães, de forma que o efeito negativo provocado pelo EEBC foi compensado.

A adição da TGase comercial não apresentou efeito na firmeza dos miolos dos pães formulados com 53% de tampão em relação ao controle. Já a adição do EEBC provocou o aumento de 59% neste parâmetro. O aumento da quantidade de tampão adicionada reduziu a firmeza de todas as amostras sendo que para 59% de tampão na formulação dos pães não foi verificada diferença significativa entre amostras com TGase e controle e nem entre as duas TGases aplicadas.

A mastigabilidade do produto foi prejudicada pela adição de EEBC sendo elevada em 75%, no entanto, mais uma vez a adição de tampão acima de 53% provocou a queda deste parâmetro, porém após a adição de 59% de tampão este parâmetro ainda foi superior ao controle, porém equiparou-se ao controle formulado com 53% de tampão. A adição da TGase comercial BioBond elevou levemente a mastigabilidade dos pães em relação ao controle, no entanto utilizando-se 59% de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5 não houve diferença entre as 3 formulações avaliadas.

A elasticidade dos miolos não foi afetada pela adição de TGase comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e nem pela adição extra de tampão. A coesividade também foi pouco afetada pela adição de TGase sendo observado

aumento significativo apenas para os pães formulados com EEBC com 59% de tampão citrato e seu controle.

Não houve diferença significativa quanto a resiliência dos pães formulados com tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,5.

A **Tabela II-19** apresenta uma comparação dos parâmetros de textura e volume específicos de pães de farinha de trigo duro (referência para o preparo de pães) e de pães de farinha de trigo mole formulados com TGase comercial BioBond ou de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e com 56% de água destilada ou tampão citrato 0,05M pH6,5.

Tabela II-19 – Comparação dos parâmetros de textura e volume específico de pães formulados com farinha de trigo duro e farinha de trigo mole com enzima comercial BioBond e EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837.

Amostras	Volume específico (g/cm ³)	Firmeza (g)	Mastigabilidade	Elasticidade	Coesividade	Resiliência
Trigo duro	4,43±0,11	426,95±36,01	273,95±13,83	0,95±0,01	0,70±0,01	0,33±0,01
Controle AD 56%	3,82±0,08	438,90±19,80	175,31±11,42	0,90±0,02	0,44±0,02	0,17±0,01
BioBond AD 56%	3,59±0,06	463,85±40,07	224,00±28,89	0,91±0,04	0,39±0,04	0,14±0,01
CBMAI AD 56%	3,61±0,10	534,20±64,00	217,08±21,62	0,89±0,03	0,47±0,05	0,18±0,04
Controle pH6,5 56%	3,55±0,08	464,00±35,40	172,83±15,08	0,90±0,02	0,43±0,01	0,17±0,01
BioBond pH6,5 56%	3,61±0,10	782,85±136,6	279,14±78,29	0,87±0,04	0,40±0,04	0,15±0,02
CBMAI pH6,5 56%	3,58±0,06	714,30±51,30	274,35±48,62	0,92±0,05	0,45±0,10	0,16±0,04

Os resultados da **Tabela II-19** mostram que a adição de TGase (comercial ou de *Streptomyces* sp. CBMAI-837) na massa de farinha de trigo mole levaram a resultados similares quanto a mastigabilidade dos pães comparados com o pão de trigo duro, no entanto, quanto ao volume final dos

pães, resiliência e coesividade, os pães de farinha de trigo mole, tratados ou não com TGase, apresentaram resultados inferiores. Quanto à mastigabilidade, os pães contendo TGase apresentaram o miolo mais firme que os pães de farinha de trigo mole sem TGase e que o pão de farinha de trigo duro.

A aplicação da TGase em farinhas de trigo mole pode ser mais adequada para outros produtos como é o caso de *cookies* e massas folhadas, bem como produtos que utilizam massas congeladas (Basman et al., 2002; Caballero et al., 2007).

II.5. Conclusões

A adição das preparações de transglutaminase comercial BioBond e do EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 na farinha de trigo mole modificaram os perfis eletroforéticos das bandas de proteínas das amostras tratadas com TGase em relação as amostras controle, sendo observado diminuição das bandas de proteínas de massa molecular de 50 kDa e aumento das bandas na faixa de 100 a 150kDa e acúmulo de proteínas que não permearam o gel de 4% de poliacrilamida, indicando a formação de proteínas de alta massa molecular.

A atuação da enzima mostrou-se dependente do processo de aplicação. Para a massa de farinha de trigo mole a quantidade de enzima aplicada, o pH e a temperatura na qual a massa foi misturada influenciaram suas características reológicas, sendo que a adição de TGase reduziu significativamente a extensibilidade da massa de farinha.

A adição da TGase comercial BioBond na concentração 2 U/g de proteína na formulação de pão de forma de farinha de trigo mole resultou em pequenas alterações apresentando pouca diferença em relação aos controles, no entanto a adição do EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 apresentou algumas modificações significativas nos pães, em especial no volume específico, firmeza

e mastigabilidade dos miolos, sendo que essas diferenças foram acentuadas quando o pão foi formulado com tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1} \text{ pH}6,5$.

A adição tanto da TGase comercial quanto do EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, na quantidade fixa de 2 U/g de proteína, em presença de água destilada ou de tampão citrato, não provocou melhorias na qualidade da textura dos pães formulados com farinha de trigo mole. No entanto a adição de TGase na farinha de trigo mole melhorou as características da massa quanto a resistência à extensão e pegajosidade podendo ser utilizada para produção de macarrão e biscoitos.

II.6. Sugestão para trabalhos futuros

A literatura relata a atuação da TGase em diversos substratos proteicos explorando as modificações causadas pela introdução de ligações isopeptídicas ϵ -(γ -glutaminil)-lisina, no entanto poucos trabalhos apresentam estudos detalhados sobre como estas estruturas modificam as proteínas ou mesmo indicam se houve atividade de desamidação. O estudo da atuação da TGase em diferentes solventes para direcionar a reação catalisada para desamidação ou para transaminação, bem como o efeito que cada uma destas alterações nas estruturas proteicas seria interessante para aprimorar a forma de aplicação da enzima de acordo com o produto final desejado e também aumentar a gama de aplicação da TGase microbiana.

II.7. Agradecimentos

Agradeço à orientação do Professor Dr. Koushik Seetharaman durante o período de 4 meses de bolsa de doutorado Sanduíche (Bolsista CAPES – BEX BEX 0907/12-0) e à *University of Guelph (Department of Food Science)* pelo apoio aos

estudos desenvolvidos neste capítulo. Agradeço à Dra. Sahar Jazaeri pelo acompanhamento e treinamento nas metodologias analíticas utilizadas neste capítulo.

II.8. Referências

AACC International, 2008. *Approved methods of analysis*, (11th Ed.). St. Paul, MN.

Armero, E., Collar, C., (1997). Texture properties of formulated wheat doughs: Relationships with dough and bread technological quality. *Z. Lebensm Unters Forsch A*, 204, 136 – 145.

Autio, K., Kruus, K., Knaapila, A., Gerber, N., Flander, L. Buchert, J., (2005). Kinetics of transglutaminase-induced cross-linking of wheat proteins in dough. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1039-1045.

Babiker, F.E., Fujisawa, N., Matsudomi, N., Kato, A., 1996. Improvement in the functional properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by microbial transglutaminase treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3746–3750.

Barth, A. e Zscherp, C., (2002). What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35 (4), 369 – 430.

Basman, A., Köksel, H., Ng, P.K.W., (2002). Effects of increasing levels of transglutaminase on the rheological properties and bread quality characteristics of two wheat flours. *European Food Technology*, 215, 419 – 424.

Bauer, N., Koehler, P., Wieser, H., Schieberele, P., (2003a). Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat I. Biochemical analysis. *Cereal Chemistry* 80 (6), 781-786.

Bauer, N., Koehler, P., Wieser, H., Schieberele, P., (2003b). Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat II. Rheological properties. *Cereal Chemistry* 80 (6), 787-790.

Bloksma, A., Nieman, W., (1975). The effect of temperature on some rheological properties of wheat flour doughs. *Journal of Texture Studies* 6, 343-361.

Bock, J.E., Damodaran, S., (2012). Bran-induced changes in water structure and gluten conformation in model gluten dough studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.10.014.

Bonet, A., Blaszcak, W., Rosell, C. M., (2006). Formation of homopolymers and heteropolymers between wheat flour and several protein sources by transglutaminase-catalyzed cross-linking. *Cereal Chemistry* 83(6), 655–662.

Bonomi, F., Mora, G., Pagani, M. A., Iametti, S., (2004). Probing structural features of water-insoluble proteins by front-face fluorescence. *Analytical Biochemistry*, 329(1), 104 – 111.

Caballero, P.A., Gómez, M., Rosell, C.M., (2007). Bread quality and dough rheology of enzyme-supplemented wheat flour. *European Food Research and Technology*, 224, 525 – 534.

Chandi, G. K., Seetharaman, K., (2011). Optimization of gluten peak tester: a statistical approach. *Journal of Food Quality*, 35 (1), 69 – 75.

Delcour, J.A., Joye, I.J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., Lagrain, B., (2012). Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. *Annual Review of Food Science and Technology* 3, 469-492.

Farahnaky, A., Hill, S.E., (2007). The effect of salt, water and temperature on wheat dough rheology. *Journal of Texture Studies*, 38, 499 – 510.

Georget, D. M.R., Belton, P. S., (2006). Effects of temperature and water content on the secondary structure of wheat gluten studied by FTIR Spectroscopy. *Biomacromolecules* 7, 469-475, 2006.

Hamer, R.J. and Hosney, R.C., (1998). *Interactions: the Keys to Cereal Quality*, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, 10-46.

Hu, X., Zhao, M., Sun, W., Zhao, G., Ren, J., (2011). Effects of microfluidization treatment and transglutaminase cross-linking on physicochemical, functional and conformational properties of peanut protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8886 – 8894.

Huang, W., Li, L., Wang, F., Wan, J., Tilley, M. Ren, C., Wu, S., (2010). Effects of transglutaminase on the rheological and Mixolab thermomechanical characteristics of oat dough. *Food Chemistry*, 121, 934 – 939.

Iametti, S., users.unimi.it/schiri/Scuolacamogli/document/.../iametti.pdf.
Acessado em 27/02/2013.

Ioana, <http://blog.ioanacolor.com/2011/06/elasticity/>. Acessado em 22/02/2013.

Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H., Suzuki, E., (2002). Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *The Journal of Biological Chemistry*, 46(15), 44252-44260.

Kim, Y.S., Huang, W., Du, Guocheng, Pan, Zhengxing, Chung, O., (2008). Effects of trehalose, transglutaminase and gum on rheological, fermentation and baking properties of frozen dough. *Food Research International*, 41, 903-908.

Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685.

Macedo, J.A.; Sette, L.D.; Sato, H.H., (2010). A comparative biochemical characterization of microbial transglutaminases: Commercial vs. a newly isolated enzyme from *Streptomyces* sp. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 308-314.

Marchetti, L., Cardós, M., Campaña, L., Ferrero, C., (2012). Effect of glutens of different quality on dough characteristics and breadmaking performance. *Food Science and Technology*, 46, 224 – 231.

Middaugh, R., Mach, H., Ryan, J.A., Sanyal, G., Volkin, D.B.(1995). Methods in molecular biology. Protein stability and folding: Theory and practice. Vol. 40, Chapter 6, edited by B.A.Shirley, Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Mujoo, R., NG, P. K. W., (2003). Identification of wheat protein components involved in polymer formation on incubation with transglutaminase. *Cereal Chemistry* 80(6), 703 – 706.

Pomeranz, Y., Finney, K.F., Hosney, R. C., (1966). Amino-acid composition of maturing wheat. *Journal of Science and Food Agricultural*, 17(11), 485 – 487.

Rauscher, S., Pomès, R., (2011). Structural disorder and protein elasticity. In: Fuxreiter, M., Tompa, P. (Eds), *Fuzziness: Structural Disorder in Protein Complexes*. Landes Bioscience and Springer Science, 159-183.

Renzetti, S. Behr, J., Vogel, R.F., Barbiroli, A., Iametti, S., Bonomi, F., Arendt, E.K., (2012). Transglutaminase treatment of brown rice flour: A chromatographic, electrophoretic and spectroscopic study of protein modifications. *Food Chemistry*, 131, 1076 – 1085.

Ribotta, P.D., Pérez, G.T., Añón, M.C., (2010). Optimization of additive combination for improved soy-wheat bread quality. *Food Bioprocess Technology* 3, 395-405.

Rodríguez, C.L.M., Torres, P., Bustos, F.M., Wong, B.R., López, O.P., Tostado, E.C., (2009). Effect of microbial transglutaminase on dough proteins of hard and soft (*Triticum aestivium*) and durum (*Triticum durum*) wheat cultivars. *Cereal Chemistry* 86(2), 127–132.

Seabourn, B.W., Chung, O.K., Seib, P.A., Mathewson, P.R., (2008). Determination of secondary structural changes in gluten proteins during mixing using Fourier transform horizontal attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4236 – 4243.

Shewry, P. R.; Popineau, Y.; Lafiandra, D.; Belton, P., (2001). Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT Project. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 433-441.

Singh, H., MacRitichie, F., (2001). Application of polymer science to properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, 33, 231-243.

Sivam, A. S., Waterhouse, D.S., Perera, C.O., Waterhouse, G.I.N., (2011). Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. *Food Research International*. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.039.

Song, Y., Zheng, Q., (2011). Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 132 – 138.

Tanaka, K., Furukawa, K., Matsumoto, H., (1967). The effect of acid and salt on the farinogram and extensigram of dough. *Cereal Chemistry* 44, 675-680.

Wang, F., Huang, W., Kim, y., Liu, R., Tilley,M., (2011). Effects of transglutaminase on the rheological and noodle-making characteristics of oat dough containing vital wheat gluten or egg albumin. *Journal of Cereal Science*, 54(1), 53-59.

Wang, J.S., Zhao, M.M., Yang, X.Q., Jiang, Y.M., Chun, C., (2007). Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction. *Food Hydrocolloids*, 21, 174 – 179.

Wigley, C.W., Békés, F., Bushuk, W., (2006). Gluten: A balance of gliadin and glutenin, em gliadin and glutenin the unique balance of wheat quality. *AACC International*, Minnesota, USA, 3 – 25.

Zalm, E. E. J.van der, Grabowska, K. J., Strubel, M., Goot, A. J. van der, Hamer, R. J., Boom, R. M., (2010). Gluten protein composition in several fractions obtained by shear induced separation of wheat flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10487-10492.

Verbeek, C.J.R., Berg, L. E. van den, (2009). Recent developments in thermo-mechanical processing of proteinous bioplastics. *Recent patents on material science*, 2(3), 1 – 16.

ANEXO

I. ANEXO I: PURIFICAÇÃO DA TRANSGLUTAMINASE DE *Streptomyces* sp. CBMAI-837

Resumo

A purificação de enzimas apresenta importância para o conhecimento de sua estrutura e também para aprimorar suas aplicações. No estudo de purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, os compostos polietilenoglicol 400, polietilenoglicol 10.000, sacarose, glicerol, manitol, sorbitol e L-cisteína foram avaliados como estabilizadores e ativadores da enzima. A adição de L-cisteína 5 mmol.L⁻¹ ativou a TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 e aumentou a estabilidade da enzima após 24 horas de incubação a 20°C. Os estudos de purificação da TGase por cromatografia em coluna foram realizados utilizando-se três princípios de interação entre a enzima e os grupos funcionais das resinas, sendo eles, a interação por afinidade com o corante Cibacron™ Blue F3G-A, interação hidrofóbica e interações covalentes por ligações dissulfídicas. A purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando resina de interação por afinidade com o corante Cibacron™ Blue F3G-A (resina *Blue Sepharose CL-6B*), na presença de L-cisteína, possibilitou o aumento do rendimento do processo de purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em 13%, com fator de purificação de 5. O rendimento da purificação na presença do estabilizante L-cisteína foi 2,4 vezes maior que o obtido nas mesmas condições na ausência do estabilizante. A fração purificada apresentou maior atividade em pH de em 10,0, da mesma forma que a enzima bruta e a preparação concentrada com sulfato de amônio a 80% (m/v) de saturação. A TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foi purificada 11 vezes com rendimento de 36% em coluna de *Phenyl Sepharose 6 Fast Flow* equilibrada

com tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 8,0. A TGase foi purificada 2 vezes com rendimento de 5% por meio de ligação covalente por pontes dissulfídicas em coluna de resina *Activated Thiol Sepharose 4B*. Este estudo indicou que as resinas *Blue Sepharose CL-6B* e *Phenyl Sepharose 6 Fast Flow* foram boas opções para a semi purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando uma única etapa cromatográfica.

Abstract

Enzyme purification is important in order to determine the enzyme structure and enhance its applications. In the study of the purification of the TGase from *Streptomyces* sp. CBMAI-837, the compounds polyethylene glycol 400, polyethylene glycol 10.000, sucrose, glycerol, mannitol, sorbitol and L-cysteine were evaluated as stabilizers and activators of the enzyme.

The addition of 5mmol.L⁻¹ L-cysteine activated the TGase from *Streptomyces* sp. CBMAI-837 and increased its stability after 24 hours incubation at 20°C.

The TGase was purified in chromatography columns using three resins showing different interaction mechanisms: affinity with Cibacron™ Blue F3G-A, hydrophobic interactions and covalent interactions by disulfide bonds.

The purification of the TGase from *Streptomyces* sp. CBMAI-837 using the affinity interaction with Cibacron™ Blue F3G-A (*Blue Sepharose CL-6B* resin) in the presence of 5mmol.L⁻¹ L-cysteine, lead to an increase in yield of 13%, with 5-fold purification. The yield in the presence of the stabilizer L-cysteine was 2.4-fold higher than the yield obtained under the same conditions in the absence of this stabilizer, and the purified fraction showed higher activity at pH 10, in the same way as the crude enzyme and the concentrated enzyme preparation obtained using ammonium sulfate at 80% of saturation.

Using a phenyl Sepharose 6 fast flow column equilibrated with 0.05 mol.L⁻¹ phosphate buffer, pH 8, the TGase from *Streptomyces* sp. CBMAI-837 was purified 11-fold with 36% yield.

The TGase was purified 2-fold with a 5% yield using covalent disulfide bonds on an activated thiol Sepharose 4B column.

This study indicated that the resins Blue Sepharose CL-6B and Phenyl Sepharose 6 Fast Flow were good options to obtain semi-purified TGase from *Streptomyces* sp. CBMAI-837 by single step chromatography.

I.1. Introdução

A purificação enzimática é de grande valia para os estudos bioquímicos da enzima e também para determinadas aplicações em que a presença de outros materiais não é aceita.

A TGase microbiana tem sido purificada por diversas técnicas cromatográficas, sendo a prática mais utilizada o uso de cromatografia de troca iônica seguida da cromatografia de exclusão molecular (Ando et al., 1989; Umezawa et al., 2002; Cui et al., 2007).

A purificação de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 vem sendo estudada desde 2009, e tem sido observada perda de atividade da enzima durante as etapas de purificação (Macedo, 2009; Lima, 2010).

O uso de substâncias estabilizadoras ou ativadoras da TGase pode ser uma estratégia para melhorar os rendimentos da purificação da enzima. Neste Anexo foi apresentado o estudo da purificação da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando 3 princípios de interação entre enzima e resina distintos (interação por afinidade, interação hidrofóbica e interação covalente), bem como a adição de algumas substâncias indicadas na literatura como estabilizantes térmicos e protetores do sítio ativo da TGase para elevação do rendimento da purificação da enzima em uma única etapa, utilizando a resina Blue Sepharose CL-6B e o resultado comparado com o estudo prévio realizado por Lima (2009).

I.2. Revisão bibliográfica

I.2.1. Purificação da TGase microbiana

Os métodos de purificação da TGase microbiana, descritos na literatura, envolvem etapas sequenciais de concentração pela adição de sais, ultrafiltração, cromatografia de troca iônica, afinidade, filtração em gel e interação hidrofóbica (Zhu et al., 1995).

Ando et al. (1989) purificaram a TGase obtida da linhagem *Streptoverticillium mobaraense* S-8112 concentrando o sobrenadante do meio de cultivo por ultrafiltração e aplicando em coluna de Amberlite CG-50. As frações ativas foram aplicadas novamente na mesma coluna sob as mesmas condições e em seguida foram aplicadas em coluna de Blue Sepharose. A enzima foi purificada 22,6 vezes com rendimento de 42%.

Lu et al. (2002) purificaram a TGase de *Streptoverticillium mobaraense* concentrada por ultrafiltração e precipitada com etanol utilizando cromatografia de troca iônica com a resina CM-celulose seguida pela aplicação das frações purificadas em resina Sephadex G-75. A TGase foi purificada cerca de 2 vezes e o rendimento foi de 72%.

Soarez et al. (2003) estudaram a purificação da TGase de *Bacillus circulans* concentrada pela precipitação com sulfato de amônio (60 e 90% m/v de saturação) utilizando a coluna de Q-Sepharose Fast Flow e eluição com gradiente linear 0 – 1 mol.L⁻¹ de NaCl. As frações contendo atividade de TGase foram aplicadas em coluna de Octyl-Sepharose 4 Fast Flow e eluídas com gradiente linear decrescente de sulfato de amônio iniciado com 3,5 mol.L⁻¹. A TGase foi purificada cerca de 150 vezes com rendimento de 32%.

Langston et al. (2007) compararam a purificação da TGase de 5 espécies de *Streptomyces* (*Streptomyces lydicus*, *Streptomyces platensis*, *Streptomyces*

nigrescens, *Streptomyces cinnamoneus* e *Streptomyces hachijoensis*) e de *Phytophthora cactorum*. A TGase dos micro-organismos do gênero *Streptomyces* foram purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sepharose seguida pela aplicação em coluna de interação hidrofóbica *Phenyl-Sepharose*. Para a purificação da TGase de *Phytophthora cactorum* foram utilizadas colunas de troca-iônica Q-Sepharose e SP-Sepharose.

Macedo *et al.* (2010) relataram a purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 através de 2 passagens consecutivas da enzima bruta em uma coluna de Sephadex G-75 obtendo fator de purificação de 5 vezes com rendimento de 17,7%.

Lima (2010) também estudou a purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 concentrada por precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação utilizando cromatografia de afinidade em coluna contendo a resina Blue Sepharose CL-6B, obtendo fator de purificação de 17 vezes com rendimento de 18,4%. Foi evidenciado que a coluna de troca iônica CM-celulose não foi efetiva na purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837.

I.2.2. Resinas para purificação da TGase

I.2.2.1. Resinas de afinidade Blue Sepharose CL-6B

A resina de afinidade Blue Sepharose CL-6B apresenta o corante Cibacron™ Blue F3G-A acoplado covalentemente à resina Sepharose CL-6B. A separação das moléculas alvo pode ocorrer devido à combinação bioespecífica da proteína com o corante, devido à similaridade estrutural com um cofator enzimático (no caso de enzimas que necessitam de NAD⁺ ou NADP⁺), ou de forma menos específica devido a interações eletrostáticas ou hidrofóbicas com

o corante. A **Figura I-1** ilustra a estrutura parcial da resina Blue Sepharose CL-6B.

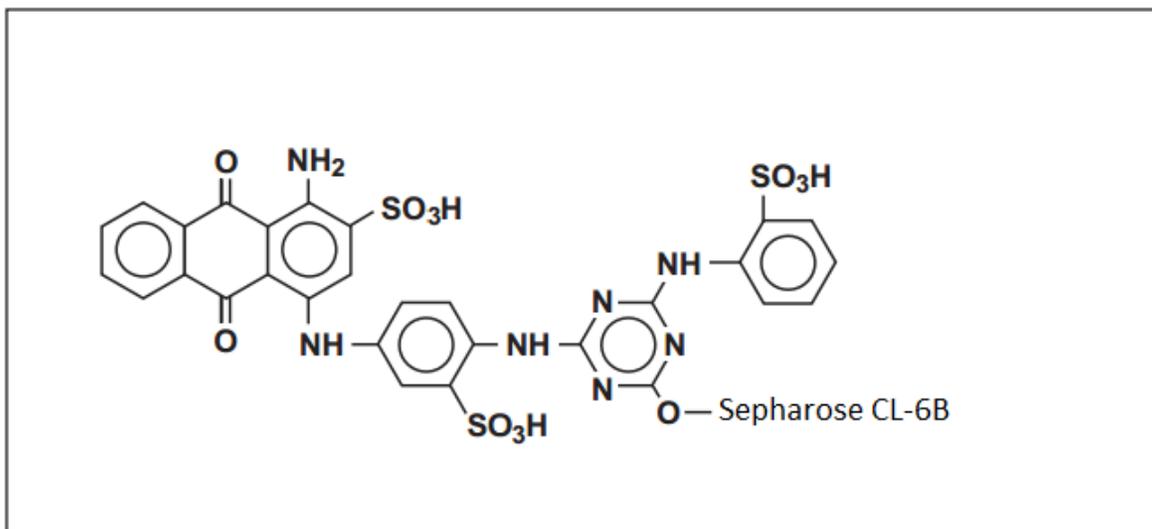


Figura I-1 – Estrutura parcial da resina Blue Sepharose CL-6B

A purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 utilizando o princípio de interação por afinidade foi estudada anteriormente por Lima (2010) o qual utilizou a resina Blue-Sepharose CL-6B. Durante o processo de purificação, foi observado um baixo rendimento, sendo que apenas 26 % da enzima aplicada na coluna foi recuperada.

I.2.2.2. Resinas de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose

As resinas de interação hidrofóbica foram pouco utilizadas para purificação da TGase microbiana sendo relatada na literatura sua aplicação na purificação da TGase produzida por linhagens de *Bacillus* sp. (Suzuki et al., 2000; Soarez et al., 2003).

A técnica envolve a interação hidrofóbica do composto de interesse com os grupos hidrofóbicos ligados à matriz da resina e a separação ocorre por diferenças nas forças da interação das proteínas com a resina.

A Phenyl Sepharose 6 Fast Flow é uma resina de interação hidrofóbica sendo que o ligante hidrofóbico, um fenil, é covalentemente ligado à matriz Sepharose 6 Fast Flow. Sua estrutura parcial pode ser visualizada na **Figura I-2**.

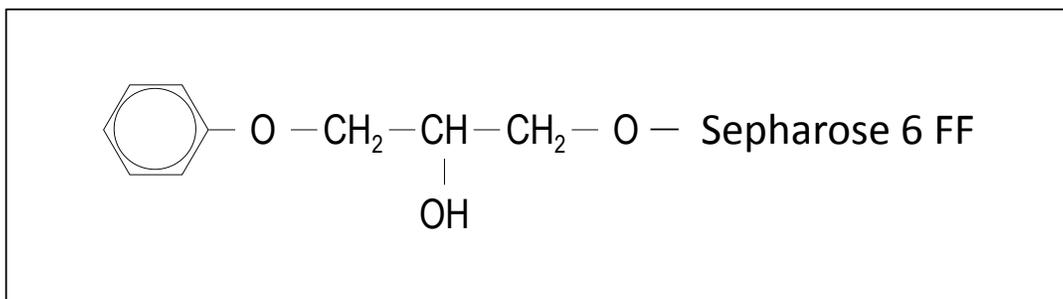


Figura I-2 - Estrutura parcial da resina Phenyl Sepharose 6 FF

I.2.2.3. Resina de afinidade por ligações covalentes

A cromatografia de interação covalente, uma subclassificação da cromatografia por afinidade, envolve a formação e a quebra de ligações covalentes entre o soluto e a fase estacionária. A ligação covalente entre grupos tiois é a mais adequada para esta técnica uma vez que é estável e a proteína pode ser separada sob condições amenas (Carlsson et al., 1998) e pode ser uma alternativa para a purificação da TGase microbiana, uma vez que é descrito a presença de um resíduo de cisteína no sítio ativo enzimático (Ando et al., 1989; Zhu et al., 2005; Bagagli, 2009; Yang et al., 2011).

Algumas enzimas que foram purificadas utilizando esta técnica cromatográfica foram papaína, urease, dissulfito proteína isomerase e dissulfito proteína oxiredutase (Carlsson *et al.*, 1998).

A resina *Activated Thiol-Sepharose 4B* apresenta em sua estrutura uma ligação dissulfeto entre o composto 2,2'-dipiridil disulfeto e uma molécula de

glutathiona acoplada a *CNBr-activated Sepharose 4B*. Sua estrutura parcial pode ser observada na **Figura I-3**. Esta resina é indicada para casos em que a molécula alvo apresenta elevada massa molecular.

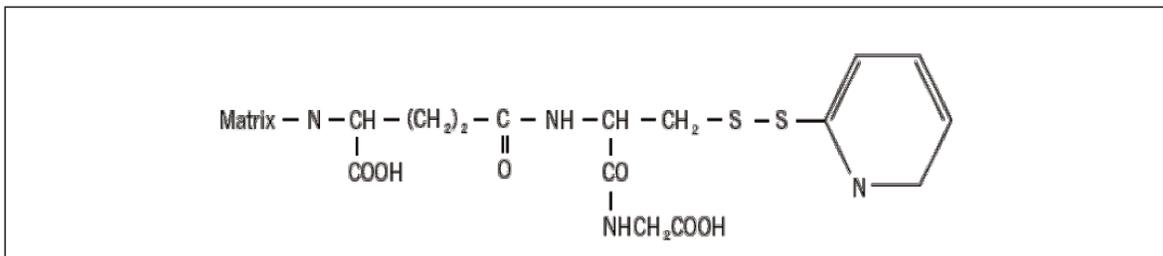


Figura I-3 - Estrutura parcial da resina *Activated Thiol-Sepharose 4B* (GE Healthcare, instructions 71-7106-00 AE).

O mecanismo simplificado das reações que ocorrem para a separação da molécula de interesse pode ser observado na **Figura I-4**.

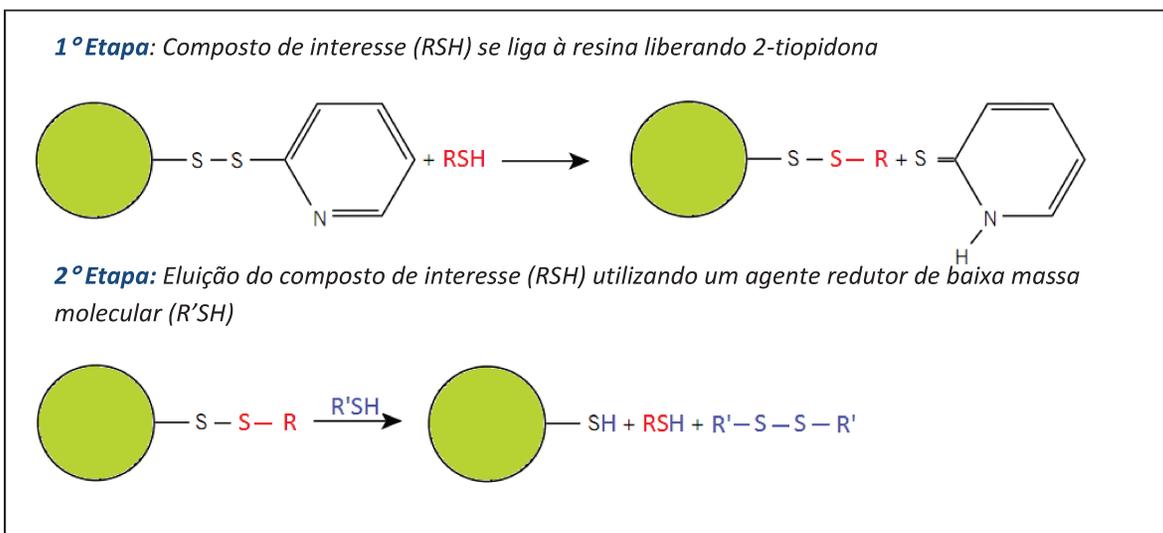


Figura I-4 - Esquema das reações envolvidas na separação de moléculas com a resina *Activated Thiol-Sepharose 4B* (adaptado de GE Healthcare, instructions 71-7106-00 AE)

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a aplicação de cromatografia de interação covalente para purificação da enzima TGase microbiana.

O uso de substâncias estabilizadoras ou ativadoras da TGase pode ser uma estratégia para melhorar os rendimentos da purificação da enzima.

I.2.3. Estabilização da TGase microbiana

A TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 é uma enzima estável na faixa de pH de 6,5 a 9,0 e na faixa de temperatura de 20°C a 35°C, quando exposta por 30 minutos (Bagagli, 2009).

Durante as etapas de purificação a enzima pode perder a atividade devido à exposição prolongada a condições adversas de pH, temperatura, forças iônicas elevadas, presença de inibidores ou remoção de substâncias estabilizadoras presentes no extrato bruto.

A estabilização da TGase de linhagens de *Streptomyces* sp. foi estudada através da adição de compostos redutores como a cisteína e glutathione, os quais, por possuírem grupos tiol, evitam a formação de pontes dissulfeto envolvendo o resíduo de cisteína presente no sítio ativo da enzima (Sakamoto et al., 1992, Lima, 2009).

O uso de polióis (como o sorbitol, maltitol, glicerol e polietilenoglicol) e açúcares (como sacarose, frutose, manose e trealose) também foram avaliados como estabilizantes da TGase microbiana, sendo evidenciado o aumento da estabilidade térmica da enzima (Soeda et al, 2000; Matsuura et al, 2001; Cui, et al, 2006 e 2008). Os polióis e os açúcares apresentam a capacidade de se aproximar das moléculas de água presente no meio, reduzindo a hidratação da estrutura da enzima, reduzindo a velocidade de reações desta com outros compostos ou mesmo evitando alterações da estrutura terciária da enzima (Ó'fágáin, 2003).

Os polióis, tais como sorbitol, manitol, glicerol e polietileno glicol, são considerados bons estabilizantes de proteínas uma vez que alteram a estrutura

de solvatação da proteína e fortalecem as interações hidrofóbicas entre aminoácidos não polares presentes no interior da proteína (Hafedh et al., 2001; Cui et al., 2008).

A cisteína é um aminoácido que apresenta um grupo tiol na cadeia lateral o qual atua como um agente redutor evitando que o grupo tiol presente no sítio ativo da enzima TGase forme pontes dissulfeto o que reduz a atividade enzimática.

A adição de sais inorgânicos à solução enzimática de TGase para estabilização térmica da enzima também foi citada na literatura. Os sais NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, nas concentrações de 1 a 5%, aumentaram a estabilidade térmica da TGase (Kutemeeyer et al., 2005; Lima, 2009).

O efeito da adição de sais na termoestabilidade da TGase de *Bacillus circulans* foi estudada por Souza et al. (2009). Os sais NaCl (1%) e CaCl₂ (5%) aumentaram a estabilidade térmica da enzima.

A TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 teve sua atividade elevada quando em presença de L-cisteína e L-glutathiona na concentração de 1 e 10 mmol.L⁻¹, além do que a L-cisteína na concentração de 10 mmol.L⁻¹ possibilitou a manutenção da atividade da TGase após a exposição durante 30 minutos a 42°C (Bagagli, 2009).

A purificação da transglutaminase apresenta importância em determinadas aplicações da enzima, tais como aplicação em alimentos, em produtos farmacêuticos e na engenharia de tecidos, pelo fato de eliminar compostos que interferem na atividade enzimática, proteínas e outros materiais indesejáveis ao produto final. Além disto, a obtenção da enzima pura permite a determinação de sua estrutura e conformação bem como de seu mecanismo de ação, conhecimentos importantes para a aplicação.

I.3. Material e métodos

I.3.1. Produção do extrato enzimático bruto de transglutaminase

O extrato enzimático bruto liofilizado foi obtido por fermentação submersa de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 conforme descrito no item I.3.2.1. O caldo fermentado centrifugado foi saturado com sulfato de amônio (80% de saturação) e mantido por 12 horas a 4°C para precipitação de proteínas. Em seguida, o material foi centrifugado a 9.630 x *g* por 10 minutos a 5°C e o precipitado foi ressuspensionado e dialisado contra água destilada a 4°C durante 12 horas. Após diálise, o material foi liofilizado por 48 horas e homogeneizado. Esse pó contendo a enzima foi denominado extrato enzimático bruto concentrado (EEBC).

I.3.2. Estabilizantes da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

A estabilização da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 pela adição de polietilenoglicol 400, polietilenoglicol 10.000, sacarose, glicerol, manitol, sorbitol e de L-cistina foi estudada a 20°C utilizando-se tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 8,0 para solubilização do EEBC e dos diferentes compostos. A Tabela I-1 apresenta os compostos, suas concentrações e as abreviações utilizadas para nomear os compostos.

A atividade de TGase residual foi determinada de acordo com o método descrito no item I.3.1.1, sendo que foram retiradas alíquotas após 30 minutos, 1, 2, 22 e 120 horas de incubação. Os resultados foram comparados pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Tabela I-1 – Substâncias avaliadas para estabilização da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, concentrações utilizadas e abreviaturas

Composto	Concentração	Abreviação
Polietileno glicol 400	3% (m/v)	PEG 400
Polietileno glicol 10.000	3% (m/v)	PEG 10.000
Sacarose	3% (m/v)	Sac
Glicerol	3% (m/v)	Gli
Manitol	3% (m/v)	Man
Sorbitol	3% (m/v)	Sor
L-Cisteína	5mmol.L ⁻¹	Cis

I.3.3. Purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

Os estudos de purificação da TGase foram realizados em um *FPLC System* (Pharmacia Biotech) em sala climatizada a 20°C.

I.3.3.1. Purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em uma etapa utilizando a resina Blue Sepharose CL-6B

O EEBC foi ressuspendido em 4mL de solução tampão fosfato 0,05mol.L⁻¹ pH 8,0 contendo 5mM de L-cisteína (Synth). Uma alíquota de 2mL do extrato enzimático ressuspendido contendo 3,2 U.mL⁻¹ foi aplicado na coluna com capacidade de 35 mL (20 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 25 mL de resina Blue Sepharose CL-6B foi equilibrada com tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 8,0 contendo 5 mmol.L⁻¹ de L-cisteína.

A vazão do tampão durante a aplicação da enzima na coluna foi de 0,5 mL.min⁻¹. Após toda a enzima ter sido introduzida na resina, a vazão foi alterada para 1 mL.min⁻¹. Frações de 5 mL foram coletadas e a eluição das proteínas foi monitorada pela medida da absorbância a 280nm pelo

equipamento (unidade óptica Monitor UV-1, Pharmacia) e medida posteriormente em espectrofotômetro (DU[®] 640, Beckman Coulter[™]).

Após a absorbância a 280 nm ser reduzida a valores inferiores a 0,1, iniciou-se o gradiente salino linear de 0 a 1 mol.L⁻¹ de NaCl dissolvido em tampão fosfato 0,05M mol.L⁻¹ pH8,0 adicionado de 5mmol.L⁻¹ de L-cisteína

A atividade de TGase nas frações foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item I.3.1.2. A concentração de proteína presente em cada fração foi estimada pela absorbância a 280nm uma vez que as principais metodologias analíticas que determinam baixas concentrações de proteínas sofrem interferência da cisteína presente nas amostras (Zaia et al, 1998).

As frações que apresentaram elevada atividade específica (U.mg⁻¹ de proteína) foram dialisadas contra água destilada, liofilizadas e submetidas à análise do perfil eletroforético, conforme descrito no Anexo I item I.3.4.

Para fins de comparação, uma corrida foi realizada da mesma forma porém sem adição de L-cisteína ao longo da corrida.

I.3.3.1.1. pH ótimo de atividade da fração transglutaminase purificada

A TGase purificada em resina Blue Sepharose CL-6B na presença de L-cisteína foi avaliada quanto ao pH ótimo de atividade. Para tanto, as frações ativas obtidas no item anterior foram dialisadas em água destilada e liofilizadas.

A fração pura dialisada e liofilizada foi ressuspensa em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 6 e 7 e em tampão borax 0,1 mol.L⁻¹ para os pH 10 e 11.

A análise de atividade de TGase foi realizada conforme descrito no item I.3.1.2 com modificações nos volumes de reação os quais foram reduzidos pela metade. As leituras de absorbância foram realizadas no leitor de placas a

600nm. Uma curva padrão para cada pH foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item I.3.1.2 e a leitura de absorbância realizada em leitor de placas NovoStar Microplate reader (BMG LABTECH, Germany) a 600nm.

I.3.3.2. Purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em uma etapa utilizando resina Phenyl Sepharose 6 FF

O EEBC foi ressuspendido em 4 mL de solução tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ adicionado de 1,5 mol.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ nos valores de pH 7 ou 8. Alíquota de 2 mL do extrato enzimático ressuspendido contendo 2,6 U.mL⁻¹ e 3,3 U.mL⁻¹, respectivamente, foram aplicados, separadamente, na coluna com capacidade de 53 mL (30cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 45 mL de resina Phenyl Sepharose 6 FF equilibrada em tampão fosfato 0,05M adicionado de 1,5M de (NH₄)₂SO₄ em pH 7,0 ou 8,0, respectivamente.

Frações de 10mL foram coletadas com vazão de 1mL.min⁻¹ e a eluição das proteínas foi monitorada pela medida da absorbância a 280nm pelo equipamento (unidade óptica Monitor UV-1, Pharmacia) e medida posteriormente em espectrofotômetro (DU[®] 640, Beckman Coulter™).

Após a absorbância a 280 nm ser reduzida a valores inferiores a 0,1, iniciou-se o gradiente gradiente linear, reduzindo a concentração de sulfato de amônio no tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ (pH 7,0 ou 8,0) de 1,5 para 0 mol.L⁻¹.

A atividade de TGase nas frações foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item I.3.1.2. A concentração de proteína presente em cada fração foi estimada pela absorbância a 280 nm.

As frações que apresentaram elevada atividade específica (U.mg⁻¹ de proteína) foram dialisadas contra água destilada, liofilizadas e submetidas à análise do perfil eletroforético, conforme descrito no item I.3.4.

1.3.3.3. Purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em uma etapa utilizando resina Activated Thiol Sepharose 4B

A resina Activated Thiol Sepharose 4B (GE Healthcare) foi hidratada em água destilada e lavada até que a absorbância a 343 nm fosse inferior a 0,01. A coluna foi então equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH8,0 adicionado de 1mM de EDTA e 0,3 mol.L⁻¹ de NaCl.

O EEBC foi ressuspendido em 4 mL de solução Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH8,0 adicionado de 1mM de EDTA e 0,3 mol.L⁻¹ de NaCl. Uma alíquota de 0,5 mL do extrato enzimático ressuspendido contendo 2,1 U.mL⁻¹, previamente centrifugado a 6000 rpm, foi aplicada na coluna com capacidade de 35 mL (20 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro interno) contendo 15 mL de resina Activated Thiol Sepharose 4B equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH8,0 adicionado de 1mmol.L⁻¹ de EDTA e 0,3 mol.L⁻¹ de NaCl.

Frações de 2 mL foram coletadas com vazão de 0,1 mL.min⁻¹ durante a aplicação da enzima na coluna. Após toda a solução de enzima ter penetrado na resina, o fluxo foi alterado para 0,5 mL.min⁻¹. A absorbância das frações foi monitorada a 280 nm pelo equipamento e medida posteriormente em espectrofotômetro (DU[®] 640, Beckman Coulter[™]) nos comprimentos de onda de 280 nm e 343 nm.

Após a absorbância a 280 nm e a 343nm ter sido reduzida a valores inferiores a 0,1, iniciou-se a o gradiente salino linear de β-mercaptoetanol (de 0 a 30 mM) em tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH8,0 adicionado de 1mmol.L⁻¹ de EDTA e 0,3 mol.L⁻¹ de NaCl.

A absorbância das frações foi acompanhada a 343 nm pois quando compostos contendo o grupo tiol interagem com a resina, há a liberação do

composto 2-tiopiridona que absorve tanto a 280nm quanto a 343 nm, o que pode mascarar os resultados.

A atividade de TGase das frações foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item I.3.1.2. A concentração de proteína presente em cada fração foi estimada pela absorbância a 280 nm descontada do valor da absorbância a 343 nm.

As frações que apresentaram alta atividade específica ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) foram dialisadas contra água destilada, liofilizadas e submetidas à análise do perfil eletroforético, conforme descrito no item I.3.4.

I.3.4. Perfil eletroforético das frações purificadas (SDS-PAGE)

O gel de separação foi preparado misturando-se 3,4 mL de água destilada, 4 mL de solução Acrilamida/Bis (29,2% m/v de acrilamida e 0,8% m/v de N,N'-metileno-bis-acrilamida), 2,5 mL de solução tampão Tris-HCl $1,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,8; 0,1 mL de solução de 10% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS); 10 μL de solução TEMED (tetra-metil-etileno-diamino) e 50 μL de solução 10% (m/v) de persulfato de amônio.

O gel de empacotamento foi preparado misturando-se 6,1 mL de água destilada, 1,3 mL de solução Acrilamida/Bis (29,2% m/v de acrilamida e 0,8% m/v de N,N'-metileno-bis-acrilamida), 2,5 mL de solução tampão Tris-HCl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,8, 0,1 mL de solução 10% de SDS, 10 μL de solução TEMED e 50 μL de solução 10% de persulfato de amônio.

O tampão da amostra foi preparado misturando-se 3,4 mL de água destilada, 1,0 mL de solução tampão Tris-HCl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH6,8, 1,6 mL de glicerol, 1,6 mL de solução 10% de SDS, 0,4 mL de β -mercaptoetanol e uma pitada de azul de bromofenol. O tampão de corrida foi preparado misturando-se 15 g de Tris-base, 72 g de glicina e 5 g de SDS em 900 mL de água destilada.

O volume foi completado para 1.000 mL com água destilada. Para o desenvolvimento da eletroforese o tampão foi diluído com água destilada na proporção de 1:4 (Laemmli, 1970).

As amostras foram aplicadas nos poços do gel de empacotamento, sendo que o volume de amostra aplicado variou de 7 a 15 μL , dependendo da concentração de proteína presente na amostra a fim de padronizar o total de proteína aplicada. A cuba para eletroforese vertical foi então conectada a fonte e a corrida realizada com corrente de 120 V durante aproximadamente 2 horas.

I.4. Resultados

I.4.1. Estabilizantes da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837

A **Figura I-5** apresenta os resultados das atividades residuais da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837, incubada a 20°C na presença de substâncias com potencial para estabilizar a enzima, ao longo do tempo de incubação.

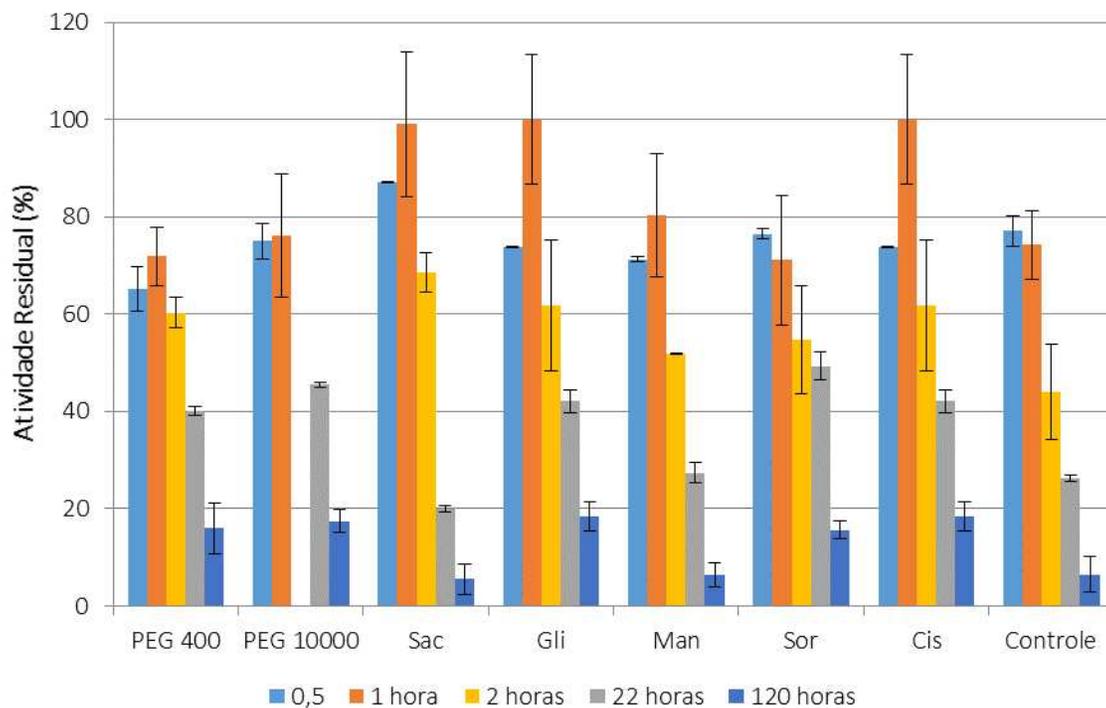


Figura I-5 – Atividade residual de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 incubada na presença de soluções estabilizantes.

Observou-se que após 1 hora de incubação a 20°C a presença de sacarose e L-cisteína na solução de TGase causou a elevação da atividade de TGase inicial, ou seja, as substâncias atuaram como ativadores da enzima. A L-cisteína é um ativador de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 (Bagagli, 2009; Lima, 2010). O provável mecanismo de ação é a redução de ligações dissulfídicas entre o grupo tiol presente no sítio ativo da enzima e outros presentes na estrutura proteica. A sacarose não foi relatada previamente como um ativador da TGase, no entanto, Lee e Timasheff (1981) observaram que em um sistema solvente/proteína a sacarose é excluída das proximidades da proteína, elevando a energia livre do sistema e estabilizando a proteína, uma vez que o estado termodinâmico da estrutura proteica desdobrada é menos favorável que o da estrutura nativa.

Após 2 horas de incubação da enzima a 20°C com os diferentes compostos estudados, não foi observada diferença estatística entre a média das atividades residuais de TGase em relação ao controle.

Após 22 horas de incubação a 20°C com os compostos, observou-se uma grande diminuição nos valores de atividade residual. A diminuição da atividade em presença de sacarose foi acentuada quando comparada com os demais compostos. As preparações de TGase contendo 3% de sorbitol apresentou maior atividade residual (49,4%) seguido de 3% de PEG10000 (45,5%) e 3% de glicerol (42%).

Cui et al (2008) observaram que 70% da atividade de TGase foi retida após incubação a 50°C por 30 minutos na presença de sorbitol e glicerol enquanto o controle foi capaz de reter apenas 30% da atividade.

Desta forma, em médio prazo, o sorbitol tem boa capacidade de estabilizar a atividade de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837.

Em longo prazo (após 120 horas), as preparações de TGase contendo 5mmol.L⁻¹ de L-cisteína, 3% de PEG 400, 3% de PEG 10000 e 3% de glicerol apresentaram as maiores atividades residuais de TGase, sendo que cerca de 26% da atividade foi preservada enquanto que o controle apresentou apenas 10% da atividade inicial.

A **Tabela I-2** apresenta o resultado da comparação estatística das médias da atividade de TGase residual para os tempos de incubação de 2, 22 e 120 horas em presença de cada substância avaliada.

Tabela I-2 – Comparação das médias da atividade residual de TGase em presença de estabilizantes a curto (2 horas), médio (22 horas) e longo prazo (120 horas)

Substância	Atividade residual (U.mL ⁻¹)		
	2 horas	22 horas	120 horas
PEG 400	0,74 ± 0,04 ^a	0,49 ± 0,01 ^c	0,20 ± 0,06 ^a
PEG 10000	-	0,56 ± 0,01 ^{ab}	0,21 ± 0,03 ^a
Sac	0,85 ± 0,05 ^a	0,25 ± 0,01 ^e	0,07 ± 0,04 ^c
Gli	0,76 ± 0,17 ^a	0,52 ± 0,03 ^{bc}	0,23 ± 0,04 ^a
Man	0,66 ± 0,15 ^a	0,34 ± 0,03 ^d	0,08 ± 0,03 ^c
Sor	0,64 ± 0,01 ^a	0,61 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,02 ^{ab}
Cis	0,76 ± 0,17 ^a	0,52 ± 0,03 ^{bc}	0,23 ± 0,04 ^a
Controle	0,54 ± 0,12 ^a	0,32 ± 0,01 ^d	0,08 ± 0,04 ^{bc}

A L-cisteína apresentou-se como um ativador em curto prazo e um bom estabilizante em longo prazo para a enzima exposta a 20°C. Com base nos resultados acima a L-cisteína foi escolhida para o estudo de purificação da TGase utilizando a resina Blue Sepharose CL-6B.

I.4.2. Purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em *Blue Sepharose* CL-6B na presença de L-cisteína

A **Figura I-6** ilustra a purificação da TGase em *Blue Sepharose* CL-6B na ausência e na presença de L-cisteína como estabilizante da enzima.

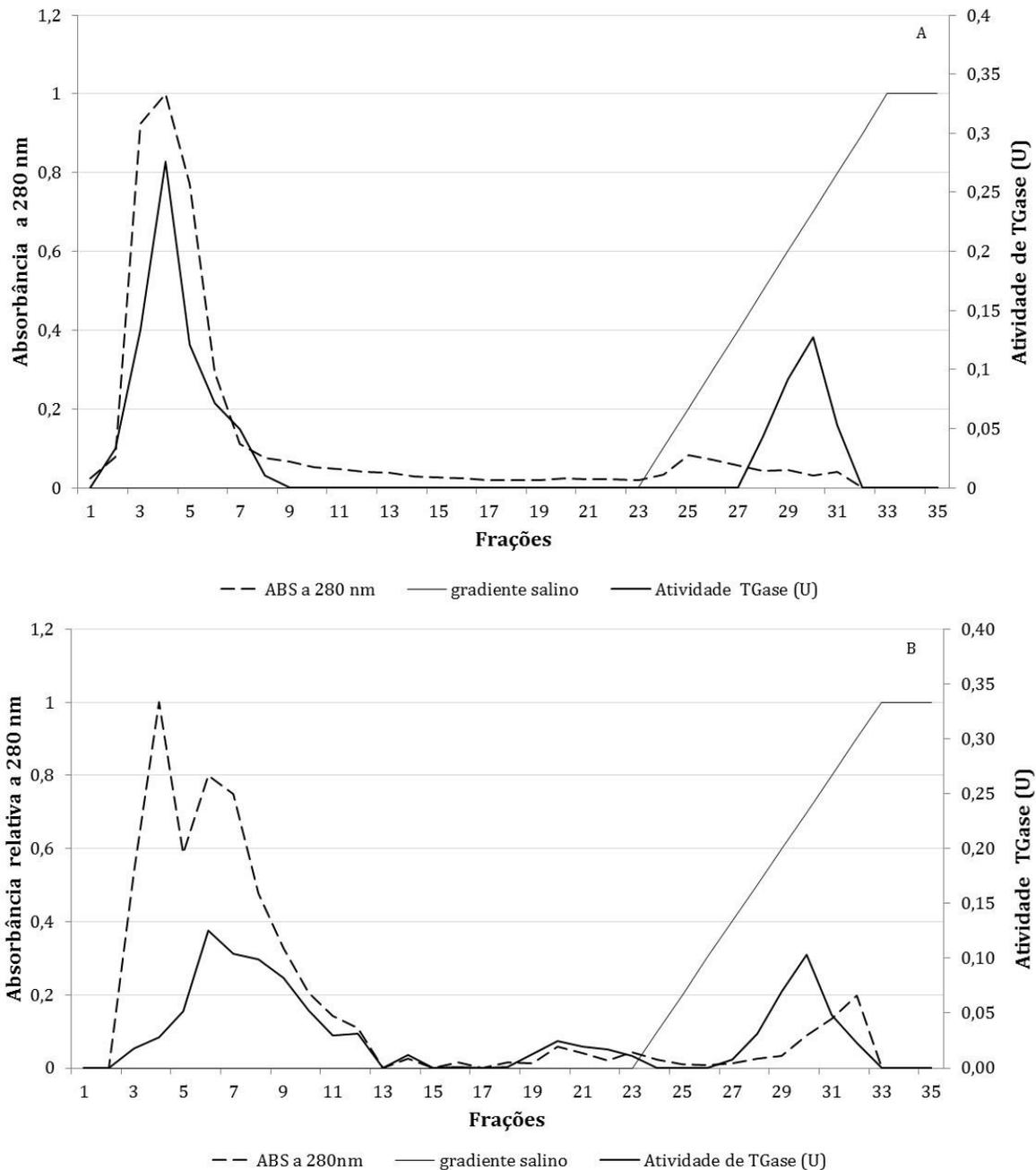


Figura I-6 - Purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em *Blue Sepharose* CL-6B (A) na ausência de L-cisteína (B) na presença de L-cisteína (5mmol.L⁻¹).

Para a purificação em *Blue Sepharose* CL-6B na ausência de L-cisteína 5mmol.L⁻¹ foram observados 2 picos de atividade de TGase consideráveis. O primeiro pico que aparece logo no início da corrida representou 68% do total

de atividade de TGase recuperado ao longo da corrida. O segundo pico que foi eluído com o gradiente salino representou 31,5% do total de atividade de TGase recuperada. A **Tabela I-3** apresenta o fator de purificação e o rendimento após purificação da TGase em resina Blue Sepharose CL-6B na ausência de cisteína 5mM.

Tabela I-3 – Purificação da TGase de *Streptomyces* sp CBMAI-837 em Blue Sepharose CL-6B na ausência de L-cisteína

Etapa	Proteína total (mg)	Atividade e total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
EEBC	21,70	4,32	0,20	100	1,0
F1 (3 - 7)	13,57	1,19	0,09	28	0,1
F2 (28 - 31)	1,40	0,58	0,41	13	2,1

A fração 2, eluída durante o gradiente salino, foi purificada cerca de 2 vezes, sendo obtido rendimento de 13% após purificação do extrato enzimático bruto (EEBC) em uma única etapa cromatográfica em resina Blue Sepharose CL-6B equilibrada com tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 8,0. Apenas 40,8% do total de atividade de TGase aplicado à coluna cromatográfica foi recuperada ao longo da corrida. Lima (2010) recuperou cerca de 27% do total de atividade de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 aplicado à coluna cromatográfica de Blue Sepharose CL-6B equilibrada com tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 8,0, porém o processo de purificação foi realizado em coluna aberta e não com o auxílio do FPLC, o que pode elevar o tempo da purificação.

Na purificação do EEBC de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em resina Blue Sepharose CL-6B equilibrada em tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH8,0 contendo 5mmol.L⁻¹ de cisteína, foram também obtidos dois picos com atividade de TGase. O primeiro pico (F1-CIS) de atividade de TGase correspondeu a cerca de 63% da atividade de TGase recuperada em todo o ensaio enquanto o segundo

pico (F2-CIS) eluído com o gradiente salino representou cerca de 28% da atividade de TGase recuperada.

A fração F2-CIS foi purificada cerca de 5 vezes com rendimento de 30,8% (**Tabela I-4**) indicando que a adição de L-cisteína 5mmol.L⁻¹ no tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 8,0 para a purificação da enzima em resina Blue Sepharose CL-6B contribuiu para o aumento da estabilidade da enzima, comparado com a purificação da enzima sem adição de L-cisteína no sistema tampão.

Tabela I-4 – Purificação da TGase de *Streptomyces* sp CBMAI-837 em Blue Sepharose CL-6B na presença de L-cisteína

Etapa	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
EEBC	51,59	6,47	0,13	100	1,0
F1-CIS (6 - 11)	29,67	3,88	0,13	60	1,0
F2-CIS(28 - 31)	3,10	1,99	0,64	30,8	5,1

I.4.2.1. pH ótimo de atividade da fração transglutaminase purificada

A **Figura I-7** apresenta os valores de atividade relativa de TGase para o extrato enzimático bruto (EEB), extrato enzimático bruto concentrado (EEBC) e da fração purificada (F2-CIS) em 4 valores de pH (6,0, 7,0, 10 e 11). As letras na figura referem-se ao teste de Tukey realizado para cada valor de pH a 95% de confiança.

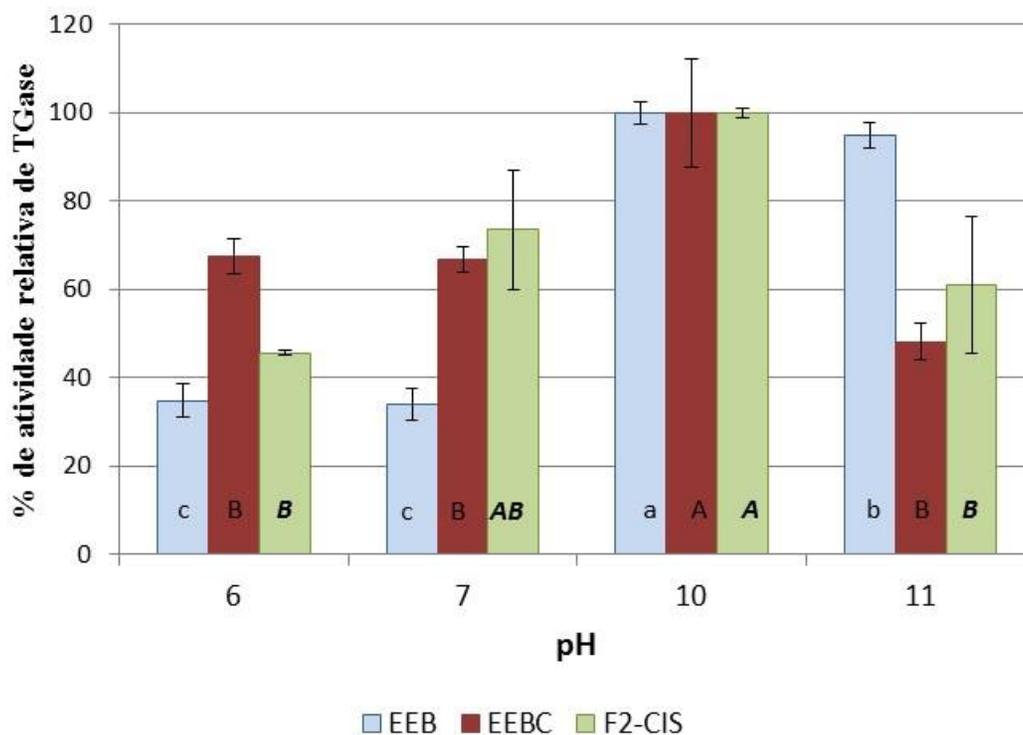


Figura I-7 – Atividade relativa do extrato enzimático bruto, EEBC e fração pura (F2-CIS) da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em pH 6,0, 7,0, 10,0 e 11,0.

O extrato enzimático bruto (EEB) apresentou máxima atividade de TGase em pH 10. Em pH 11 o extrato de TGase apresentou 94% de atividade relativa. Nos valores de pH 6,0 e 7,0 não foi observada diferença significativa entre as atividades de TGase, sendo que, em média, a atividade relativa foi de 34,4%. Estudos anteriores indicaram que a percentagem de atividade de TGase do extrato enzimático bruto de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em pH 6 foi 60% e em pH 7 foi 21%, utilizando tampão Tris-HCl 0,05 mol.L⁻¹ (Bagagli,2009; Macedo, 2009) e leitura de absorvância a 525 nm.

O extrato enzimático bruto concentrado (EEBC) apresentou máxima atividade de TGase em pH 10, sendo que em pH 6,0, 7,0 e 11 não foi observada diferença estatística significativa entre os valores, sendo que a atividade relativa média foi de 61%.

A fração F2-CIS apresentou maior atividade de TGase em pH 10. Em pH 7,0 a atividade relativa de TGase foi de 73%, não diferindo estatisticamente do valor de atividade obtida para o pH 10 e 6,0, a 95% de confiança. No pH 11, a enzima apresentou atividade relativa de 61% não diferindo estatisticamente do pH 6,0.

De forma geral o extrato de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 bruto, concentrado e o purificado em Blue Sepharose CL-6B apresentou pH ótimo de atividade em pH 10. O extrato bruto (EEB) apresentou atividade enzimática elevada em pH 11, no entanto a atividade em pH 11 decaiu significativamente com a concentração da enzima (EEBC), porém não houve diferença estatística entre a atividade relativa do EEBC e da fração purificada F2-CIS.

Em pH 7,0 o EEB apresentou a menor atividade relativa entre todas as amostras (34%), no entanto, para o EEBC houve um aumento significativo de 33% na atividade relativa de TGase. A fração pura também apresentou maior atividade relativa em pH 7,0, não diferindo estatisticamente das atividades observadas em pH 10.

Desta forma, a concentração e purificação do extrato enzimático bruto de TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 elevaram a atividade de TGase em pH 7,0, fato que favorece a aplicação da enzima neste pH, e reduziu em pH 11.

Macedo (2009) e Bagagli (2009) verificaram que o extrato enzimático bruto de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 apresentou 2 picos de atividade de TGase, em pH 6,5 e em pH 10, indicando a presença de isoenzimas.

I.4.3. Purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em resina Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (FF)

A **Figura I-8** ilustra a purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em resina Phenyl Sepharose 6 FF estabilizada em pH 7,5 e 8,0.

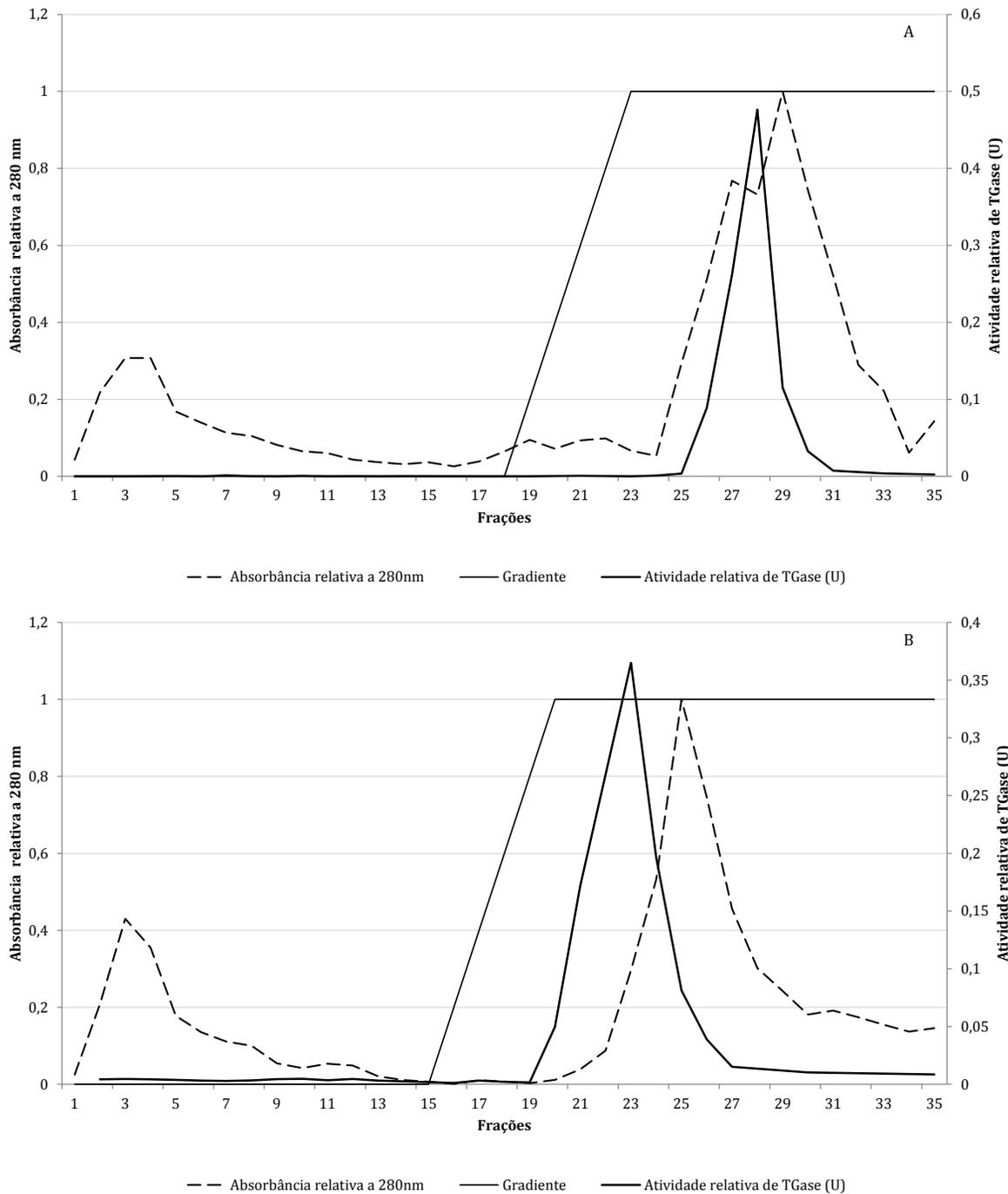


Figura I-8 - Purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em resina Phenyl Sepharose 6 FF em tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ adicionado de 1,5 mol.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ em (A) pH 7,5 e (B) pH 8,0.

Desta forma, na purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 nas colunas de Phenyl Sepharose 6 FF equilibrada em tampão fosfato 0,05M pH 7,5

e 8,0 contendo 1,5M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e eluição por diminuição da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no tampão de 1,5M para zero, foi detectado somente um pico de atividade de TGase.

A enzima foi eluída mais rapidamente utilizando-se sistema tampão fosfato 0,05M pH 8,0 (maior pico na fração 23) em comparação com o sistema tampão fosfato 0,05M pH 7,5 (maior pico na fração 28).

A **Tabela I-5** apresenta o fator de purificação e o rendimento para o ensaio de purificação do extrato enzimático bruto de TGase pelo princípio da interação hidrofóbica.

Tabela I-5- Purificação do extrato enzimático bruto de TGase de *Streptomyces* sp CBMAI-837 em coluna Phenyl Sepharose 6 FF equilibrada com tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,5 ou 8,0 contendo 1,5 mol.L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Etapa		Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
pH 7,5	EEB	280,00	65,00	0,23	100	1,0
	F 28	20,68	28,37	1,37	28	5,9
pH 8,0	EEB	116,86	5,16	0,04	100	1,0
	F 23	3,61	1,83	0,51	36	11,5

Foram obtidos melhores resultados de purificação da TGase em coluna Phenyl Sepharose 6 FF equilibrada com tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 8,0 contendo 1,5 mol.L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sendo observada purificação de 11,5 vezes e rendimento de 36%.

Trabalhos anteriores indicam que a TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 é mais ativa e mais estável em pH 8,0 do que em pH 7,5 (Macedo, 2009; Bagagli, 2009; Lima 2010) o que pode ter contribuído para obtenção de maior rendimento durante a purificação em pH 8,0.

Suzuki et al. (2001) utilizaram a coluna Phenyl Sepharose FF para purificar a TGase de esporos de *Bacillus subtilis*, sendo a enzima purificada 37

vezes com rendimento de 40%. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-HCl pH 9,0 contendo 0,75 mol.L⁻¹ de MgSO₄. O tampão de eluição foi o Tris-HCl pH 9,0 contendo 10% de etilenoglicol.

O (NH₄)₂SO₄ apresenta o cátion e o ânion nos extremos de efeito “*salting out*” da série de Hofmeister enquanto que o MgSO₄ é um sal intermediário nesta série. Desta forma, o sistema de purificação utilizado por Suzuki et al. (2000) proporcionou à enzima um ambiente menos hidrofóbico que o sistema contendo o sulfato de amônio, minimizando a inativação e precipitação da enzima e favorecendo sua ligação com a resina. Esta estratégia pode ser uma alternativa para melhorar o fator de purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837.

1.4.4. Purificação da TGase de Streptomyces sp. CBMAI-837 em Activated Thiol Sepharose 4B

A **Figura I-9** ilustra a purificação da TGase de *Streptomyces* sp CBMAI-837 aplicando o princípio da interação covalente através da resina Activated Thiol Sepharose 4B, sendo apresentadas as absorbâncias a 280 nm e a 343 nm.

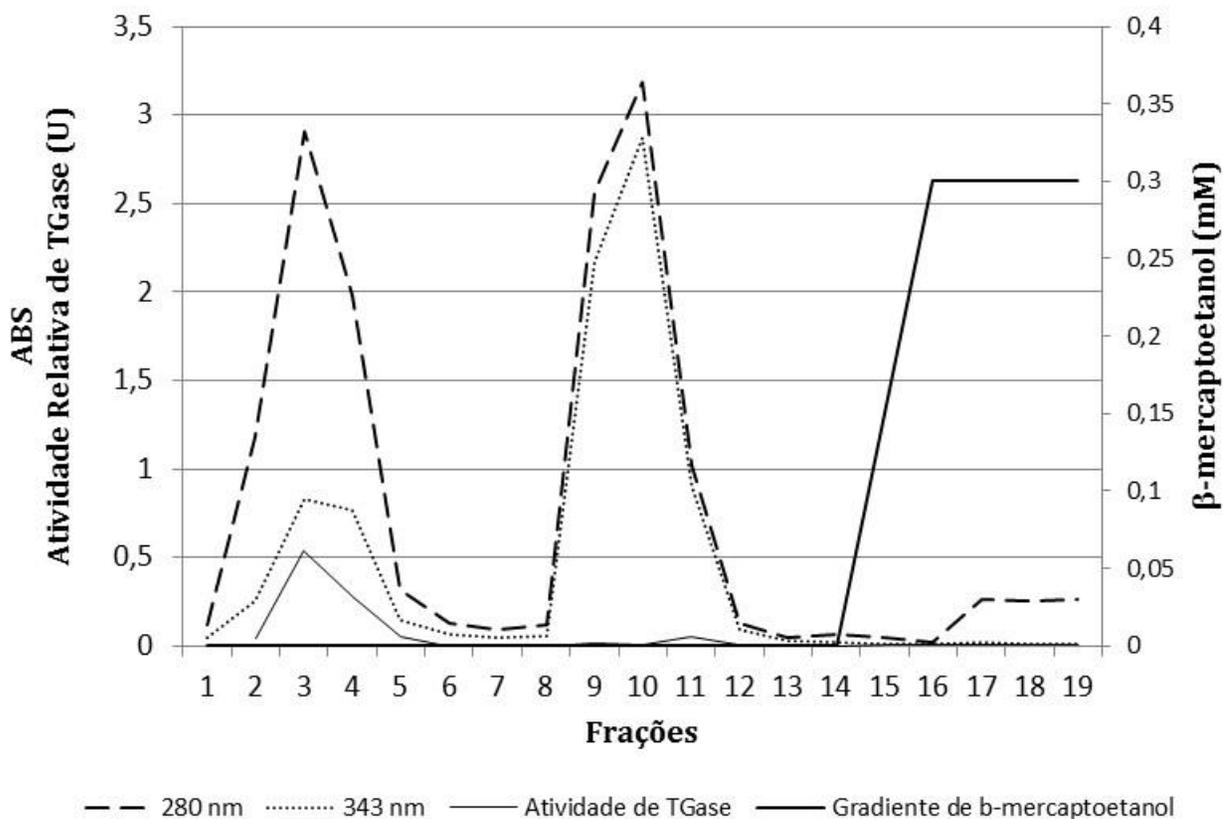


Figura I-9 - Purificação da TGase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 em resina Activated Thiol Sepharose 4B em tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH8,0 adicionado de 1mmol.L⁻¹ de EDTA e 0,3 mol.L⁻¹ de NaCl

Foram observados 2 picos com atividade de TGase eluídos antes do gradiente linear de β-mercaptoetanol em tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH8,0 adicionado de 1mmol.L⁻¹ de EDTA e 0,3 mol.L⁻¹ de NaCl, indicando baixa afinidade da enzima pela resina nas condições avaliadas.

A elevada absorbância a 343 nm observada próximo as frações de 9 a 11 indica que o composto 2-tiopiridona foi liberado. Este fato pode ter ocorrido devido a interação de proteínas com a resina. No entanto, durante o gradiente de β-mercaptoetanol não foi observada atividade de TGase. Este fato pode ter ocorrido por perdas na atividade enzimática devido a interação da enzima com o composto 2-tiopiridona, perda de atividade enzimática ou mesmo pela

necessidade de concentração mais elevada de β -mercaptoetanol para eluir a enzima.

A **Tabela I-6** apresenta o fator de purificação e o rendimento para o ensaio de purificação pelo princípio da interação covalente.

Tabela I-6- Purificação da TGase de *Streptomyces* sp CBMAI-837 em coluna Activated Thiol Sepharose 4B Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH8,0 adicionado de 1mmol.L⁻¹ de EDTA e 0,3 mol.L⁻¹ de NaCl

Etapa	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
EEBC	13,36	1,05	0,057	100,0	1,0
F1 (3)	5,25	0,54	0,074	51,4	1,3
F2 (11)	0,30	0,05	0,0213	5,1	2,3

Desta forma, a fração F2 obtida na purificação do extrato enzimático bruto concentrado em resina Activated Thiol Sepharose 4B Tris-HCl 0,1M pH8,0 adicionado de 1mmol.L⁻¹ de EDTA e 0,3 mol.L⁻¹ de NaCl apresentou fator de purificação de 2,3 com rendimento de 5,1%.

I.4.5. Perfil eletroforético (SDS-PAGE)

A **Figura I-10** ilustra o perfil eletroforético do extrato enzimático bruto concentrado (EEBC) e das frações purificadas nas resinas Blue Sepharose CL-6B estabilizada em tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 8,0 na presença de 50mmol.L⁻¹ de L-cisteína e em resina Phenyl Sepharose 6 FF estabilizada em tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,5 e 8,0 contendo 1,5 mol.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄.

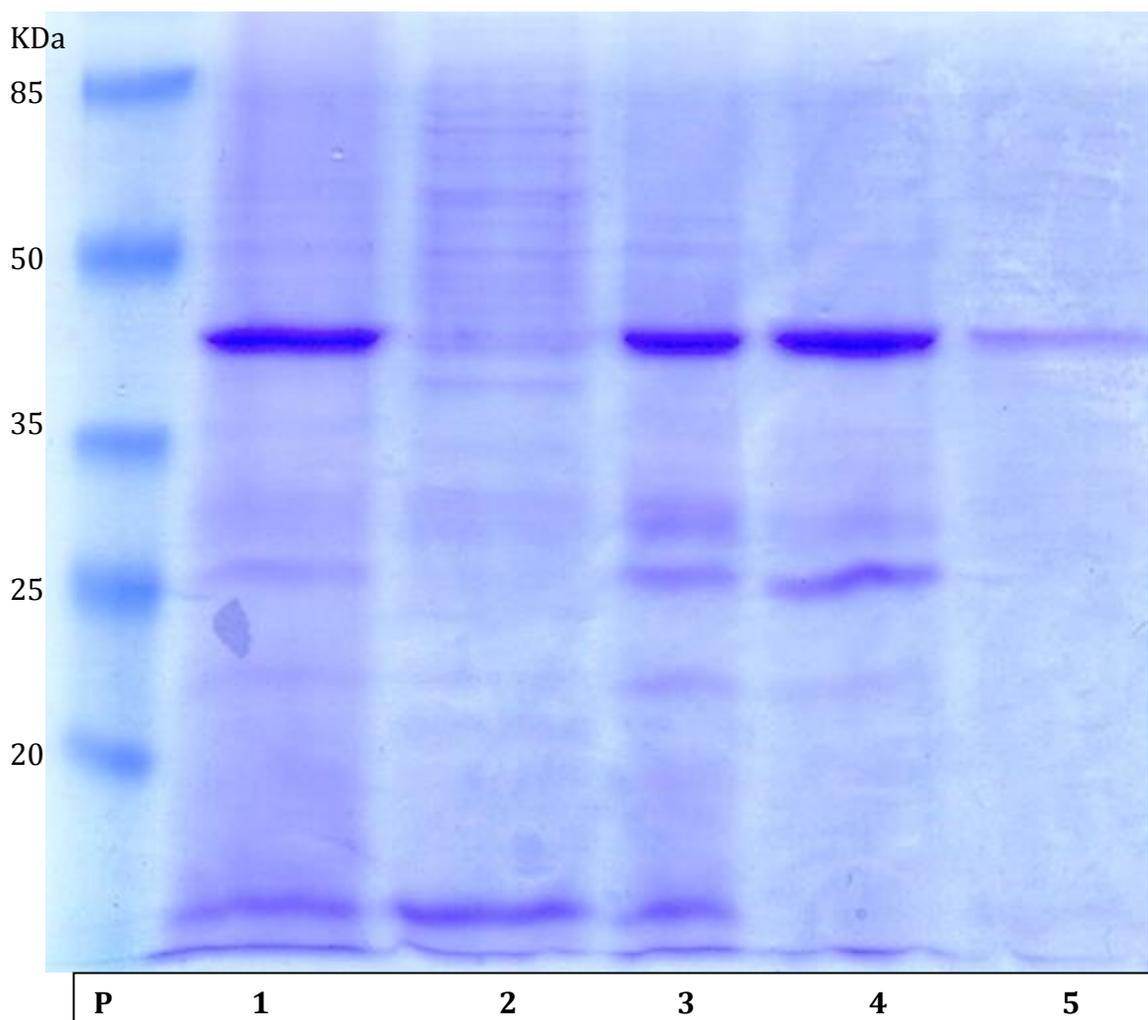


Figura I-10 -Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do extrato enzimático concentrado e frações puras.

Padrão de massa molecular (coluna P); EEBC (coluna 1); Fração purificada em resina Phenyl Sepharose 6 FF pH 8,0 (coluna 3); Fração purificada em resina Phenyl Sepharose 6 FF pH 7,5 (coluna 4); F1-CIS da resina Blue Sepharose CL-6B (coluna 2); F2-CIS resina Blue Sepharose CL-6B (coluna 5).

Observou-se que a amostra obtida do segundo pico (F2-CIS) da purificação do EEBC em resina Blue Sepharose na presença de 5mmol.L^{-1} de L-cisteína apresentou apenas uma banda no gel e este ficou localizado próximo a massa molecular de 40 KDa, fato compatível com o apresentado por Macedo

(2009). No entanto, foi identificada atividade enzimática em todos os pH avaliados (pH 6, 7, 10 e 11) indicando que a fração pode conter isoenzimas.

As frações obtidas da purificação da TGase em resina Phenyl Sepharose 6 FF apresentaram mais de uma banda, equiparando-se ao perfil eletroforético obtido para o EEBC. Desta forma, outras etapas de purificação são necessárias para elevar a pureza da TGase.

Para as frações obtidas na purificação em resina Activated Thiol Sepharose 4B não foi possível observar bandas no gel de eletroforese uma vez que amostra estava muito diluída.

I.5. Conclusões

Entre os compostos testados para aumentar a estabilidade da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI-837 foram obtidos melhores resultados adicionando-se 5mmol.L⁻¹ de L-cisteína e 3% de glicerol, sendo obtido retenção de cerca 18% da atividade inicial de TGase após 120 horas de incubação à 20°C.

A adição de 5mmol.L⁻¹ de L-cisteína no tampão fosfato para purificação da TGase em resina Blue Sepharose CL-6B resultou em maior rendimento das frações F1-CIS (60%) e F2-CIS (30,8%) comparado com o ensaio de purificação sem adição de L-cisteína. A fração F2-CIS foi purificada 5,1 vezes utilizando-se coluna de Blue Sepharose CL-6B equilibrada com tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH8,0 contendo 5mmol.L⁻¹ de L-cisteína, sendo observada uma única banda em SDS-PAGE de massa molecular estimada em 40 kDa.

No estudo de purificação da TGase utilizando-se a resina de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose 6FF equilibrada em tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 8,0 contendo 1,5 mol.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, foi obtido um único pico com atividade de TGase, e fator de purificação de 11,5. As frações com atividade de

TGase apresentaram mais de uma banda de proteína em SDS-PAGE, similar ao perfil do EEB, indicando que mais etapas são necessárias para a purificação da enzima.

No estudo de purificação da TGase em resina Activated Thiol Sepharose equilibrada com tampão Tris-HCl pH 8,0 adicionado de 1 mmol.L⁻¹ de EDTA e 0,3 mol.L⁻¹ de NaCl, foi observado que as frações apresentaram baixa atividade de TGase, indicando que a enzima foi desnaturada durante a cromatografia.

I.6. Referências

Bagagli, M. P., 2009. Produção de transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20, caracterização e aplicação da enzima bruta. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 113 p.

Belghith, H., Chaabouni, S.E., Gargouri, A., (2001). Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of maltodextrin. ***Enzyme and Microbial Technology***, 28, 253 – 258.

Carlsson J, Batista-Viera F .,(1991) Solid phase disulfide oxides: a new approach to reversible immobilization and covalent chromatography of thiol compounds. ***Biotechnol Appl Biochem*** 14:114–120.

Cui, L., Du, G., Zhang, D., Chen, J., (2008). Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. ***Bioresource Technology***, 99, 3794-3800.

Cui, L., Du, G., Zhang, D., Liu, H., Chen, J., (2007). Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. ***Food Chemistry***, 105, 612-618.

Kutermeyer, C., Froeck, M., Werlein, H. D., Watkinson, B. M., 2005. The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. ***Food Control***,16, 735-737.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685.

Lee, J.C., Timasheff, S.N., 1981. The stabilization of proteins by sucrose. **The Journal of Biological Chemistry**, 256(14), 7193 – 7201.

Lu, S.Y., Zhou, N.D., Tian, Y.P., Li, H.Z., Chen, L., 2002. Purification and properties of transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*, **Journal of Food Biochemistry**, 27, 109 – 125.

Macedo, J. A. Produção, purificação, caracterização e aplicação de transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Junho de 2009.

Ó'fágáin, C., 2003. Enzyme stabilization – **Recent experimental progress**. **Enzyme and Microbial Technology**, 33(2), 137-149.

Sakamoto, H., Motoki, M., Soeda, T., Ando, H., Umeda, K., Matura, A., (1992). Stabilizer composition for transglutaminase. **Japanese Kokai Kokkyo Koho JP** 04207194, 1992.

Souza, C. F. V., Faccin, D. J. L., Mertins, O., Heck, J. X., Silveira, N. P., Secchi, A. R., Ayub, M. A. Z.,(2009). Kinetics of thermal inactivation of transglutaminase from a newly isolated *Bacillus circulans* BL32. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 84(10), 1567-1575.

Umezawa, Y., Ohtsuka, T., Yokoyama, K.; Nio, N., 2002. Comparison of enzymatic properties of microbial transglutaminase from *Streptomyces* sp. **Food Science and Technology Research**, 8(2), 113-118.

Zaia, D.A.M., Zaia, C. T. B.V., Lichtig, J., (1998). Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, 21(6), 787 – 793.