

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

JULIANA CRISTINA BASSAN

**Hidrolisados parciais de soro proteínas lácteas bovina e bubalina obtidos com proteases
imobilizadas: ensaios de transporte e absorção de peptídeos através das técnicas da
dialisabilidade e cultura de células Caco-2.**

Araraquara – SP

2015

JULIANA CRISTINA BASSAN

Hidrolisados parciais de soro proteínas lácteas bovina e bubalina obtidos com proteases imobilizadas: ensaios de transporte e absorção de peptídeos através das técnicas da dialisabilidade e cultura de células caco-2.

Tese apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista-UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Araraquara – SP

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- B317h** Bassan, Juliana Cristina
Hidrolisados parciais de soro proteínas lácteas bovina e bubalina obtidos com proteases imobilizadas : ensaios de transporte e absorção de peptídeos através das técnicas da dialisabilidade e cultura de células Caco-2 / Juliana Cristina Bassan – Araraquara, 2015
143 f.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Rubens Monti
1. Soro de queijo. 2. Imobilização. 3. Pó de sabugo de milho. 4. Proteases. 5. Hidrolisados. 6. Dialisabilidade. 7. Células Caco-2. I. Monti, Rubens, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

DEDICATÓRIA

À DEUS,

por sempre estar à frente de minha vida ajudando-me nos momentos de incerteza e saudade. Agradeço pela minha vida e por ser meu refúgio e atender às minhas preces, pela minha família, por meus amigos e pelo amor a nós dedicado.

Muito obrigada!

À minha família, razão da minha vida,

pelo apoio e amor incondicional. Por ter me ensinado e encorajado a lutar pelos meus sonhos. À minha mãe Marlene, que apesar de todas as dificuldades e perdas, soube educar seus filhos com muito amor e sabedoria. Ao meu irmão André pelo grande companheiro que é e por sempre me socorrer nos momentos de dificuldade; e à minha irmã Natália por ser a “caçulinha” mais mimada e amorosa. Também agradeço ao meu amado pai José (in memoriam), que apesar de ter nos deixado prematuramente, sempre foi meu exemplo e me ensinou desde cedo que o trabalho dignifica um homem.

Obrigado Pai, Mãe e Irmãos...sem vocês nada seria!

AGRADECIMENTOS

À minha família: meus pais, José (*in memoriam*) e Marlene, meus irmãos André e Natália, pelo apoio e respeito as minhas escolhas, pela compreensão nos momentos de ausência e acima de tudo pela confiança e amor.

Ao amigo, orientador e grande homem, Prof. Dr Rubens Monti, por ter me dado à oportunidade de desenvolver o tão desejado Doutorado. Pelo carinho e respeito com que trata seus alunos, fazendo de nossos dias no laboratório momentos de muita aprendizagem, satisfação e descontração. Por sempre estar disposto a nos ajudar e aconselhar, além de nos incentivar e acreditar em nosso potencial. Por ser uma pessoa amorosa que cuida de seus orientados como se fossem parte de sua família. Prof. Rubens Monti, obrigada por compartilhar seu conhecimento e solidificar em mim a paixão pela pesquisa. Peço a Deus que um dia eu possa me tornar uma profissional com a competência que tem nos ensinado.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Clariana, Thaís, Julián, Ana Nasser, Andréa, Caio, Elen, Fernando, Eddyn pelos momentos de muita descontração e por estarem sempre disponíveis e me ajudando a concretizar o Doutorado. Vocês com certeza tornaram meus dias mais fáceis, dividindo saudades e comemorando as conquistas.

Aos meus amigos Ana Pucca, José Fernando, Raquel, Mariana, Ederlan e muitos outros que tive o privilégio de conhecer através da Pós-Graduação, o meu muito obrigado!

Aos amigos Aline e Prof. Saulo Santesso (Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara) pelo suporte, ajuda, disposição e cromatogramas de última de hora. Pela parceria de anos com nosso Laboratório.

Ao amigo Rone De Grandis pelo ajuda e paciência em um dos momentos mais complicados de meu doutorado. Eu e as células Caco-2 agradecemos por toda competência durante os meses de experimento.

À Profa Dra Eliana Aparecida Varanda (Laboratório de Mutagênese da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara) pela amizade e por colocar seu Laboratório à minha disposição para o cultivo de células Caco-2. Sem essa abertura e parceria tudo seria mais difícil.

Ao Prof. Dr. André Ferraz e Doutor Vitor Tabosa de Oliveira Santos (Laboratório de Ciências da Madeira da Escola de Engenharia de Lorena – USP) por abrirem as portas de seu laboratório para nos ensinar e ajudar com parte da caracterização dos resíduos lignocelulósicos utilizados em nosso laboratório.

Ao CEMPEQC (Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados) pelos serviços prestados.

Ao Prof. Dr. Valdir Augusto Neves, Ms. Ana Lúcia Amaral (Ana Pucca) e Maraiza Silva (Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara) pela amizade e ajuda no entendimento de protocolos e procedimentos experimentais.

Ao amigo e pesquisador Dr. Marco Filice (Instituto de Catálisis y Petroleoquímica – CSIC Madrid-España) pela grande parceria e contribuição científica que vem prestando ao nosso laboratório. Sempre que precisei estava pronto para tirar minhas dúvidas.

Ao amigo e parceiro de trabalho Prof. Dr. Guilherme Peixoto (Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara) por incrementar nossa linha de pesquisa com conhecimento sobre Engenharia de Reatores. Com certeza sua ajuda e trabalho trouxeram novas perspectivas de projetos e os resultados já começaram a ser colhidos.

À amiga e parceira Profa. Dra Ariela de Paula Veloso (Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara) pela presença em minha vida e ajuda para todas as horas.

Ao Sr. Sebastião Anésio Dametto (Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química de Araraquara) pela simpatia e serviços prestados.

À Profa Alice Yoshiko Tanaka, minha amiga querida, a qual sou eternamente grata por ter me ajudado a chegar até a UNESP/ARARAQUARA. Mulher admirável e que tenho como uma segunda mãe, pois sempre esteve comigo me aconselhando em todos os momentos em que precisei. Obrigada pelos ensinamentos valiosos que compartilhou e ainda compartilha.

À minha querida amiga Delfina Alfredo Manjate que mesmo longe, está sempre comigo, proporcionando momentos de muita descontração, dividindo experiências e acreditando em meu potencial. Amiga, você é exemplo de vida.

Aos meus amigos queridos Cléber e Clariana que pelo pouco tempo que nos conhecemos já fazem parte de minha vida. Por vocês tenho um imenso respeito e carinho.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo conhecimento oferecido e ajuda nos momentos em que foram solicitados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e principalmente ao Departamento de Alimentos e Nutrição pela oportunidade oferecida.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro, tão necessário. (Projeto nº 2012/07680-4).

Aos que aqui não foram citados, mas que direta ou indiretamente fizeram e fazem parte de minha trajetória e cooperaram para conclusão desse projeto.

A todos o meu MUITO OBRIGADO!

RESUMO

As proteases são importantes enzimas industriais com vasta área de aplicação. Como catalisam a hidrólise de proteínas, são amplamente exploradas na produção de hidrolisados proteicos a partir das proteínas do leite (caseínas e soro de queijo), soja e peixe, gerando produtos de alto valor agregado. Neste trabalho, a tripsina (EC 3.4.2.1.4) e pepsina (EC 3.4.23.1) foram imobilizadas em suporte alternativo de baixo custo pó de sabugo de milho (SM) para a obtenção de hidrolisados parciais do soro de queijo bovino e bubalino, principal subproduto da indústria de laticínios. O suporte pré-tratado foi ativado com grupos glioxil e IDA-glioxil (tripsina) e glutaraldeído (tripsina e pepsina). Os derivados apresentaram rendimentos de imobilização maiores que 80% para a tripsina e 90% para a pepsina com atividades recuperadas maiores que 85% e 94%, respectivamente. O derivado de tripsina-glioxil-SM exibiu uma excelente estabilidade térmica a 65 ° C, que foi 1111 vezes maior em comparação à enzima livre seguido pelos derivados tripsina-IDA-glioxil-SM (900 vezes) e tripsina-glutaraldeído-SM (5,38 vezes). Para o derivado pepsina-glutaraldeído-SM a estabilidade térmica foi realizada em 45°C e foi 1,42 vezes maior com relação à enzima livre. Os derivados estabilizados tripsina-glioxil-SM e pepsina-glutaraldeído-SM foram empregados em um reator de leito empacotado para hidrólise do lactosoro bovino e bubalino. A relação derivado enzimático/volume útil foi de 1:2 e o processo foi conduzido a 45°C com uma vazão de 10,1mL/h. Para a hidrólise, os soros de queijo bovino e bubalino foram dialisados e tratados com caulim para a redução dos teores de lactose e gordura, respectivamente. Os hidrolisados foram fracionados por cromatografia de filtração em gel (Sephadex G25) para obtenção de *pools* de peptídeos <5kDa. O transporte e a absorção de cada um dos *pools* de peptídeos foram avaliados pelos métodos *in vitro* da simulação da digestão gastrointestinal/dialisabilidade e por monocamada de células Caco-2. O perfil qualitativo do produto final de cada etapa experimental foi analisado por RP-HPLC. Os soros de queijo bovino e bubalino tratados apresentaram uma concentração de proteínas de 7,2 mg/mL e 9,8 mg/mL, respectivamente. A hidrólise parcial foi conseguida com sucesso para todas as condições testadas. Os perfis de hidrólise qualitativos totais foram semelhantes para os hidrolisados interespecies, entretanto perfis diferentes foram obtidos de acordo com a especificidade catalítica de cada derivado enzimático empregado. Na dialisabilidade os perfis cromatográficos indicaram que os diferentes *pools* de peptídeos foram efetivamente modificados após a digestão simulada havendo a difusão de poucas frações peptídicas para o interior da membrana de diálise. Na simulação do transporte e absorção pela monocamada de

células Caco-2 não houve absorção de frações de peptídeos para nenhum dos *pools* de peptídeos testados. Esses resultados sugerem que a ingestão oral de peptídeos que possam ter alguma atividade bioativa é ainda um grande desafio, já que a manutenção de sua estrutura é crucial para desempenhar efetivamente o binômio estrutura/função.

ABSTRACT

Proteases are important industrial enzymes with wide range of application. They catalyze the hydrolysis of proteins and are widely exploited in the production of protein hydrolysates from milk protein (casein and whey), soy and fish, generating high value-added products. In this work, trypsin (EC 3.4.21.4) and pepsin (EC 3.4.23.1) were immobilized on a low cost alternative support, corn cob powder (CCP) to obtain partial hydrolysates of bovine and buffalo cheese whey, the main by-product of the dairy industry. The pretreated support was activated with glyoxyl and IDA-glyoxyl groups (trypsin) and glutaraldehyde (trypsin and pepsin). The derivatives showed immobilization yields higher than 80% and 90% for trypsin and pepsin, respectively, and recovered activities higher than 85% for trypsin derivatives and 94% for pepsin derivative. The derivative trypsin-glyoxyl-CCP showed excellent thermal stability at 65 ° C, which was 1111 times higher that obtained with free enzyme, followed by derivative trypsin-IDA-glyoxyl-CCP (900-fold) and trypsin-glutaraldehyde-CCP (5.38-fold). For the derivative pepsin-glutaraldehyde-CCP the thermal stability was held at 45 ° C and was 1.42 times greater than the free enzyme. Stabilized derivatives trypsin-glyoxyl-CCP and pepsin-glutaraldehyde-CCP were used in a packed bed reactor for the hydrolysis of bovine and buffalo cheese whey. The relationship derivative/working volume was 1:2 and the process was conducted at 45 ° C with a flow of 10.1mL/h. For the hydrolysis, bovine and buffalo cheese whey were dialyzed and treated with kaolin to reduce lactose and fats, respectively. The hydrolysates were fractionated by gel filtration chromatography (Sephadex G25) to obtain 5kDa peptide pools. The transport and absorption of each peptide pools were evaluated by *in vitro* methods simulating the gastrointestinal digestion/dialysability and by Caco-2 cell monolayer. The qualitative profile of the end product of each experimental phase was analyzed by RP-HPLC. The treated bovine and buffalo cheese whey presented protein concentration of 7.2 mg/mL and 9.8 mg/mL, respectively, and partial hydrolysis was successfully achieved for all conditions tested. The qualitative total hydrolysis profiles were similar for interspecies hydrolysates, however different profiles were obtained by the catalytic specificity of each derivative employed. Chromatographic profiles of the samples obtained after dialysability indicated that the different peptides pools were effectively modified by the simulated digestion, occurring the diffusion of few peptide fractions into the interior of the dialysis membrane. In the simulation of the transport and absorption through the Caco-2 cell monolayer there was no absorption of peptide fractions to the basal side of the monolayer of any tested peptides pools. These results suggested that oral intake of peptides which may have

some bioactive activity is still a great challenge, since maintaining its structure is crucial to effectively preserve the binomial structure/function.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais métodos de imobilização de enzimas.....	7
Capítulo 1	25
Figure . Upflow packed-bed reactor.	33
Figura 2. Scanning electron microscopy of corn cobs powder after physicochemical pretreatment: Natural fiber 1000 X (A) and 2000 X (C); Thermal decompression in 70% ethanol + 2M NaOH (8°C/24 h in slow stirring) 1000 X (B) and 2000X (D).....	35
Figura 3. Infrared analysis of corn cobs powder. Non-treated CCP (solid line) and pretreated CCP (dotted line).	36
Figura 4. Porosity of the pretreated corn cob powder. The accessible volume per gram of CCP was performed by solute exclusion technique. Six probes with sizes between 20 and 553 Å were used.	37
Figura 5A. Thermal stability of free trypsin and derivatives. (■) trypsin–glyoxyl–agarose derivative; (●) trypsin–glyoxyl–CCP derivative. The inner graph represents the time-course of thermal stability of (♦) free trypsin; (▲) trypsin–glutaraldehyde–agarose derivative; (○) trypsin–glutaraldehyde–CCP–derivative. Experiments were carried out at 65°C and pH 8.0. The activity was measured at 25°C and pH 9.0	39
Figura 5B. Thermal stability of free trypsin and derivatives. (■) trypsin–IDA–glyoxyl–agarose derivative; (●) trypsin–IDA–glyoxyl–CCP derivative. The inner graph represents the time-course of thermal stability of (♦) free trypsin; (▲) trypsin–glutaraldehyde–agarose derivative; (○) trypsin–glutaraldehyde–CCP–derivative. Experiments were carried out at 65°C and pH 8.0. The activity was measured at 25°C and pH 9.0.....	40
Figura 6. 3D surface structure of trypsin (pdb code 5ptp): Trypsin structure with external lysine residues marked in green. 3D surface structure of trypsin was obtained using PyMol 1.7.4.4.	41
Figura 7. Hydrolysis profile of the cheese whey proteins performed by RP-HPLC. A comparison between the first and fifth cycles of reuse derivatives stabilized trypsin–glyoxyl–AG (A1 and A5) and CCP (B1 and B5); trypsin–IDA–glyoxyl–AG (C1 and C5) and CCP (D1 and D5).	42
Figura 8. Reuse cycles with stabilized trypsin derivatives.....	43
Figura 9. Relative activities of the stabilized trypsin derivatives after five reuse cycles.	44
Figura 10. Response curve “E” for the hydrodynamic essay.	44
Capítulo 2	51

Figura 1. Esquema simplificado ilustrando o processo de ativação do suporte glioxil contendo grupos aldeídos alifáticos.....	60
Figura 2. Esquema simplificado ilustrando o processo de ativação do suporte monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE ou amino) contendo aminos primários.....	61
Figura 3. Esquema simplificado ilustrando o processo de ativação do suporte glutaraldeído.....	62
Figura 4. Curva analítica de tirosina para determinação da atividade enzimática da enzima pepsina.....	63
Figura 5. Ilustração da imobilização covalente unipontual de enzimas em suporte glutaraldeído. A imobilização ocorre através do amino terminal da enzima.....	65
Figura 6. Curva analítica de SBA para determinação de proteínas no soro de queijo segundo o método de Bradford (1976).....	67
Figura 7. Curva analítica de lactose para determinação de açúcar redutor no soro de queijo segundo o método de Miller (1959).....	67
Figura 8. Esquema ilustrando o uso de reator em batelada para a hidrólise das proteínas do queijo bovino e bubalino utilizando o derivado enzimático SM-glutaraldeído-pepsina.....	68
Figura 9. Esquema ilustrando o uso de reator de leito fixo para a hidrólise das proteínas do queijo bovino e bubalino utilizando os derivados enzimáticos SM-glutaraldeído-pepsina.....	69
Figura 10. Efeito do pH na atividade da enzima pepsina solúvel.....	70
Figura 11. Efeito da temperatura na atividade da enzima pepsina solúvel.	71
Figura 12. Estabilidade da pepsina solúvel em diferentes valores de pH.....	72
Figura 13. Estabilidade térmica da pepsina solúvel frente à diferentes temperaturas.	73
Figura 14. Inativação térmica a 45°C da enzima pepsina solúvel.....	74
Figura 15. Curso de imobilização da enzima pepsina suportes glutaraldeído em pH 5,8. A) suporte agarose-glutaraldeído; B) suporte SM-glutaraldeído.....	75
Figura 16. Efeito do pH na atividade da enzima pepsina imobilizada em diferentes suportes ativados. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.....	76

Figura 17. Efeito da temperatura na atividade da enzima pepsina imobilizada em diferentes suportes ativados. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.....	77
Figura 18. Estabilidade térmica dos derivados agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina comparados à enzima solúvel. Os experimentos foram realizados a 45°C e em pH 2,0.....	78
Figura 19. SDS-PAGE – 12% do soro de queijo bovino e bubalino antes e após hidrólise em reator de batelada com o derivado enzimático SM-glutaraldeído-pepsina. A coloração foi feita com Brilliant Blue G-coloidal (Sigma®). (A) Padrão de massa molecular (5µL); (B e D) soros de queijo bovino e bubalino não hidrolisados (20µL); (C e E) soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com o derivado SM-glutaraldeído-pepsina (20µL). A hidrólise foi conduzida a 45°C/24horas e o pH de hidrólise foi pH 2,0.....	79
Figura 20. SDS-PAGE – 12% do soro de queijo bovino e bubalino antes e após hidrólise em reator de leite empacotado com o derivado enzimático SM-glutaraldeído-pepsina. A coloração foi feita com Brilliant Blue G-coloidal (Sigma®). (A) Padrão de massa molecular (5µL); (B e D) soros de queijo bovino e bubalino não hidrolisados (20µL); (C e E) soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com o derivado SM-glutaraldeído-pepsina (20µL). A hidrólise foi conduzida a 45°C/24horas e o pH de hidrólise foi pH 2,0.....	80
Figura 21. Perfil cromatográfico qualitativo dos soros de queijo bovino e bubalino não hidrolisados (A e B) e hidrolisados (C e D) com SM-glutaraldeído-pepsina em reator de batelada (45°C/24 horas e pH 2,0).....	82
Figura 22. Perfil cromatográfico qualitativo dos soros de queijo bovino e bubalino não hidrolisados (A e B) e hidrolisados (C e D) com SM-glutaraldeído-pepsina em reator de leite empacotado (45°C/24 horas e pH 2,0).....	82

Capítulo3.....82

Figura 1. Esquema simplificado das diferentes condições de hidrólise dos soros de queijo bovino e bubalino em reator de leite empacotado com SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina.....	96
Figura 2. Fluxograma simplificado da dialisabilidade	99

Figura 3. Modelo de transporte e absorção de peptídeos através de monocamada de células Caco-2.....	102
Figura 4. Perfis qualitativos de hidrólise dos soros de queijo bovino e bubalino obtidos em reator de leite empacotado com os derivados SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina. Soro de queijo bovino e bubalino não hidrolisados (A e B); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina (C e D); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glioxil-tripsina (E e F); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (G e H).....	104
Figura 5. Perfil cromatográfico dos diferentes hidrolisados obtidos por filtração em gel (Sephadex G25): soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina (A e D); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glioxil-tripsina (B e E); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (C e F).....	105
Figura 6. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) dos diferentes <i>pools</i> de peptídeos <5kDa obtidos em Sephadex G25: soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina (A e B); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glioxil-tripsina (C e D); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (E e F).....	106
Figura 7. Simulação da digestão gastrointestinal e dialisabilidade dos diferentes <i>pools</i> de peptídeos (Sephadex G25) do soro de queijo bovino: pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina (A, A _{Dex} e A _{Din}); pool de peptídeos SM-glioxil-tripsina (B, B _{Dex} e B _{Din}); pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (C, C _{Dex} e C _{Din}). O perfil foi determinado por RP-HPLC.....	107
Figura 8. Simulação da digestão gastrointestinal e dialisabilidade dos diferentes <i>pools</i> de peptídeos (Sephadex G25) do soro de queijo bubalino: pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina (I, I _{Dex} e I _{Din}); pool de peptídeos SM-glioxil-tripsina (II, II _{Dex} e II _{Din}); pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (III, III _{Dex} e III _{Din}). O perfil foi determinado por RP-HPLC.....	108
Figura 9. Microscopia da monocamada de células Caco-2 em <i>inserts</i> Trasnwell ®: Foto tirada com microscópio Olympus (400X) após 21 dias de incubação.....	111
Figura 10. Simulação do transporte e absorção (permeabilidade) em monocamada de células Caco-2, dos diferentes <i>pools</i> de peptídeos (Sephadex G25) do soro de queijo bovino: pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina (A, A _{apical} e A _{basal}); pool de peptídeos SM-glioxil-tripsina	

(B, B_{apical}, B_{basal}); pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (C, C_{apical}, C_{basal}). O perfil foi determinado por RP-HPLC.....111

Figura 11. Simulação do transporte e absorção (permeabilidade) em monocamada de células Caco-2, dos diferentes pools de peptídeos (Sephadex G25) do soro de queijo bubalino: pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina (I, I_{apical} e I_{basal}); pool de peptídeos SM-glioxil-tripsina (II, II_{apical}, II_{basal}); pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (III, III_{apical}, III_{basal}). O perfil foi determinado por RP-HPLC.....112

Figura 12. Análise do tampão de transporte do ensaio de transporte e absorção (permeabilidade) através de monocamada de células Caco-2. O perfil foi determinado por RP-HPLC.....112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades funcionais de algumas frações proteicas do soro de queijo.....	10
Capítulo 1	25
Table 1. Chemical characterization of pretreated corn cob powder.	35
Tabela 2. Kinetic properties of trypsin immobilized on activated corn cob powder.....	38
Capítulo 2	51
Tabela 1. Procedimento para determinação da atividade proteolítica da pepsina.....	62
Tabela 2: Dosagem de proteínas dos soros de queijo bovino e bubalino tratado (deslactosado e desengordurado).....	78
Capítulo 3	82
Tabela 1. Dosagem de proteínas dos soros de queijo bovino e bubalino tratados (deslactosado e desengordurado).....	102
Tabela 2. Produtos lácteos comerciais com alegações de saúde ou de função com base em peptídeos biotivos.....	109

ABREVIATURAS

AG: agarose

BApNA: N α -Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide

BSA: soro albumina bovina

CCP: corn cob powder

CSTR: reator contínuo de tanque agitado

DBO: demanda bioquímica de oxigênio

DQO: demanda química de oxigênio

DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

EDA: etilenodiamina

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FTIR: Espectroscopia Infravermelho transformada de Fourier

GRAS: geralmente reconhecido como seguro

HD: grau de hidrólise

HRT: tempo de retenção hidráulica

IDA: ácido iminodiacético

KI: iodeto de potássio

MANAE: monoaminoetil-N-aminoetil

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: tampão fosfato salino

PFR: reator tipo pistão

RP-HPLC: Cromatografia líquida de fase reversa

SM: sabugo de milho

TCA: ácido tricloroacético

TEER: resistência elétrica transepitelial

TFA: ácido trifluoroacético

U: unidades enzimáticas

UPB: reator de leito empacotado

ANEXOS

Capítulo 1

Determinação de K_m (constante de Michaelis e Mentem) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima) aparentes da tripsina solúvel e derivados-tripsina estabilizados.....51

Capítulo 2

Reuso dos derivados AG-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina: determinação do grau de hidrólise e atividade relativa após 5 ciclos de reuso.....87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
1.1 ENZIMAS INDUSTRIAIS	2
1.2 PROTEASES	3
1.2.1 PROTEASES DIGESTIVAS: PEPSINA E TRIPSINA.	4
1.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E SUPORTES ALTERNATIVOS	5
1.4 USOS DE PROTEASES PARA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS A PARTIR DO SORO DE QUEIJO	8
1.4.1. GENERALIDADES SOBRE O SORO DE QUEIJO	8
1.4.2. PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO DE BÚFALA.....	10
1.4.3. HIDROLISADOS PROTEICOS E PEPTÍDEOS BIOATIVOS	11
1.5. REATORES ENZIMÁTICOS	13
3. OBJETIVO GERAL	15
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
<i>CAPÍTULO 1</i>	24
ABSTRACT	25
1. INTRODUCTION	26
2. MATERIALS AND METHODS.....	27
2.1. MATERIALS	27
2.2. PREPARATION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF PRETREATED CORN COB POWDER	27
2.3. CORN COB (CCP) AND AGAROSE (AG) SUPPORTS ACTIVATION	29
2.4. PREPARATION OF TRYPSIN DERIVATIVES	30
2.5. DETERMINATION OF BATCH AND CONTINUOUS OPERATION PARAMETERS.....	31
2.6. CHARACTERIZATION OF THE CONTINUOUS PROCESS	32
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	34
3.1 PRETREATMENT AND CHARACTERIZATION OF CORN COB POWDER.....	34
3.2 IMMOBILIZATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF TRYPSIN	37

3.3. THERMAL STABILITY OF DERIVATIVES	39
3.4. APPLICATION OF DERIVATIVES IN BATCH PROCESS.....	41
3.5 APPLICATION OF DERIVATIVES IN CONTINUOUS PROCESS.....	44
4. CONCLUSION.....	45
5. ACKNOWLEDGEMENTS.....	46
6. BIBLIOGRAPHY	46
7. ANEXO 1	51
<i>CAPÍTULO 2</i>	56
RESUMO	57
ABSTRACT	57
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1. MATERIAL	59
2.2. MÉTODOS.....	59
2.2.1. IMOBILIZAÇÃO	59
2.2.1.1. <i>Suportes</i>	59
2.2.1.2. <i>Ativação da agarose (AG) e pó de sabugo de milho (SM)</i>	59
2.2.1.3. <i>Preparo do suporte agarose-glioxil e SM-glioxil</i>	60
2.2.1.4. <i>Preparo do suporte agarose-monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE-agarose) e SM-monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE-SM)</i>	61
2.2.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PEPSINA.	62
2.2.3. PREPARO DOS DERIVADOS (ENZIMA LIGADA AO SUPORTE).....	63
2.2.3.1. <i>Imobilização da pepsina em agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina.</i> 63	
2.2.3.2. <i>Derivado agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina</i>	64
2.2.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-CINÉTICA DA PEPSINA LIVRE E IMOBILIZADA NOS DIFERENTES SUPORTES ATIVADOS COM GLUTARALDEÍDO.....	65
2.2.4.1. <i>Determinação de pH de máxima atividade</i>	65
2.2.4.2. <i>Determinação da temperatura de máxima atividade</i>	65
2.2.4.3. <i>Determinação da estabilidade ao pH da enzima pepsina solúvel</i>	65

2.2.4.4. Ensaios de estabilidade térmica da enzima pepsina solúvel e dos diferentes derivados.	66
2.2.5. OBTENÇÃO DO SORO DE QUEIJO BOVINO E BUBALINO	66
2.2.6. DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS E LACTOSE NO SORO DE QUEIJO BOVINO E BUBALINO DESLACTOSADO E DESENGORDURADO.	66
2.2.7. HIDRÓLISE DO SORO DE QUEIJO BOVINO E BUBALINO TRATADOS COM O DERIVADO ESTABILIZADO E SM-GLUTARALDEÍDO-PEPSINA EM BATELADA.	68
2.2.8. HIDRÓLISE DO SORO DE QUEIJO BOVINO E BUBALINO TRATADOS COM O DERIVADO SM-GLUTARALDEÍDO-PEPSINA EM REATOR DE LEITO EMPACOTADO.	68
2.2.9. ANÁLISE DOS DIFERENTES HIDROLISADOS PROTEICOS POR SDS-PAGE	69
2.2.10. ANÁLISE DOS DIFERENTES HIDROLISADOS PROTEICOS POR RP- HPLC.	69
2. RESULTADOS	69
3.1 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA ENZIMA PEPSINA SOLÚVEL.	69
3.1.1 DETERMINAÇÃO DO pH DE ATIVIDADE MÁXIMA.	69
3.1.2. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE MÁXIMA ATIVIDADE.	70
3.1.3. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE AO pH.	71
3.1.4. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA.	72
3.1.5. INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PEPSINA SOLÚVEL.	73
2.2. ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO	74
3.2.1. TRAJETÓRIA DE IMOBILIZAÇÃO DA PEPSINA EM SUPORTE AGAROSE-GLUTARALDEÍDO E SM-GLUTARALDEÍDO.	74
3.2.2. DETERMINAÇÃO DO pH DE MÁXIMA ATIVIDADE PARA OS DERIVADOS AGAROSE-GLUTARALDEÍDO-PEPSINA E SM-GLUTARALDEÍDO-PEPSINA.	75
3.2.3. DETERMINAÇÃO DAS TEMPERATURAS DE MÁXIMA ATIVIDADE DOS DERIVADOS AGAROSE-GLUTARALDEÍDO-PEPSINA E SM-GLUTARALDEÍDO-PEPSINA.	76
2.2.5. ESTABILIDADE TÉRMICA DOS DERIVADOS AGAROSE-GLUTARALDEÍDO-PEPSINA E SM-GLUTARALDEÍDO-PEPSINA COMPARADO COM A ENZIMA SOLÚVEL.	77
2.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS E LACTOSE NO SORO DE QUEIJO BOVINO E BUBALINO TRATADOS.	78
2.4. ANÁLISE POR SDS-PAGE DOS HIDROLISADOS DO SORO DO QUEIJO BOVINO E BUBALINO OBTIDOS EM REATOR DE BATELADA E DE LEITO EMPACOTADO COM SM-GLUTARALDEÍDO-PEPSINA	79
2.5. ANÁLISE POR RP-HPLC DOS HIDROLISADOS DO SORO DE QUEIJO BOVINO E BUBALINO OBTIDOS EM REATOR EM BATELADA E DE LEITO EMPACOTADO.	81

3. CONCLUSÃO	83
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
5. ANEXO 1	87
CAPÍTULO 3.....	89
RESUMO	90
ABSTRACT	90
1. INTRODUÇÃO	91
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	94
2.1. MATERIAL	94
2.2. MÉTODOS.....	94
2.2.1. OBTENÇÃO DO SORO DE QUEIJO BOVINO E BUBALINO	94
2.2.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS E LACTOSE NO SORO DE QUEIJO BOVINO E BUBALINO DESLACTOSADO E DESENGORDURADO.	95
2.2.3. HIDRÓLISE PARCIAL DOS SOROS DE QUEIJO BOVINO E BUBALINO EM REATOR ENCAMISADO DE LEITO EMPACOTADO COM SM-GLUTARALDEÍDO-PEPSINA E SM-GLIOXIL- TRIPSINA.	95
2.2.4. FRACIONAMENTO DOS HIDROLISADOS POR CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL ...	96
2.2.5. ANÁLISE DOS DIFERENTES HIDROLISADOS PROTEICOS E FRAÇÕES POR RP-HPLC	97
2.2.6. SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL E DIALISABILIDADE	97
2.2.7. TRANSPORTE E ABSORÇÃO DE PEPTÍDEOS POR MONOCAMADA DE CÉLULAS CACO-2	99
2.2.7.1. <i>Cultura de células.</i>	100
2.2.7.2. <i>Citotoxicidade in vitro</i>	100
2.2.7.3. <i>Transporte (permeabilidade) das frações peptídicas pela monocamada de células Caco-2.</i> 101	
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
3.1. DOSAGEM DE PROTEÍNAS E LACTOSE NO SORO DE QUEIJO BOVINO E BUBALINO TRATADOS.....	102
3.2. ANÁLISE DO PERFIL DE HIDRÓLISE POR RP-HPLC DOS DIFERENTES HIDROLISADOS OBTIDOS EM REATOR DE LEITO EMPACOTADO.	103

3.3. FRACIONAMENTO DOS DIFERENTES HIDROLISADOS POR CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL (SEPHADEX G25) E ANÁLISE POR RP-HPLC.....	104
3.4. DIALISABILIDADE DOS DIFERENTES POOLS DE PEPTÍDEOS	107
3.5. TRANSPORTE E ABSORÇÃO DOS DIFERENTES POOLS DE PEPTÍDEOS ATRAVÉS DA MONOCAMADA DE CÉLULAS CACO-2.....	109
4. CONCLUSÃO	114
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas em processos alimentícios já está bem estabelecido, entretanto a busca por maneiras de aplicação mais eficazes e/ou diversificada com relação ao custo/benefício são um campo vasto de estudo. Atualmente o foco está em abordagens inovadoras que sejam capazes de gerar um novo design de biocatalisadores que sejam mais estáveis a variáveis ambientais como pH e temperatura, menos susceptíveis a agentes de inibição e que possam operar em sistemas contínuos. Nesse sentido, avanços contínuos e substanciais foram conseguidos nos campos da biologia molecular, engenharia de proteínas e técnicas de imobilização de enzimas (Fernandes, 2010).

A imobilização de enzimas é vista como uma ferramenta chave na busca de alternativas para o aumento da aplicação industrial de enzimas. Mesmo com toda pesquisa já desenvolvida nessa área, muito ainda deve ser feito, já que não há regras e condições unânimes quanto à seleção de um suporte ideal e métodos de imobilização que devem associar satisfatoriamente requisitos técnicos e econômicos atrativos e seguros dentro de quaisquer processos industriais em grande escala (Fernandes, 2010; Cao, 2011).

Várias pesquisas estão sendo realizadas com proteínas e seus derivados; dentre esses, os mais estudados são os peptídeos. Proteínas do leite são a fonte mais importante de peptídeos biologicamente ativos, embora haja outras fontes proteicas animais e vegetais com potenciais sequências bioativas de aminoácidos (Nagpal et al., 2011). Nesse contexto a hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo tem sido muito explorada, sendo considerado o processo mais promissor para manipulação das propriedades tecnológicas e produção de peptídeos bioativos. A possibilidade de unir funcionalidades biológicas e tecnológicas a partir de uma única matéria-prima que são de grande interesse para a indústria (Mellinger-Silva et al., 2015), onde cada produto gerado pode agregar um valor comercial de 3 a 40 vezes em relação ao soro de queijo integral em pó (Baldasso et al., 2011; Yadav et al., 2015).

Quando se estuda o impacto de um composto bioativo na saúde humana, a sua bioacessibilidade, biodisponibilidade e bioatividade devem ocorrer e se manter durante sua passagem pelo trato gastrointestinal até seu local de ação (Balimane e Chong 2005; Carbonell-Capella et al., 2014). Com o aumento do mercado e procura por proteínas e peptídeos terapêuticos, estudos prévios de transporte e absorção desses compostos são necessários. Estudos *in vitro* são importantes ferramentas para predizer os mecanismo e

barreiras para absorção e integridade desses compostos frente à influência do arsenal enzimático a que são expostos durante a sua digestão (Antunes et al., 2013; Segura-Campos et al., 2011). Entre os métodos *in vitro*, a cultura de células Caco-2 é um dos métodos mais usados e aceitos para triagem de estudos de solubilidade, permeabilidade e estabilidade metabólica de diferentes compostos de interesse nutricional e terapêutico (Baliname e Chong, 2005; Föger et al., 2008; Ferruza et al., 2012; Courraud et al., 2013).

Existe também o método baseado na dialisabilidade de um elemento através de uma membrana semipermeável de porosidade controlada. Normalmente este método *in vitro* é dividido em duas fases, a primeira envolve a digestão com a enzima pepsina que simula a fase gástrica e a segunda fase (intestinal) compreende a digestão com pancreatina e sais biliares em condições controladas de pH e temperatura (Luten et al., 1996; Bueno et al., 2012). A proporção do elemento que se difunde pela membrana após um período de equilíbrio é usada para estimar a proporção do elemento que estará provavelmente disponível para a absorção (Luten et al., 1996; Goulart et al., 2014). Esse método simula grosseiramente a difusão passiva de compostos através da mucosa intestinal (Roig et al., 1999).

2. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Enzimas industriais

Enzimas são proteínas especializadas presentes em todos os organismos vivos que aceleram reações essenciais a vida (Ramos e Malcata, 2011). Por catalisarem reações químicas com especificidade e seletividade, são amplamente utilizadas para facilitar os mais diversos processos industriais (Saha, Jordan e Bothast, 2009; Zhu, Wu e Wang, 2011). Avanços nas técnicas de produção, purificação e caracterização de enzimas possibilitou aumentar cada vez mais a aplicação desses biocatalisadores em escala industrial e com fins específicos, como por exemplo, na indústria de detergentes, alimentícia, têxtil, farmacêutica, etc (Kirk, Borchert e Fuglsang, 2002; Tavano, 2013). A principal vantagem na utilização de enzimas como catalisadores em relação a catalisadores químicos está no fato de que reações de hidrólise catalisadas por enzimas normalmente são realizadas em condições brandas de pH e temperatura. Outra vantagem importante é que em processos enzimáticos evitam-se reações colaterais e também a preservação, no caso do processamento de alimentos, do valor nutricional. Além disso, as enzimas apresentam especificidade para o substrato, o que permite o desenvolvimento de produtos com características químicas e nutricionais bem definidas (Sheldon e Pelt, 2013; Tavano, 2013). Com relação a vantagens econômicas, o emprego de

enzimas pode resultar na redução de recursos como matéria-prima, consumo de água e melhoria na eficácia energética trazendo benefícios a indústria e ao meio ambiente (Zhu, Wu e Wang, 2011).

O mercado mundial de enzimas industriais foi de quase US\$ 4,5 bilhões em 2011, podendo chegar a US\$ 7,1 bilhões em 2018 com um crescimento anual de 8,2%. Hidrolases como as proteases e lipases ainda são a categoria de enzimas mais procuradas pelo mercado, pois são amplamente usadas em duas grandes indústrias, a de detergentes e de laticínios. Além delas, carboidrases (amilases e celulases) também são vastamente utilizadas (Saha, Jordan e Bothast, 2009; Zhu, Wu e Wang, 2011).

De todas as classes, as proteases são o grupo mais importante, pois representam cerca de 60% do total de enzimas comercializadas no mundo todo. Isso é resultado de um campo de aplicação diversificado que inclui ciência e tecnologia de alimentos, indústria farmacêutica, indústria de detergentes, síntese orgânica, etc (Feijoo-Siota e Villa, 2011; Ramos e Malcata, 2011; Ward, 2011).

1.2 Proteases

Proteases (EC 3.4) são enzimas pertencentes à classe das hidrolases que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas (Santos e Koblitz, 2008; Feijoo-Siota e Villa, 2011; Qing et al., 2013). De acordo com seu mecanismo de ação e estrutura terciária são classificadas em seis grupos: serina-proteases, cisteína-proteases, aspártico-proteases, metalo-proteases, glutamato-proteases e treonina-proteases (Ramos e Malcata, 2011; Qing et al., 2013). Estudos com enzimas proteolíticas iniciaram-se no fim do século XVI, devido ao grande interesse na compreensão da fisiologia do sistema gastrointestinal humano, mas existem relatos empíricos na antiguidade, em que tecidos animais, vegetais e outros materiais biológicos ricos em proteases já eram utilizados na produção de queijos e tratamento de couros. Dessa forma, as proteases foram as primeiras enzimas com aplicação tecnológica (Vermelho et al., 2008).

Atualmente, com os avanços em genômica, a partir do sequenciamento do genoma humano, descobriu-se que mais de 2% dos nossos genes são responsáveis por codificar proteases, sugerindo que essas enzimas possuem funções muito mais complexas, além daquelas envolvidas em nosso processo de digestão gastrointestinal (Di Cera, 2009). Já se sabe, por exemplo, que proteases regulam fatores de crescimento, produção de citocinas, ativação e inativação de sinalizadores celulares e estão presentes até mesmo na regulação dos

genes (Craik et al., 2011). Por serem indispensáveis à vida, as proteases são produzidas por todos os seres vivos, ou seja, animais, vegetais e microrganismos (Neurath, 1984; Santos e Koblitz, 2008), e são de grande importância para a humanidade nos campos da medicina, nutrição, agricultura e tecnologia (Rawlings, Barrett e Bateman, 2012).

1.2.1 Proteases digestivas: pepsina e tripsina.

A escolha das proteases, condições de digestão e o método usado para análise dos hidrolisados proteicos tem um considerável impacto sobre a digestibilidade das proteínas. A partir disso, muitos métodos *in vitro* que simulam o processo de digestão vem sendo utilizados e as enzimas mais testadas são pepsina, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase (Hur et al., 2011).

A pepsina é uma aspártico-protease produzida pelo estômago sob a forma inativa, o pepsinogênio. Na mucosa gástrica, com a liberação de ácidos, é rapidamente ativada em pH < 4,5; no entanto, são facilmente desnaturadas em pH > 7,0. Hidrolisam preferencialmente a ligação peptídica localizada no lado N-terminal de aminoácidos hidrofóbicos leucina e fenilalanina. Possuem atividade ótima em um intervalo de pH 1,8-3,5 (Roberts, 2006; Whitcomb e Lowe, 2007; López-Ferrer et al., 2011).

Tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase são secretadas pelo pâncreas como pró-enzimas inativas, ou seja, zimogênios. Entre elas três formas de tripsina, quimotripsinogênio A e B e procarboxipeptidase A₁, A₂, B₁ e B₂ (Whitcomb e Lowe, 2007).

A tripsina é a mais importante de todas as enzimas digestivas, pois desempenha um papel fundamental na regulação de todas as outras enzimas digestivas. É uma endopeptidase, da classe das serina-proteases, que cliva o lado carboxila dos resíduos de arginina e lisina. Do total de enzimas presentes no suco pancreático é a mais abundante (19%). Sua forma inativa é denominada tripsinogênio, e permanece inativo até que atinja o duodeno, onde é ativado pela enteroquinase, embora evidências atuais indiquem que a tripsina é ativada pela própria tripsina e inativada por um processo de autólise. Seu pH ótimo de ação está entre 7,5 e 8,5 (Whitcomb e Lowe, 2007).

Esta enzima possui uma estrutura globular formada por dois domínios em β -barril. Apresenta massa molar na faixa de 21-61 kDa, e uma ampla faixa de pH ótimo (7-10), sendo que o mesmo pode ser observado para uma faixa de temperatura ótima (22-74°C). Esta enzima apresenta um sítio de ligação com alta afinidade para o íon cálcio, necessário para máxima atividade da enzima, e sua presença está diretamente relacionada com a estabilidade da estrutura terciária e a prevenção de autólise (Barrett, 1998).

Por sua alta capacidade em hidrolisar praticamente todas as proteínas, a tripsina tornou-se um reagente químico muito utilizado em proteômica (Massolini e Calleri, 2005). É aplicada também para dissociar tecidos e desprender células aderidas em ensaios que utilizam cultura de células. Faz parte dos constituintes da pancreatina, uma combinação de enzimas utilizada em terapias para aliviar a insuficiência digestiva (Woodard et al., 2003).

Outro uso cada vez mais frequente é a obtenção de peptídeos bioativos através da hidrólise proteica. Muitas pesquisas estão sendo realizadas com proteínas de diversas fontes e seus hidrolisados, entre os materiais alvos de estudo cabe destacar as caseínas e soro proteínas presentes no leite que são a fonte mais importante de peptídeos biologicamente ativos (Nagpal et al., 2011). Em se tratando de proteínas de soro de queijo, estas possuem elevado valor biológico devido à presença de todos os aminoácidos essenciais (Mota et al., 2006; Rocha et al., 2011). Estudos demonstram que peptídeos bioativos obtidos a partir do soro de queijo são capazes de modular algumas respostas fisiológicas no organismo animal. Dentre elas as mais importantes e estudadas são: efeito insulínico, atividade antioxidante, efeitos imunomoduladores, atividade opióide, anticarcinogênico e anti-hipertensivo (Marshall, 2004; Petersen et al., 2009; Leksrisompong et al., 2010; Ruiz-Giménez et al., 2012; Power et al., 2013).

A tripsina também é utilizada pela indústria química de detergentes, como um aditivo por apresentar alta estabilidade térmica, ótima atividade em meio alcalino e compatibilidade com os sistemas de lavagem (Ali et al., 2011; Ktari et al., 2012).

1.3 Imobilização de enzimas e suportes alternativos

A escolha para aplicação industrial de uma enzima está em suas excelentes propriedades funcionais como seletividade, atividade e especificidade e condições amenas de reação. Entretanto, por razões técnicas e econômicas, a maioria dos processos químicos catalisados por enzimas requerem a reutilização ou o uso contínuo do biocatalisador por um período prolongado e sob esta perspectiva, a imobilização de enzimas é um procedimento bastante versátil, pois possibilita realizar ciclos de reuso no caso de reatores enzimáticos, facilita a recuperação e purificação do produto e uma vez imobilizada, a enzima torna-se mais estável mantendo seu poder catalítico efetivo por mais tempo (Guisán, 2006; DiCosimo et al., 2013; Tavano, 2013).

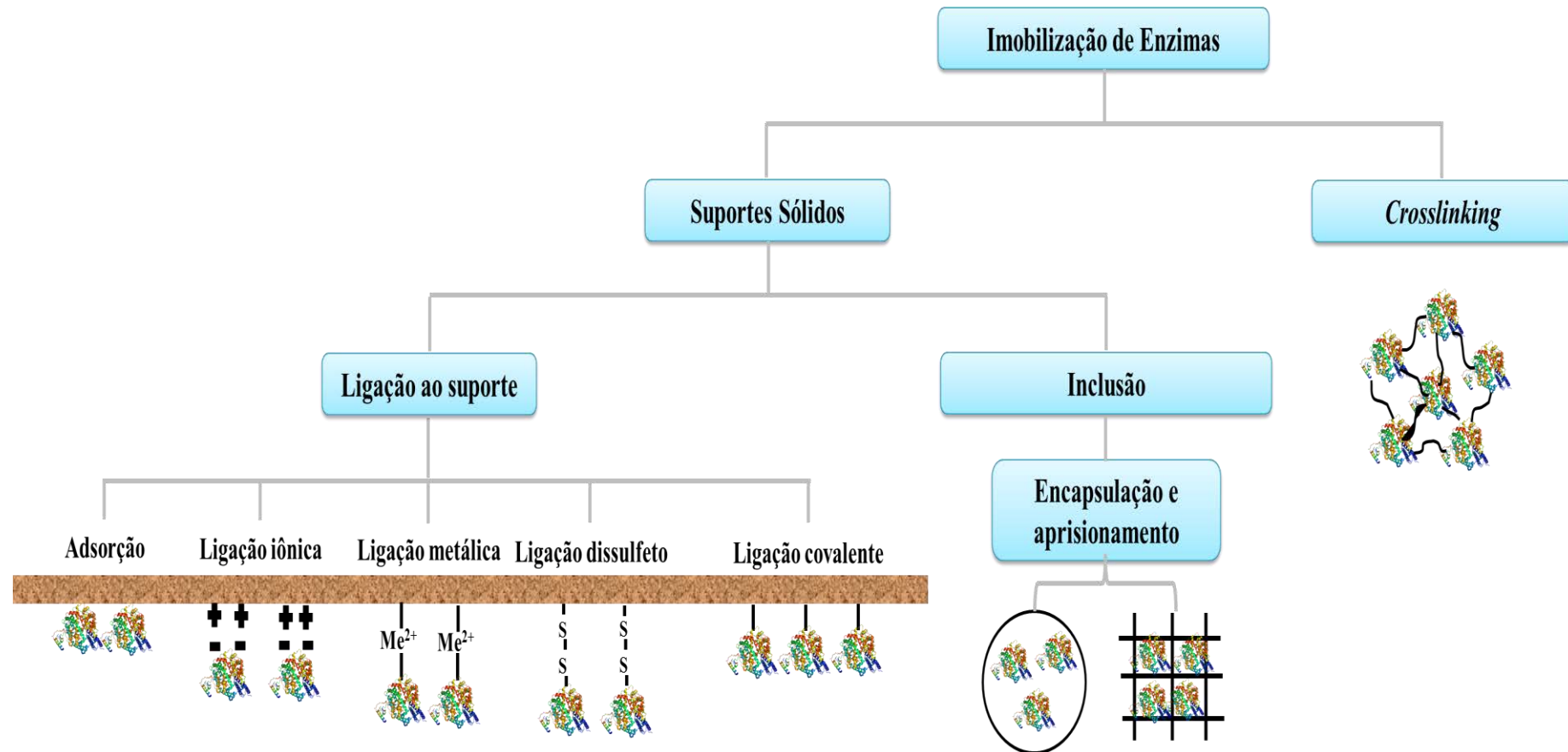
O termo “enzimas imobilizadas” refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em determinada região de espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser utilizadas repetida e continuamente (Brena e Batista-Viera, 2006).

Para viabilizar e expandir o uso de novas enzimas imobilizadas em escala industrial, a comunidade acadêmica busca encontrar alternativas economicamente viáveis propondo e desenvolvendo continuamente protocolos de fácil execução e funcionalidade. Uma técnica bastante eficiente é a estabilização da enzima pela imobilização em suportes sólidos através de ligações covalentes multipontuais que entre outros objetivos visa prevenir mudanças conformacionais na estrutura terciária da enzima de forma a manter sua função catalisadora (Mateo et al., 2006).

Na tecnologia de imobilização de enzimas outro fator muito relevante é a escolha do material suporte, pois suas características são determinantes no desempenho da enzima imobilizada. Propriedades desejáveis de uma matriz incluem resistência física, hidrofiliabilidade, facilidade de derivatização, resistência ao ataque microbiano e alta capacidade de interação enzima-suporte por unidade de peso e baixo custo (Guisán, 2006).

Neste contexto, resíduos agroindustriais como as fibras, despontam como candidatos com grande potencial para imobilização de enzimas, principalmente devido suas características físico-químicas. Estes materiais são constituídos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (Banerjee et al., 2010). A imobilização de enzimas em suportes alternativos tem sido descrita na literatura, como por exemplo, a invertase em casca de arroz (Souza e Godbole, 2002), lacase em grãos (Silva et al., 2012), lipase em fibra de coco (Brígida et al., 2008) e tripsina em resíduos de grãos utilizados na indústria cervejeira (Rocha et al., 2011). A utilização destes materiais na imobilização de enzimas está cada vez mais recebendo atenção por parte da comunidade científica, e se mostra uma alternativa promissora para promover a aplicação industrial de enzimas imobilizadas. Na Figura 1 estão representados os principais métodos de imobilização de enzimas.

Figura 1. Principais métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Próprio autor modificado de Homaei et al., 2003 e Guisán, 2006.

1.4 Usos de proteases para produção de hidrolisados proteicos a partir do soro de queijo

1.4.1. Generalidades sobre o soro de queijo

O soro de queijo é o coproduto obtido a partir da produção de queijos, onde para cada quilo de queijo produzido cerca de nove quilos de soro são gerados (Siso, 1996). O soro pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três processos principais: o enzimático (coagulação pela quimosina), a precipitação ácida (adição de ácido até o ponto isoelétrico das caseínas) e separação física das micelas de caseína por microfiltração (Sgarbieri, 2004) dependendo do tipo de queijo.

A composição do soro varia em função do queijo produzido, mas, em média, é constituído basicamente de 93% de água e somente 7% de matéria seca (parte sólida), sendo que, deste total, 71% é lactose, 10% proteína bruta (PB), 12% gordura e 7% sais minerais (Liziere e Campos, 2000).

A utilização e/ou descarte do soro é uma das principais preocupações para os especialistas em leite de todo o mundo, porque este fluido lácteo contém constituintes valiosos que não devem ser desperdiçados e, além disso, representa um importante poluente ambiental (El-Salam et al., 2009). Atualmente a produção mundial de soro de queijo é estimada em cerca de $180-190 \times 10^6$ ton./ano, com uma taxa de crescimento de 2% ao ano e desse montante, apenas 50% é aproveitado e processado para diferentes fins (Baldasso et al., 2011; Yadav et al., 2015). Esta condição de sub aproveitamento, elevada carga orgânica e alto volume de produção, mantêm essa matéria-prima na categoria dos efluentes industriais com elevado potencial poluidor, ou seja, apresenta alta demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO) de $27-60 \text{ g.L}^{-1}$ e $50-102 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente (Prazeres et al., 2012; Yadav et al., 2015).

A descoberta das propriedades funcionais do soro do leite, assim como sua aplicação nutricional, fez com que essa fração fosse “promovida” a um coproduto da fabricação de queijos, e não mais um subproduto (Walzem et al., 2002). Aproximadamente 55% dos nutrientes presentes no leite ficam retidos no soro durante a fabricação de queijos (Stanton et al., 2002; Sánchez et al., 2011). Dentre os constituintes do soro do queijo, os mais abundantes são lactose, proteínas solúveis (20%) e lipídeos, dos quais as proteínas são o principal alvo de estudos. As principais proteínas são: β -lactoglobulina (β -Lg), α lactoalbumina (α -La), soro albumina (SA) e imunoglobulinas (Ig) (Antunes, 2003; Marques et al., 2005; Akahavan et al.,

2010). Há também proteínas em menores quantidades como lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima, que são conhecidas por suas propriedades antibacterianas (El-Salam et al., 2009; Buffoni et al., 2011). Essas proteínas são ricas em aminoácidos essenciais e fontes potenciais de peptídeos bioativos (Ismail et al. 2011) e são caracterizadas pelo alto valor nutricional, funcional e biológico (Contreras et al., 2011). As proteínas do soro do leite são globulares e compactas (variam de 14 a 100 kDa) e são universalmente definidas como aquelas proteínas que permanecem no soro após a coagulação das caseínas em pH 4,6 a 20°C (Morr e Ha, 1993; Imafidon, 1997).

Do ponto de vista aminoacídico (aminoácidos essenciais), as proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações, exceto os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) que não aparecem em quantidade excessiva, mas atendem às recomendações estabelecidas pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (*Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO)*). Apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (Sgarbieri, 2004). Devido à presença abundante de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) e principalmente à elevada concentração de leucina, essas proteínas despertam grande interesse, pois esse aminoácido essencial está diretamente relacionado à síntese proteica muscular (Ha e Zemel, 2003).

As proteínas do soro de queijo são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, o que estimula a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais (Boukhettala et al., 2010) a tal ponto que pesquisas as classificam como proteínas de metabolização rápida (*fast metabolizing proteins*), muito adequadas para situações de estresse metabólico em que a reposição de proteínas no organismo se torne emergencial (Sgarbieri, 2004). Além disso, as soro proteínas do leite e seus peptídeos são cruciais na imunidade inata para a progênie (Buffoni et al., 2011).

Estudos em humanos indicam que um aumento da saciedade pode estar relacionado à ingestão de proteínas do soro do leite, suprimindo a ingestão de alimentos e quando consumidas juntamente com uma dieta rica em carboidratos, são capazes de reduzir a resposta glicêmica subsequente (Akhavan et al., 2010). De acordo com suas características funcionais, o soro de queijo é largamente utilizado pela indústria de alimentos na produção de fórmulas

infantis, panificação, embutidos, sorvetes, bebidas lácteas, leites fermentados, entre outros (Haraguchi et al., 2009; Lira et al., 2009; Xu et al., 2011).

Com o desenvolvimento de técnicas de filtração e uso de métodos cromatográficos tornou-se possível a recuperação e fracionamento das proteínas do soro do leite em suas formas nativas, disponibilizando no mercado uma grande variedade de produtos como concentrados (35-80% de proteínas) e isolados proteicos (teor mínimo de proteínas de 90%), frações proteicas (α -lactalbumina, β -lactoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidase) e hidrolisados proteicos (El-Salam et al., 2009). Suplementos com proteínas do soro e suas frações, tem-se tornado popular entre os esportistas e pessoas interessadas em ganhar massa muscular. A ingestão dietética atual de proteínas para a população em geral é de 0,8g/Kg de peso corporal/dia; já para aqueles indivíduos envolvidos na prática regular de exercícios esse valor passa a 1,2 – 1,7g de proteína/Kg de peso corporal/dia (Aparicio et al., 2010).

Como gênero alimentício, além de possuírem propriedades tecnológicas únicas (emulsificante, espumante, bactericida), as soro proteínas são também utilizadas devido ao seu elevado valor nutritivo e são classificadas como produtos “GRAS” (*Generally Recognized As Safe* – Genericamente reconhecido como seguro) (El-Salam et al., 2009). Na Tabela 1 estão representadas algumas propriedades funcionais de frações proteicas do soro do leite.

Tabela 1. Propriedades funcionais de algumas frações proteicas do soro de queijo.

Fração proteica	Espumante		Emulsificante		Gelificante	Solubilidade
	capacidade	estabilidade	capacidade	Estabilidade		
β – Lg ^a	+++	+++	+++	+++	+++	+++
α – La ^b	+++	+++	+++	+++	-	+++
SA ^c	+	+	+	+	+++	+++
Ig ^d	-	-	-	-	+++	+++
GMP ^e	+++	+	+	+	-	+++

^a β -Lactoglobulina; ^b α -Lactoalbumina; ^csoroalbumina; ^dimunoglobulina; ^eglicomacropéptidos.

+++ ótimo; + regular; - ruim. Fonte: El-Salam et al., 2009.

1.4.2. Proteínas do soro de queijo de búfala

As soro proteínas do leite bovino são extensivamente estudadas, principalmente por suas propriedades funcionais e nutricionais. No que diz respeito às proteínas do soro de queijo bubalino ainda há uma substancial falta de caracterização e particularmente sobre aspectos quantitativos (Buffoni et al., 2011). Pesquisas utilizando proteínas do leite de búfala como

fonte de peptídeos bioativos tem recebido menor atenção em relação às proteínas do leite de vaca. Com base na similaridade das sequências de aminoácidos da β -Lg e α -La de búfalas e vacas, espera-se a obtenção de peptídeos bioativos semelhantes, mas nenhuma literatura sobre peptídeos bioativos de proteínas do soro de queijo bubalino tem sido citada. Dessa forma, mais pesquisas são necessárias a fim de se explorar plenamente essas proteínas como fontes potenciais de peptídeos bioativos (El-Salam e El-Shibiny, 2011).

1.4.3. Hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos

O tratamento enzimático contribui para a melhoria das propriedades físicas, químicas, funcionais, nutricionais e principalmente na melhoria da capacidade de absorção das proteínas (Biasutti et al., 2008). Devido às suas excelentes propriedades funcionais (seletividade, atividade e especificidade), as enzimas são capazes de catalisar os processos químicos mais complexos em condições experimentais e ambientais amenas (pH e temperatura) e controladas (Guisán, 2006).

A hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo vem sendo utilizada principalmente para reduzir problemas com alergenicidade e/ou produzir peptídeos bioativos. Além disso, a hidrólise também é largamente utilizada pela indústria de alimentos para modificar e melhorar as propriedades funcionais do soro de queijo. Dentre elas temos: modificações na capacidade de geleificação, melhoria na estabilidade térmica, mudanças na solubilidade, estabilidade e capacidade de formar espuma, melhoria da capacidade emulsificante e adequação da funcionalidade da proteína para atender necessidades específicas. Cabe ressaltar que o grau desejado de hidrólise e a fonte adequada de proteína dependem do método aplicado para clivar as ligações peptídicas que varia de acordo com funcionalidade requerida e do tipo de produto em que serão incorporados (Rocha et al., 2011).

Várias pesquisas estão sendo realizadas com proteínas e seus derivados; dentre esses, os mais estudados são os peptídeos. Proteínas do leite é a fonte mais importante de peptídeos biologicamente ativos, embora haja outras fontes proteicas animais e vegetais com potenciais sequências bioativas de aminoácidos (Nagpal et al., 2011). O termo bioativo refere-se a compostos que tanto podem estar presentes naturalmente nos alimentos ou serem formados durante o processamento de alimentos com possíveis funções fisiológicas e/ou bioquímicas quando ingeridas por seres humanos (Park, 2009).

Alimentos funcionais e compostos bioativos em alimentos têm atraído o interesse dos cientistas de alimentos, nutricionistas, profissionais da saúde e consumidores em geral, pois são responsáveis por trazer benefícios à saúde. São capazes de suprir funções nutricionais

básicas (Park, 2009) e por serem fonte de peptídeos bioativos, podem ajudar a reduzir a epidemia mundial de doenças crônicas como câncer e hipertensão que respondem por milhões de mortes prematuras a cada ano. Além dos benefícios à saúde, proteínas com propriedades funcionais e peptídeos bioativos são uma categoria importante dentro do setor de nutracêuticos, onde o volume de vendas está avaliado em cerca de US\$ 75 bilhões/ano. Este é um mercado dinâmico que está em franco crescimento (Mine et al., 2010; Hernández-Ledesma et al., 2011).

Estudos demonstram que peptídeos bioativos do soro de queijo são capazes de modular algumas respostas fisiológicas no organismo animal (Biasutti et al., 2008). Dentre elas, as mais importantes e estudadas são: efeito insulínico, atividade antioxidante, efeitos imunomoduladores, atividade opióide, anticarcinogênica e anti-hipertensiva (Gerdes et al., 1999; Marshall, 2004; Petersen et al., 2009; Lekrisompong et al., 2010).

Para obter peptídeos bioativos do soro através de métodos *in vitro*, a hidrólise enzimática é geralmente o método de escolha, uma vez que pode minimizar o impacto do pH e uso de temperaturas extremas que levam a diferentes graus de desnaturação proteica com perda de suas funções biológicas (Lekrisompong et al., 2010). A simulação da digestão fisiológica com diferentes enzimas presentes no trato gastrointestinal como a pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase é uma ferramenta muito útil para liberar peptídeos com número de resíduos de aminoácidos variados (Hernández-Ledesma et al., 2011) ao mesmo tempo em que avalia a estabilidade de peptídeos bioativos contra as enzimas digestivas, tendo em vista que essas sequências de aminoácidos bioativos devem permanecer ativas e intactas durante a digestão e absorção gastrointestinal, ou seja, serem capazes de atravessar o epitélio intestinal, entrar na corrente sanguínea e potencialmente exercer seus efeitos fisiológicos ao atingir o órgão-alvo (Segura-Campos et al., 2011).

Segundo Domínguez-González et al. (2010), a biodisponibilidade de um nutriente é um fator importante para alimentação e varia de acordo com diferentes alimentos, componentes alimentares e condições gastrointestinais. A biodisponibilidade depende de vários processos como a digestão, transporte, absorção, utilização e eliminação de nutrientes. Para estimar a biodisponibilidade de nutrientes em nutrição humana, métodos *in vitro* têm sido propostos e são geralmente baseados na simulação da digestão gastrointestinal e medem a fração do elemento estudado disponível para absorção (Domínguez-González et al., 2010).

Esses métodos têm sido muito importantes quando se busca prever a biodisponibilidade de muitos compostos presentes em novos alimentos ou alimentos biofortificados. Sua

utilização visa uma triagem simples e rápida, sendo um método bastante confiável e utilizado antes de estudos *in vivo*, que normalmente empregam técnicas caras e de difícil execução (Argyri et al., 2011). Neste método, membranas de diálise com porosidade conhecida são utilizadas e as condições experimentais simulam a digestão gastrointestinal com o uso de enzimas gástricas como pepsina, pancreatina e sais biliares, além de pH e temperatura controlados (Romarís-Hortas et al., 2011).

Outro método *in vitro* bastante utilizado para se avaliar a absorção de nutrientes em nível intestinal envolve cultura de células, em especial células de câncer de cólon humano (Caco-2) devido sua semelhança com células epiteliais do intestino (Samaranayaka e Li-Chan, 2011). Neste método, as células Caco-2 são cultivadas até formarem uma monocamada, e quando atingem a confluência, elas espontaneamente se diferenciam e adquirem características morfofuncionais de enterócitos, podendo assim “quebrar” moléculas e transportá-las para dentro dos tecidos (Segura-Campos et al., 2011). Estudos realizados mostraram que resultados obtidos *in vitro* podem ser correlacionados com a biodisponibilidade e bioacessibilidade de determinados nutrientes ensaiados *in vivo*. Constituem ferramentas úteis para estabelecer tendências, comparações e possíveis transformações durante o processo de digestão (Velasco-Reynold et al., 2010).

1.5. Reatores Enzimáticos

As enzimas desempenham papéis fundamentais em numerosos produtos e processos biotecnológicos que estão normalmente ligados às indústrias de alimentos, bebidas, papel e celulose, têxtil, combustíveis, produtos farmacêuticos e de detergentes (Saha, Jordan e Bothast, 2009). Devido a sua eficiência, propriedades catalíticas altamente específicas e ação em condições ambientais amenas, esses catalisadores tem sido usados com sucesso substituindo processos químicos e físicos e contribuindo para uma produção industrial mais sustentável (Ramos e Malcata, 2011, Ward, 2011), pois gera uma baixa quantidade de produtos secundários reduzindo dessa forma etapas de purificação e recuperação o que diminui o gasto energético (Fernandes, 2010). No entanto, há ainda algumas limitações que podem ser determinantes para o emprego da tecnologia enzimática em um processo. Entre elas podemos citar o alto custo de produção de algumas enzimas, baixa estabilidade, estreita faixa de substratos. Fatores como esses estimularam o franco desenvolvimento de áreas como engenharia genética, engenharia de proteínas e imobilização de enzimas (Fernandes, 2010).

Enzimas imobilizadas são cada vez mais viáveis do ponto de vista econômico e tecnológico, pois normalmente há um aumento de estabilidade e por se tornar insolúvel é

facilmente recuperada e reutilizada (Cao, 2011). Outra vantagem da imobilização é a automação de processos através de seu emprego em uma ampla gama de configurações de reatores, que podem possibilitar o uso de altas concentrações do biocatalisador que pode implicar em uma produção volumétrica elevada, permitindo operação contínua com considerável economia de enzima, trabalho e custos indiretos (Ma et al., 2009; Zhang e Xing, 2011; Homaei et al., 2013).

Por definição um reator enzimático é um dispositivo no interior do qual, transformações e reações bioquímicas são catalisadas por enzimas para geração de produtos específicos em condições controladas. Com base no modo de operação, um reator enzimático, pode ser classificado como contínuo ou descontínuo (Zhang e Xing, 2011).

O ponto chave ao escolher entre alternativas de configurações de reatores é a estabilidade térmica e química da enzima, expressa por sua meia vida sob certas condições operacionais e a forma como a enzima é utilizada (Liese et al., 2006). No caso de uma enzima imobilizada, outro fator determinante é a natureza física do material suporte (tamanho e distribuição de poros, tamanho e geometria da partícula) que pode implicar em problemas de difusão e transferência de massa e estabilidade mecânica do biocatalisador (Liese e Hilterhaus, 2013). Vários estudos têm sido dirigidos para o desenvolvimento de reatores para a catálise, de modo a proporcionar uma operação eficiente e aumento significativo da eficiência e produtividade do processo. Estudos visam principalmente eliminar as “zonas mortas”, ou seja, áreas em que o substrato não entra em contato com o catalisador (Albertini et al., 2012).

O princípio de funcionamento de um reator em batelada é relativamente simples, o substrato e a enzima são misturados em um tanque com controle de agitação, pH e temperatura. É ideal para substratos com alta viscosidade e baixa solubilidade. Entretanto, possui desvantagens como o baixo rendimento de reação, elevado gasto de energia para a agitação, custo de funcionamento mais elevado quando comparado a processos contínuos, devido ao tempo necessário para o enchimento, aquecimento, resfriamento, descarga e limpeza. Há também variações de rendimento de lote para lote (Zhang e Xing, 2011).

O reator de leito fixo é a configuração mais utilizada para o emprego de enzimas imobilizadas, no qual o substrato é bombeado para as extremidades da zona de reação e o produto é liberado na extremidade oposta. Possui vantagens como controle automático de operação; redução dos custos com mão de obra; estabilização das condições de operação e

facilidade do controle de qualidade do produto final que é continuamente recolhido como efluente. Essa configuração é preferida em processos que envolvem inibição pelo substrato e reações reversíveis. Com relação à conversão substrato/produto, a taxa pode ser controlada pela vazão do sistema ou dimensionamento do reator (Zhang e Xing, 2011). Podemos incluir a construção simples, os suportes podem ser feitos de materiais reciclados e não há necessidade de agitação mecânica ou de aparatos de recirculação, o que torna muito mais baixos seus custos de construção e operação (Peixoto et al., 2011). Como desvantagem há a dificuldade de controle de pH e temperatura por todo meio de reação, controle da pressão interna e possibilidade de formação de caminhos preferenciais pelo leite (Zhang e Xing, 2011).

3. OBJETIVO GERAL

Imobilização das proteases pepsina e tripsina em pó de sabugo de milho ativado para obtenção de hidrolisados parciais das proteínas do soro de queijo bovino e bubalino: transporte e absorção dos peptídeos através de monocamada de células Caco-2 e dialisabilidade.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI N. E-H.; HMIDET N.; GHORBEL-BELLAAJ O.; FAKHFAKH-ZOUARI N.; BOUGATEF, A.; NASRI, M. Solvent-stable digestive alkaline proteinases from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) viscera: Characteristics, application in the deproteinization of shrimp waste, and evaluation in laundry commercial detergents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.164, p.1096-1110, 2011.

AKHAVAN, T.; LUHOVYY, B.L.; BROWN, P.H.; CHO, C.E.; ANDERSON, G.H. Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, p.966-975, 2010.

ALBERTINI, A.V.P.; REIS, A.L.S.; TELES, F.R.R.; SOUZA, J.C.; ROLIM, J.L.; FREIRE, V.N.; SANTOS, R.P.; MARTINS, J.L.; CAVADA, B.S.; MARTINS, D.B.G.; MARTÍNEZ, C.R.; LIMA, J.L. The new flow system approach in packed bed reactor applicable for immobilized enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.79, p.1–7, 2012.

ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de queijo bovino**. 1.ed. Barueri: Manole, 2003. 135p.

ANTUNES, F.; ANDRADE, F.; FERREIRA, D.; NIELSEN, H.M.; SARMENTO, B. Models to Predict Intestinal Absorption of Therapeutic Peptides and Proteins. **Current Drug Metabolism**, v.14, p.4-20, 2013.

APARÍCIO, V.A.; NEBOT, E.; PORRES, J.M.; ORTEGA, F.B.; HEREDIA, J.M.; LOPEZ-JURADO, M.; RAMÍREZ, P.A. Effects of high-whey-protein intake and resistance training on renal, bone and metabolic parameters in rats. **British Journal Nutrition**, p.1-10, 2010.

ARGYRI, K.; THEOPHANIDI, E.; KAPNA, A.; STAIKIDOU, C.; POUNIS, G.; KOMAITIS, M.; GEORGIOU, C.; KAPSOKEFALOU, M. Iron or zinc dialyzability obtained from a modified in vitro digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals. **Food Chemistry**, v.127, p. 716 – 721, 2011.

BALDASSO, C.; BARROS, T.C.; TESSARO, I.C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v.278, p.381–386, 2011.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug Discovery Today**, v.10, p.335-343, 2005.

BANERJEE S.; MUDLIAR S.; SEN R.; GIRI B. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**, v.4, p.77–93, 2010.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, JR. J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**. Academic Press, San Diego, 1666 p.,1998.

BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; LOPES JÚNIOR, C.O.; COELHO, V.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de queijo com elevado teor de oligopeptídeos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 1, p. 51-60, 2008.

BOUKHETTALA, N.; IBRAHIM, A.; AZIZ, M.; VUICHOUD, J.; SAUDAN, K. Y.; BLUM, S.; DÉCHELOTTE, P.; BREUILLÉ, D.; COËFFIER, M. A diet containing whey protein, free glutamine, and transforming growth factor- β ameliorates nutritional outcome and intestinal mucositis during repeated chemotherapeutic challenges in rats. **The Journal of Nutrition - Nutrition and Disease**. p. 1-7, jan. 2010

BRENA, B.M.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. In: GUIBAN, J.M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2nd ed. New Jersey: Humana Press, 2006. cap.2, p.15-30.

BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida Antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.146, p.173–187, 2008.

BUENO, L.; CUNHA, S.F.C.; MARCHINI, J.S.; OLIVEIRA, J.E.D. Iron Dialyzability in a Multiple Nutrient Formulation and Effect of the Addition of Separate Nutrients. **Basic Sciences of Medicine**, v. 1, p. 19-22, 2012.

BUFFONI, J.N.; BONIZZI, I.; PAUCIULLO, A.; RAMUNO, L.; FELIGINI, M. Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Food Chemistry**, v.127, p. 1515 – 1520, 2011.

CAO, L. Immobilized Enzymes. In: Moo-Young M, editor. **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier; 2011, v.2, chap. 34, p. 461-76.

CARBONELL-CAPELLA, J.M.; BUNIEWSKA, M.; BARBA, F.J.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p. 155-171, 2014

CONTRERAS, M.M.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; RECIO, I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **Food Science and Technology**, v.44, p.9-15, 2011.

COURRAUD, J.; BERGER, J.; CRISTOL, J.P.; AVALLONE, S. Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion. **Food Chemistry**, v.136, p. 871–877, 2013.

CRAIK C.S.; PAGE M.J.; MADISON E.L. Proteases as therapeutics. **Biochemical Journal**, v.435, p.1-16, 2011.

DI CERA E. Serine Proteases. **IUBMB Life**, v.61, p.510-515, 2009.

DiCOSIMO, R.; McAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Review**, v.42, p. 6437-6474, 2013.

DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; ROMARÍS-HORTAS, V.; GARCIA-SARTAL, C.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BARCIELA-ALONSO, M.C.; BERMEJO-BARRERA, P. Evaluation of an in vitro method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds. **Talanta**, v.82, p.1668-1673, 2010.

EL-SALAM, M.H.A.; EL-SHIBINY, S.; SALEM, A. Factors affecting the functional properties of whey protein products: a review. **Food Reviews International**, v.25, p.251-270, 2009.

EL-SALAM, M.H.A.; EL-SHIBINY, S. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. **Dairy Science and Technology**, v.91, p.663-699, 2011.

FEIJOO-SIOTA L.; VILLA T.G. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v.4, p.1066-1088, 2011.

FERNANDES, P. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. **Enzyme Research**, v.2010, p.1-19, 2010.

FERRUZA, S.; ROSSI, C.; SCARINO, M.L.; SAMBUY, Y. A protocol for in situ enzyme assays to assess the differentiation of human intestinal Caco-2 cells. **Toxicology in Vitro**, v.26, p.1247–1251, 2012.

FÖGER, F.; KOPF, A.; LORETZ, B.; ALBRECHT, K.; BERNKOP-SCHNÜRCH. Correlation of in vitro and in vivo models for the oral absorption of peptide drugs. **Amino Acids**, v. 35, p.233–241, 2008.

GERDES, S.K; HARPER, W.J; MILLER, G. Componentes bioativos de soro e a saúde cardiovascular. **USDEC**, 1999.

GOULART, A.J.; BASSAN, J.C.; BARBOSA, O.A.; MARQUES, D.P.; SILVEIRA, C.B.; SANTOS, A.F.; GARRIDO, S.S.; RESENDE, F.A.; CONTIERO, J.; MONTI, R. Transport of amino acids from milk whey by Caco-2 cell monolayer after hydrolytic action of gastrointestinal enzymes. **Food Research International**, v.63, p.62–70, 2014.

GUISÁN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. Humana Press 2ªed., 2006, 449p.

HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p.251-258, 2003.

HARAGUCHI, F.K.; PEDROSA, M.L.; PAULA, H.; SANTOS, R.C.; SILVA, M.E. Influence of whey protein on liver enzymes, lipid profile and bone formation of hypercholesterolemic rats. **Revista de Nutrição**, v. 22, n.4, p. 517-525, 2009.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M.M.; RECIO, ISIDRA. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, p.23-35, 2011.

HOMAEI, A.A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v.6, p.185-205, 2013.

HUR, S.J.; LIM, B.O.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v.125, p. 1–12, 2011.

IMAFIDON, G. I.; FARKYE, N.Y.; SPANIER, A. M. Isolation, purification and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. **Critical Review Food Science**, v.37, p.663-689, 1997.

ISMAIL, M.; AMMAR, E.T.; EL-METWALLY, R. Improvement of low fat mozzarella cheese properties using denatured whey protein. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.2, p.207-217, 2011.

KIRK O.; BORCHERT T.B.; FUGLSANG C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.345-351, 2002.

KTARI, N.; KHALED, H. B.; NASRI, R.; JELLOULI, K; GHORBEL, S.; NASRI, M. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification characterization and potential application as a detergent additive. **Food Chemistry**, v.130, p.467-474, 2012.

LEKSRIOMPONG, P.P.; MIRACLE, R.E.; DRAKE, M. Characterization of Flavor of Whey Protein Hydrolysates. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.58, n.10, p. 6318-6327, 2010.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. (Eds.). (2006). **Industrial biotransformations**. (p.18). Weinheim: Wiley-VCH.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v.42, p.6236-6249, 2013.

LIZIEIRE, R.S.; CAMPOS, O.F. Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite. **Embrapa gado de leite**, Rio, p.46, 2000. Disponível em: <
<http://www.cnp.gl.embrapa.br/pastprod/textos/folha46.htmL>> Acesso em: 04 jan. 2014.

LÓPEZ-FERRER, D.; PETRITIS, K.; ROBINSON, E.W.; HIXSON, K.K.; TIAN, Z.; LEE, J.H.; LEE, S.W.; TOLIC, N.; WEITZ, K.K.; BELOV, M.E.; SMITH, R.D.; PASA-TOLIC, L. Pressurized Pepsin Digestion in Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.10, 2011.

LUTEN, J.; CREWS, H.; FLYNN, A.; VAN DAEL, P.; KASTENMAYER, P.; HURRELL, R.; DEELSTRA, H.; SHEN, L.H.; FAIRWEATHER-TAIT, S.; HICKSON, K.; FARRÉ, R.; SCHLEMMER, U.; FROHLICH, W. Interlaboratory Trial on the Determination of the In Vitro Iron Dialysability from Food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.72, p. 415-424, 1996.

QING L.; LI Y.; MAREK P.; IVERSON B.L. Commercial proteases: present and future. **FEBS Letters**, v.587, p.1155-1163, 2013.

MA, J.; ZHANG, L.; LIANG, Z.; ZHANG, W.; ZHANG, Y. Recent advances in immobilized enzymatic reactors and their applications in proteome analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.632, p.1-8, 2009.

MARQUES, D. P.; CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A.J.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C.; MONTI, R. Separação das proteínas do soro do leite por DEAE-TRISACRYL. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.16, n.1, p.17-20, 2005.

MARSHALL, K.; Therapeutic Applications of Whey Protein. **Alternative Medicine Review**, v.9, n.2, p.136-156, 2004.

MASSOLINI G.; CALLERI E. Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods: Recent developments and analytical applications. **Journal of Separation Science**, v.28, p.7-21, 2005.

MATEO C., PALOMO J. M., FUENTES M., BETANCOR L., GRAZU V., LÓPEZ-GALLEGO F., PESSELA B. C.C., HIDALGO A., FERNÁNDEZ-LORENTE G., FERNÁNDEZ-LAFUENTE R., GUISÁN J. M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 274–280, 2006.

MELLINGER-SILVA, C.; ROSA, L.O.L.; STEPHAN, M.P.; BRÍGIDA, A.I.S.; CABRAL, L.M.C.; SILVA, G.O.; GUARIDO, K.L.; GOMES, D.M.; SILVA-SANTOS, J.E. Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate. **International Dairy Journal**, v.48, p.73-79, 2015.

MINE, Y.; LI-CHAN, E.C.Y.; JIANG, B. Biologically Active Food Proteins and Peptides in Health: An Overview. In: MINE, Y.; LI-CHAN, E.C.Y.; JIANG, B (1ªEd.). **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**. Singapura: Wiley – Blackwell, 2010. cap.1, p. 5-11.

MORR, C.V.; HA, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, p. 431-476, 1993

MOTA, M.V.T.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O; OLIVEIRA, M.B.P.; ROCHA, C.; TEIXEIRA, J.A.; TORRES, D.; GONÇALVES, M.P. Trypsin hydrolysis of whey protein concentrates: Characterization using multivariate data analysis. **Food Chemistry**, v.94, p. 278–286, 2006.

NAGPAL R., BEHARE P., RANA R., KUMAR A., KUMAR M., ARORA S., MOROTTA F., JAIN S., YADAV H. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. **Food and Function**, v.2, p. 18-27, 2011.

NEURATH H. Evolution of Proteolytic Enzymes. **Science**, v.224, p.350-357, 1984.

PARK, Y. W. Overview of Bioactive Components in Milk and Dairy Products. In: PARK, Y. W. (1ª Ed). **Bioactive Components in Milk and Dairy Products**. Singapura: Wiley – Blackwell, 2009. cap.1, p. 3-12

PEIXOTO, G., SAAVEDRA, N.K.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 8953-8966, 2011.

PETERSEN, B.L.; WARD, L.S.; BASTIAN, E.D; JENKINS, A.L.; CAMPBELL, J. VUKSAN, V. A whey protein supplement decreases post-prandial glycemia. **Nutrition Journal**, v. 8, n.47, p.1-5, 2009.

- POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R.J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk derived antioxidative peptides. **Amino Acids**, v.44, p.797-820, 2013.
- PRAZERES, A.R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v.110, p.48-68, 2012.
- RAMOS, O.S.; MALCATA, F.X. Food-Grade Enzymes. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.) **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Academic Press, 2011. v.3, chap.48, p. 555-569.
- RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**. v. 40, p. d343-d350, 2012.
- ROBERTS, N.B. Review article: human pepsins – their multiplicity, function and role in reflux disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.24, p.2-9, 2006.
- ROCHA, C.; GONÇALVES, M. P.; TEIXEIRA, J. A. Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis. **Process Biochemistry**. v.46, p.505-511, 2011.
- ROIG, M.J.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; LAGARDA, M.J. Calcium dialysability as an estimation of bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas. **Food Chemistry**, v. 64, p. 403-409, 1999.
- ROMARÍS-HORTAS, V.; GARCÍA-SARTAL, C.; BARCIELA-ALONSO, M.C.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Bioavailability study using an in-vitro method of iodine and bromine in edible seaweed. **Food Chemistry**, v.124, p.1747-1752, 2011.
- RUIZ-GIMÉNEZ, P.; SALOM, J.B.; MARCOS, J.F.; VALLÉS, S.; MARTÍNEZ-MAQUEDA, P.; RECIO, I.; TORREGROSA, G.; ALBORCH, E.; MANZANARES, P. Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. **Food Chemistry**, v.131, p.266-273, 2012.
- SAHA, B.C.; JORDAN, D.B.; BOTHAST, R.J. Enzymes, Industrial (overview). In: Schaechter, M. (Ed). **Encyclopedia of Microbiology**. Oxford: Elsevier, 2009, p. 281-294.
- SAMARANAYAKA, A.G.P; LI-CHAN, E.C.Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v.3, p. 229-254, 2011.
- SÁNCHEZ, J.; HERNÁNDEZ, E.; AULEDA, J.M.; RAVENTÓS, M. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: process and characterization. **Journal of Food Engineering**, v.103, p.147-155, 2011.
- SANTOS, L.F.; KOBLITZ, M.G.B. Proteases. In: KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2008. Cap.3, p.77-106.

SEGURA-CAMPOS, M.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D.; HERNANDEZ-ESCALANTE, V.M. Bioavailability of Bioactive Peptides. **Food Reviews International**, v.27, p. 213-226, 2011.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de queijo. **Revista de Nutrição**, v.17, n. 4, p.397-409, 2004.

SHELDON R.A.; van PELT S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v.42, p.6223-6235, 2013.

SILVA, A. M.; TAVARES, A. P. M.; ROCHA, C. M. R.; CRISTÓVÃO, R. O.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. Immobilization of commercial laccase on spent grain. **Process Biochemistry**, v.47, p.1095-1101, 2012.

SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v.57, p.1-11, 1996.

SOUZA, S. F.; GODBOLE, S.S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.52, p.59–62, 2002.

STANTON,C.; FITZGERALD, R.J.; DONNELLY, W.J.; O’CONNOR, P. Development of Technologies for separation and functional improvement of individual milk protein fractions. **The Dairy Products Research Centre.**, Moorepark, Fermoy, 2002.

TAVANO, O.L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.90, p.1-11, 2013.

UCHIKOBA T., FUKUMOTO S., ITAKURA T., OKUBO M., TOMOKIYO K., ARIMA K., YONEZAWA H. Detection of hydrolytic activity of trypsin with a fluorescence-chymotryptic peptide on a TLC plate. Bioscience, **Biotechnology and Biochemistry**,v.68, p.222-225, 2004.

VELASCO-REYNOLD, C.; NAVARRO-ALARCON, M.; SERRANA, H.L.G; PEREZ-VALERO, V.; AGIL, A.; LOPEZ-MARTINEZ. M.C. Dialysability of magnesium and calcium from hospital duplicate meals: influence exerted by other elements. **Biological Trace Element Research**, v.133, p.313-324, 2010.

VERMELHO, A.B.; MELO, A.C.N; SÁ, M.H.B.; SANTOS, A.L.S.; d’AVILA-LEVY, C.M.; COURI, S.; BON. E.P.S. Enzimas Proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas. In: BOM, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro:Interciência, 2008. Cap.11, p.173-287.

XU, D.; YUAN, F.; JIANG, J.; WANG, X; HOU, Z.; GAO, Y. Structural and conformational modification of whey proteins induced by supercritical carbon dioxide. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.12, p.32-37, 2011.

WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.42, p.353-375, 2002.

WARD, O.P. Proteases. In: Moo-Young M, editor. **Comprehensive Biotechnology**. Waterloo: Elsevier; 2011, v.3, chap.49, p. 571-582.

WHITCOMB D. C., LOWE M. E. Human pancreatic digestive enzymes. **Digestive Diseases and Sciences**, v.52, p.1-17, 2007.

WOODARD, S.L.; MAYOR, J.M.; BAILEY, M.R.; BARKER, D.K.; LOVE, R.T.; LANE, J.R.; DELANEY, D.E.; McCOMAS-WAGNER, J.M.; MALLUBHOTLA, H.D.; HOOD, E.E.; DANGOTT, L. J.; TICHY, S.E.; HOWARD, J.A. Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.38, p. 123–130, 2003.

YADAV, J.S.S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, SURAMPALLI, R.Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides, **Biotechnology Advances**, 2015. IN PRESS.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>

ZHANG, C.; XING, X.H. Enzyme Bioreactors. In: MOO-YOUNG, M. (Ed). **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Academic Press, 2011. v.2, chap.23, p.319-329.

ZHU, D.; WU, Q.; WANG, N. Industrial Enzymes. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.) **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Academic Press, 2011. v.3, chap.02, p. 3-12.

Capítulo 1

IMMOBILIZATION AND STABILIZATION OF TRYPSIN IN AGROINDUSTRIAL WASTE FOR PEPTIDES OBTAINMENT FROM WHEY PROTEIN: APPLICATION IN BATCH AND CONTINUOUS PROCESSES

Juliana Cristina Bassan^a; Thaís Milena de Souza Bezerra^b; Guilherme Peixoto^c; Clariana Zanutto da Cruz^a; Aline Buda dos Santos^b; Marco Filice^d; Rubens Monti^{a*}.

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department of Food Nutrition, UNESP – Univ. Estadual Paulista, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil.

^b Institute of Chemistry, Department of Biochemistry and Chemical Technology, UNESP - Univ. Estadual Paulista, 14800-060, Araraquara, SP, Brazil.

^c Faculty of Pharmaceutical Science, Department of Bioprocesses and Biotechnology - EBB, UNESP – Univ. Estadual Paulista, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil.

^d Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Marie Curie 2, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

ABSTRACT

In this study, trypsin (EC 3.4.2.1.4) was immobilized in a low cost alternative support (corn cob powder - CCP) for the obtainment of peptides with bioactive potential from the main byproduct of dairy industry. The pretreated support was activated with glyoxyl groups, glutaraldehyde and IDA-glyoxyl. The derivatives presented immobilization yields higher than 80% and retention of catalytic activity higher than 85%. The derivative trypsin-glyoxyl-CCP exhibited an excellent thermal stability at 65°C, which was 1111-fold higher compared to that obtained with the free enzyme. The derivatives trypsin-IDA-glyoxyl-CCP and trypsin-glutaraldehyde-CCP presented thermal stabilities 900 and 5.38-fold higher than that obtained with free enzyme, respectively. In the batch experiments the trypsin-IDA-glyoxyl-CCP presented activity retention of 91% and hydrolysis degree of 12.49% while with trypsin-glyoxyl-CCP these values were 87% and 15.46 %. The stabilized derivative trypsin-glyoxyl-CCP was also utilized in a continuous process employing an upflow packed-bed reactor. The hydrodynamic characterization of this reactor pointed out to a plugflow pattern and the kinetics of this system provided a relative activity of $3.04 \pm 0.01 \text{ U.g}^{-1}$ and an average hydrolysis degree of 23%, which were suitable for the obtainment of the targeted peptides.

Keywords: trypsin; corn cob powder; immobilization; reactor; peptides.

1. INTRODUCTION

In the enzyme immobilization technology one of the most important factors is the support material because its characteristics will determine the performance of the complex enzyme-support. The study of alternative supports for enzyme immobilization poses a challenge in the process because the support material must present physical resistance, hydrophilicity, easy derivatization, resistance against biological degradation, low acquisition cost and high interaction between enzyme-support per unit of weight [1]. Agroindustrial wastes present a great potential as alternative technology in enzymes immobilization because of their physical characteristics, chemical composition and low cost, which is one of the most attractive aspects for industrial processes [2-4]. Agriculture and the subsequent processing of its products annually generates million tons of lignocellulosic wastes (corn cob, rice straw, peanut and soy hulls, sugarcane bagasse, etc) that are utilized in many studies. After chemical or biotransformation, these wastes have been used because they are large sources of renewable materials with energetic potential, low cost and potential for application as new materials for environmental friendly processes in many industries [5].

The corn cob is generated as byproduct of corn processing. The corn culture is one of the most important agricultural activity worldwide [6]. Conventionally, corn cob is an agricultural waste employed as supplementation in animal feeding and organic fertilizer [7, 8]. Brazil is the third largest producer of corn and reached 52 million tons in 2012 [9]. A report prepared by CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), in september 2015, the brazilian corn crop has reached about 85 million tons. An increase of 63.4% compared to harvest from 2012 [10]. Generally corn cob represents 15% of the total amount of corn harvested [11, 12]. In other words, each kilogram of milled dry grains generates 0.15 kilogram of corn cob [13]. The elevated cost of commercial immobilization supports has encouraged the research for low cost alternatives [4]. Among the low cost alternatives, corn cob presents useful physical-chemical characteristics for the production of many value-added substances for food, energy, chemical and pharmaceutical industries [14,15], also including an ideal support for enzymes immobilization [4]. The immobilization of enzymes in lignocellulosic supports is reported in many works, among them the utilization of rice straw for the immobilization of invertase [16], laccase immobilized in spent grain [17], lipase in coconut fiber [18], trypsin in granular wastes from brewery industry [19] and laccase in coconut fiber [20].

The immobilization of enzymes has the potential to enhance the performance of many processes because it allows reuse cycles in enzymatic reactors, promotes easy recovering and purification of product. Moreover, the immobilized enzymes have their stability increased and catalytic effect is maintained for larger periods [21-23]. An efficient technique is the enzyme stabilization using the immobilization in solid supports through multipoint covalent bonds, which prevents conformational changes in the tertiary structure of the enzyme [24].

Trypsin (EC 3.4.21.4) is an endopeptidase from the serino-proteases strain that possess high hydrolysis capacity for most of proteins, thus it is largely used as chemical reagent in proteomics [25], in digestive insufficiency therapy [26], in chemical industry [27, 28] and in the obtainment of bioactive peptides through the hydrolysis of milk proteins such as caseins, because of their importance as source of biologically active peptides [29]. Some studies have demonstrated that bioactive peptides obtained from cheese whey are capable of modulating physiological responses in animal organism. Among them, the most important are: insulinotropic effect, antioxidant activity, immunomodulatory effects, opioid activity, anticarcinogenic and antihypertensive activities [30-34].

In this context, the aims of this study were the obtainment of whey protein hydrolysis products with bioactive potential using immobilized trypsin in agroindustrial waste and the determination of parameters in batch and continuous operation to upscale the process.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Agarose CL-6B (AG) was acquired from GE Healthcare Bio-Sciences (Uppsala Sweden) and corn cob powder (CCP) from SAGRAN (Industry of Animal Feed Ingredients Ltda.) Trypsin (EC 3.4.21.4), N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA), benzamidine hydrochloride, 2,3-epoxy-1-propanol, 1,2-ethanodiamine (EDA), glutaraldehyde, sodium periodate (NaIO₄), sodium borohydride (NaBH₄), iminodiacetic acid (IDA) and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, United States).

2.2. Preparation and physicochemical characterization of pretreated corn cob powder

- **CCP pretreatment:** firstly, dried CCP was suspended in a 70% ethanol solution (1:10; w/v) and heated at 121°C (1.3 Kg/cm²) for 20 minutes, then a rapid decompression was performed [35]. CCP was repeatedly washed with deionized water and vacuum filtered.

After that, the solid fraction was subjected to alkaline treatment (NaOH 2M) in an agitated suspension (140 rpm) for 24 h. Finally the washing and the vacuum filtering procedure was repeated.

- **Chemical composition:** the assesment was based in the quantification of lignin and sugars. Ethanol-soluble extractives were determined by extraction with 95% (v/v) ethanol in a Soxhlet apparatus. The samples were air-dried and milled to pass through a 0.84 mm screen. Approximately 3 g of the milled sample was extracted with 95% ethanol for 6 h in the Soxhlet apparatus. The percentage of extractives was determined on the basis of the dry weights of the extracted and non-extracted samples.

Ethanol-extracted lignocellulosic material samples were hydrolysed with 72% sulphuric acid at 30°C for 1 h in the ratio of 100:1 lignocellulosic sample (mg) to sulphuric acid (mL), respectively. The acid was diluted with the addition of 79 mL of deionized water and the mixture was heated at 125°C (1 atm) for 1 h. The residual material was cooled and filtered through a number 3 porous glass filter. The solids were dried to constant weight at 105°C and determined as insoluble lignin. The soluble lignin concentration in the filtrate was determined by the measurement of absorbance at 205 nm. The concentrations of monomeric sugars in the soluble fraction were determined by high-performance liquid chromatography (HPX87H column; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 45°C and an elution rate of 0.6 mL.min⁻¹ with 5 mmol.L⁻¹ sulphuric acid. Sugars were detected in a temperature-controlled refractive index detector at 35°C. Under these conditions, xylose, mannose and galactose eluted at the same time and appeared as a single peak. Glucose, xylose, arabinose and acetic acid were used as external calibration standards. No corrections were performed due to the sugar-degradation reactions that take place during acid hydrolysis. The factors used to convert sugar monomers to anhydromonomers were 0.90 for glucose and 0.88 for xylose and arabinose. Acetyl content was calculated as the acetic acid content multiplied by 0.72. This procedure was conducted in duplicate (data expressed as mean ± SD) [36]. Glucose was reported as glucan after correction by the hydrolysis factor. The other sugars and acetic acid were used to calculate the non-cellulosic polysaccharide content [37].

- **FTIR:** the identification of functional groups on the CCP surface was performed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy with attenuated total reflectance. The readings were realized in a Thermo Science Nicolet device. The analysis was conducted by CEMPEQ (Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados) of Chemistry Institute of Araraquara (IQ-UNESP)

- **Scanning Electron Microscopy (SEM):** The analysis was realized by a TOP COM-SM-300 device. The samples were prepared in a BAL-TEC SCD050 sputter coater. The gold sputter coating lasted 80 seconds at 25°C and 41 mA in vacuum [20].

- **Porosity:** The solute exclusion technique was utilized, resulting in the ratio of pore volume per g of material. In our study 0.1 g of dried CCP samples (105°C) were added to six dextrans probes (1.5%, m/m) with different molecular lengths (20 to 553 Å). The samples were kept in contact with the probes for 24 h at 25°C. Subsequently, the samples were centrifuged for 15 min (12.000 x g) and the supernatant was utilized for the determination of the probes final concentrations in a High Precision Liquid Chromatography (HPLC) equipped with Refractive Index Detector (RID). Deionized water was used as mobile phase at 0.4 mL.min⁻¹ and injection volume was 20 µL [37, 38].

2.3. Corn cob (CCP) and agarose (AG) supports activation

- **Glycerol support:** Each gram of CCP and AG was subjected to a preparation with 1.45 mL of deionized water, followed by controlled addition of 2.38 mL of NaOH (1.7 mol.L⁻¹) containing 0.068 g of sodium borohydride. The mixture was kept in ice bath and 1.7 mL of glycidol was dropped in soft agitation. The suspension was kept at 25°C for 18 h and filtered. After filtration, the support was exhaustively washed with deionized water to remove soluble residual chemicals and pH neutralization of the insoluble fraction [39].

- **Glyoxyl support:** Each gram of CCP and AG-glycerol was activated with glyoxyl groups through the addition of a solution containing 2 mL of NaIO₄ (100 mmol.L⁻¹) and 8 mL of deionized water. The mixture was kept in soft agitation for 2 h and the support was separated and washed with deionized water [39]. The glyoxyl groups were quantified through iodometry [40].

- **Amino support:** 5.71 mL of ethylenediamine (2 mol. L⁻¹) at pH 10.0 was added to 1g of CCP and AG-glyoxyl and the mixture was kept in agitation (100 rpm) for 2h at 25°C. The conversion (reduction) of remaining aldehydes groups to inert hydroxyls was performed using 5.71 mg of sodium borohydride added to the abovementioned mixture (2h in agitation). The amino support was filtered and washed with 10 volumes sodium acetate buffer (100 mmol.L⁻¹; pH 4.0) and deionized water [41].

- **Glutaraldehyde support:** 1g of CCP and AG-amino was homogenized in a 2mL phosphate buffer solution (200 mmol.L⁻¹; pH 7.0) containing 3 mmol.L⁻¹ of glutaraldehyde. The suspension was softly agitated for 15h at 25°C. Subsequently, the support was filtered and

washed with 20 volumes of a 25 mmol.L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.0) and deionized water [42].

- **IDA-glyoxyl support:** This procedure was conducted in two stages. *Stage 1:* The activation with epoxy groups consisted in the suspension of 1g of pretreated CCP and AG in 4.4 mL of deionized water, 1.6 mL of acetone, 1.1 mL of epichlorhydrine, 0.328 g of NaOH and 0.02 g of NaBH₄. The suspension was softly agitated for 16 h, filtered and washed with deionized water. The quantification of epoxy groups was performed using 0.1 g of support that was treated with 10 mL of a 0.5 mol.L⁻¹ H₂SO₄ solution for 2 h to execute the hydrolysis of epoxy groups. The hydrolyzed support was oxidized with NaIO₄ [39] and the number of epoxy groups was calculated as the difference of periodate consumption between the hydrolyzed support and the initial epoxy support. The consumption of periodate was determined using potassium iodide [40]. *Stage 2:* The support epoxy-CCP was treated with 0.5 mol.L⁻¹ iminodiacetic acid (pH 11.0) for 24h at 25°C. Subsequently, a filtration and washing is performed before the oxidation with NaIO₄ (100 mmol.L⁻¹) according to the method already described for glyoxyl-CCP and AG supports [43].

2.4. Preparation of trypsin derivatives

- **Trypsin-glyoxyl –AG and CCP:** For a gram of activated support it was added 10 mL of carbonate/sodium bicarbonate buffer 100 mmol.L⁻¹ (pH10.0) containing 5 mg of trypsin. The suspension was submitted to reciprocation for 24h at 25°C .

- **Trypsin-glutaraldehyde –AG and CCP:** For a gram of activated support it was added 10 mL of sodium phosphate buffer 50 mmol.L⁻¹ (pH 7.0) containing 5 mg of trypsin. The suspension was submitted to agitation for 2h at 25°C.

- **Trypsin-IDA-glyoxyl-AG and CCP:** This procedure was conducted in two stages. *Adsorption* (1): for a gram of activated support it was added 10 mL of sodium phosphate buffer 5 mmol.L⁻¹ (pH 7.0) containing 5 mg of trypsin (24h agitation/25°C). *Covalent bounding* (2): the derivative obtained in stage 1 was suspended in 10 mL carbonate/sodium bicarbonate buffer 5 mmol.L⁻¹ (pH 10.0) and kept in agitation for 24h (25 °C).

The immobilization in the different activated supports was performed in the presence of 3 mmol.L⁻¹ de benzamidine (competitive inhibitor of trypsin) to prevent autolysis. In all cases the immobilization efficiency was monitored through the reduction of supernatant activity up to 80% of initial value. The reaction was interrupted with the addition of sodium borohydride (1 mg.mL⁻¹ of solution) and soft agitation for 30 minutes. The derivatives were washed with deionized water and properly stored prior to utilization.

- **Determination of enzyme activity:** The enzymatic activity was determined by continuous colorimetric method by hydrolysis of BApNA at 405 nm ($\epsilon_{\text{pH}=9,0} = 9.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [44]. Free enzyme activity was measured in carbonate/bicarbonate buffer (50 mmol.L⁻¹; pH 9.0) containing BApNA (0.2 mmol.L⁻¹), benzamidine (3.0 mmol.L⁻¹) and 2% DMSO in a final volume of 2.2 mL at 25°C. The activity of the derivatives were determined by the incubation of 10 mg in carbonate/bicarbonate buffer (50 mmol.L⁻¹; pH 9.0) containing BApNA (0.2 mmol.L⁻¹) at 25°C. One enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme necessary for producing 1 μmol of *p*-nitroanilide per minute at the indicated temperature and pH 9.0 [45].

- **Thermal stability**

The soluble enzyme and the derivatives were incubated in TRIS-HCl 50 mmol.L⁻¹ buffer (pH 8.0) at 65°C and the activity was monitored up to achieving 50% of initial activity. The enzymatic activity was determined according to the described in section 2.5.

2.5. Determination of batch and continuous operation parameters

- **Reuse**

The reuse of derivatives was performed using cheese whey as substrate. A suspension of derivative (2.5 g) and 5 mL of cheese whey (pH 9.0) was kept for 24h in water bath (45°C) at soft agitation (140 rpm). At the end of each reuse cycle the cheese whey was separated from the derivative by vacuum filtration and a new substrate was added. Five reuse cycles were performed. The activity was monitored at the end of cycles through the precipitation of whey proteins with trichloroacetic acid 10%. Measurements of the supernatant ($\lambda=280 \text{ nm}$) were utilized in calculations, where 1 enzymatic unit (U) was defined as the amount of enzyme necessary to release 1 μmol tyrosine per minute in the evaluated conditions [46].

- **Whey protein hydrolysis characterization**

- **hydrolysis degree (HD):** The HD was determined by the modified TNBS method from [47]. In this assay 0.2 mL of sample or standard was added to 0.4 mL borate-NaOH buffer (5 mmol.L⁻¹) pH 9.5 and 0.4 mL TNBS (5 mmol.L⁻¹). The mixture was incubated at room temperature for 40 min. The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL (18 mmol.L⁻¹) Na₂SO₃ prepared in 2 mol.L⁻¹ NaH₂PO₄ and the absorbance was measured at 420 nm. *L*-Leucine (0.02 - 1.5 mmol.L⁻¹) was used as standard and the hydrolysis was calculated using the Equation 1:

$$- HD(\%) = 100 \frac{(AN_2 - AN_1)}{Npb} \quad (1)$$

Where AN_1 is the amino nitrogen content of the protein substrate before hydrolysis (mg.g^{-1}) and AN_2 is the amino nitrogen content of the protein substrate after hydrolysis (mg.g^{-1}). The nitrogen content of the peptide bonds in the whey (Npb) was 123.3 mg.g^{-1} [48]. The values of AN were obtained using the Equation 2:

$$- AN = \frac{ABS_1}{(\varepsilon.P)} \quad (2)$$

Where ABS is the absorbance of the sample, ε is the molar extinction coefficient for *L*-Leucine (mg.L^{-1}) and P is the protein concentration of the sample (g.L^{-1}).

- **RP-HPLC:** The hydrolysates were filtered using a GV Millex 0.45 μm unit (Millipore) and analyzed by RP-HPLC (Varian ProStar or Shimadzu LC 10A), which was equipped with a reverse phase column Nucleosil C18 (25 x 0.46 inch, 5 μm particle size, 300 Å pore size). The eluents of the mobile phase were as follows: A) water and 0.045% trifluoroacetic acid (TFA) and B) acetonitrile (ACN) and 0.036% TFA, with a 5-95% linear gradient of eluent B, a flow rate of 1.0 mL.min^{-1} for 30 min and with UV detection at 220 nm.

2.6. Characterization of the continuous process

An upflow packed-bed reactor (UPB) was employed to perform the continuous process. This reactor had a length to diameter ratio (L/D) of 7.4 a height of 0.4 m and a working volume of 0.794 L. The packed-bed occupied 58% of the total volume. The operation was conducted to provide the theoretical hydraulic retention time (HRT) of 78 h (39 h in the packed-bed). For this purpose the flowrate was adjusted to 10.1 mL.h^{-1} . A schematic diagram of the system is shown in Figure 1.

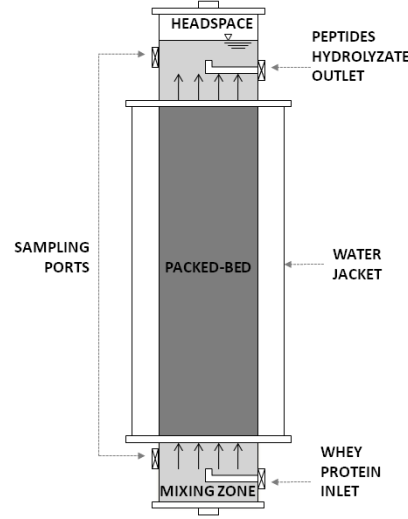


Figure 1: Upflow packed-bed reactor.

Hydrodynamic essays were performed with a Labquest 2 interface coupled with a Vernier conductivity probe to detect the tracer concentration (10 g.L^{-1}) in the reactor effluent. NaCl (C) was used for the step stimulus essay [49] and monitored for 170h (2 times the theoretical HRT). Data from the assays was processed with Microcal Origin 8.0[®] to evaluate the real HRT (θh), dispersion degree (σ_θ^2) and number of n-CSTR model [49] (N), utilizing Equations 3-5:

$$\theta h = \frac{\int_0^\infty t.C(t).dt}{\int_0^\infty C(t).dt} \quad (3)$$

$$\sigma_\theta^2 = 2 \left[\frac{D}{\mu.L} \right] \quad (4)$$

$$\sigma_\theta^2 = \frac{1}{N} \quad (5)$$

The experimental data was employed for the construction of C, F and E curves [49]. In Equation 3, C is the concentration and t is time. The variance of curves (σ^2) indicated the dispersion of distribution and was calculated for the determination of dispersion number ($D/\mu.L$) of curves through Equation 4, considering the low intensity dispersions. For the characterization of the hydrodynamic flow pattern, it was employed the n-CSTR model presented in Equation 5.

The reactor performance was evaluated in terms of substrate loading rate (Equation 6) and hydrolysis degree (Equation 1). Furthermore, enzymatic activity [46] was also utilized to

evaluate the feasibility of continuous operation without major losses of enzyme activity (Equation 7).

$$SLR = \frac{Q \cdot S}{V} \quad (6)$$

$$RA = \frac{\sum_{abs} \cdot 1000 \cdot V_t}{\varepsilon(M) \cdot time \cdot derivative} \quad (7)$$

In Equation 6, Q is the flowrate of substrate (L.h⁻¹), S is the substrate concentration (g) and V is the working volume of the reactor (L). In Equation 7, abs is the absorbance (nm), V_t is the total volume of the essay, ε (M) is the molar extinction coefficient, the time is measured in minutes and derivative is measured in grams.

3. RESULTS AND DISCUSSION

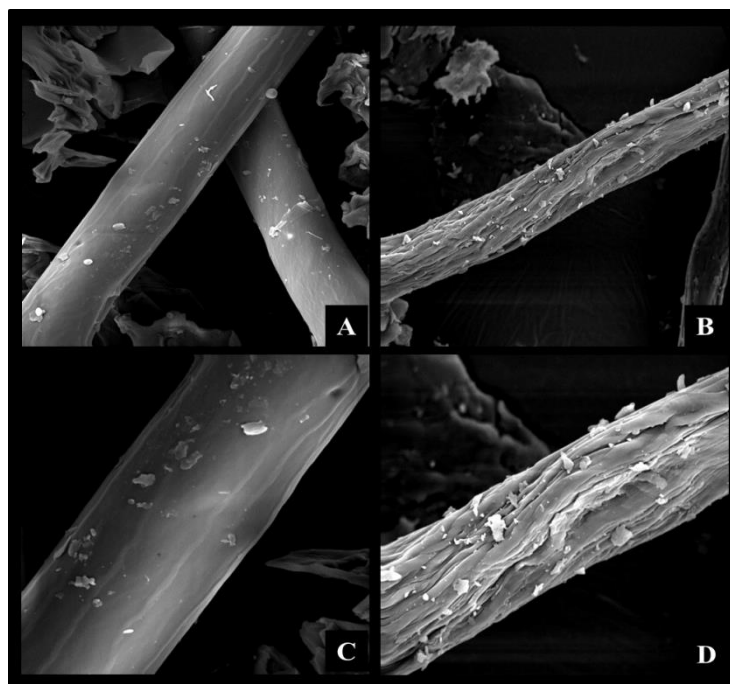
3.1 Pretreatment and characterization of corn cob powder

The association of two pretreatments, a physical-chemical (lignol process with fast decompression) and a chemical (alkaline) were done in order to decrease the lignocellulosic biomass recalcitrance through the delignification and partial solubilization of hemicellulose to reach higher porosity, specific surface area and exposition of reactive groups [50-52] required for the processes of activation and immobilization of enzymes.

The pretreatments induced modification in the morpho-chemical structure of CCP due to reaction of hydrolysis that promoted effective lignin removal and saponification of the ester bonds between lignin and hemicelluloses [51]. The chemical composition of CCP (Table 1) after the pretreatment demonstrated the total lignin reduction of ~67% (g/100g de CCP inicial). There was also the partial hydrolysis of hemicellulose, in terms of xylan, arabinoxyl groups and acetyl groups with a dry weight reduction of 53.8%. Generally, an alkali acts effectively in the amorphous sites (lignin and hemicellulose), hydrolyzing ester bonds, acetyl groups and uronic groups, etc [51, 53]. The glucan fraction was less affected after the pretreatments. The extractives (sugars, waxes, nitrogenous compounds) [52] that account for 6.12% of total CCP dry weight were also removed with high efficiency (Table 1 and Figure 2).

Table 1. Chemical characterization of pretreated corn cob powder.

Sample	Treatment yield (%)	Chemical composition ^a						Mass Balance ^b					
		Total Lignin	Glucan	Xilan	Arabinosyl Groups	Acetyl Groups	Extractives ^c	Total Lignin	Glucan	Xilan	Arabinosyl Groups	Acetyl Groups	Extractives ^c
Untreated	100	12.73±0.03	28.02±0.05	24.16±0.16	7.15±0.02	2.32±0.02	6.12	12.73±0.03	28.02±0.05	24.16±0.16	7.15±0.02	2.32±0.02	6.12
Steam/Alkali	52.6±0.02	8.01±0.18	47.62±0.87	22.08±0.20	7.43±0.01	0.03±0.03	0.97	4.21±0.02	25.04±0.03	11.61±0.08	3.91±0.01	0.01±0.01	0.51

^a g/100g of corn cob powder.^b g/100g of initial corn cob powder.^c Ethanol soluble compounds.**Figure 2.** Scanning electron microscopy of corn cob powder after physicochemical pretreatment: Natural fiber 1000 X (A) and 2000 X (C); Thermal decomposition in 70% ethanol + 2M NaOH (8°C/24 h in slow stirring) 1000 X (B) and 2000X (D).

According to Figure 2, the association of pretreatments were capable to remove major part of the homogeneous outer layer that correspondent to the waxy fraction (Figure 2A-C) resulting in a irregular structure that presented fissures all over its extension (Figure 2B-C) which improved the access to reactive groups in the monomeric units that compose the polymeric structure of cellulose and hemicellulose.

The observation of the FTIR spectrum of non-treated and pretreated CCP (Figure 3) suggested that occurred major modifications related to lignin and hemicellulose that corroborate the results obtained in the chemical composition (Table 1).

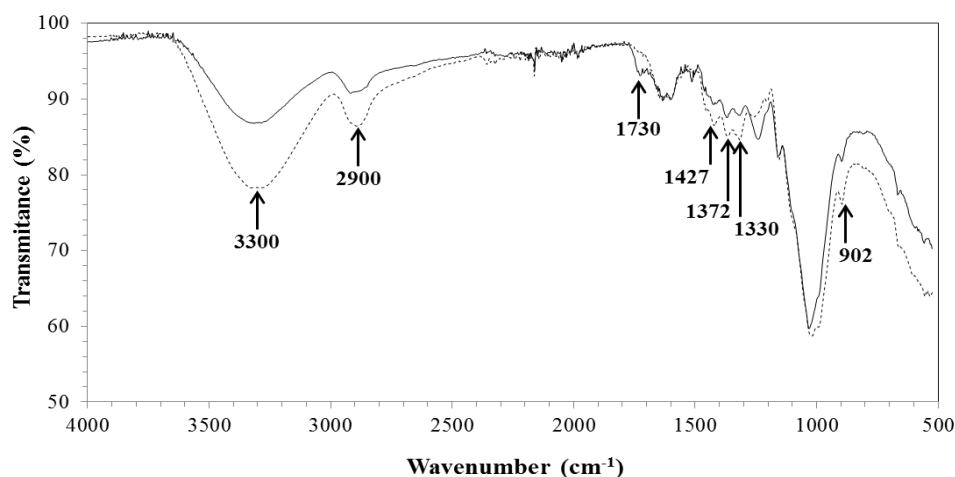


Figure 3. Infrared analysis of corn cobs powder. Non-treated CCP (solid line) and pretreated CCP (dotted line).

The increase of peak 902 cm^{-1} refers to the narrowing of the C – O – C β -glycosidic bonds that is associated with the amorphous hemicellulose and cellulose [52, 54] and the peak 1730 cm^{-1} represents the C = O groups of hemicellulose, which disappeared after the pretreatments, indicating the partial solubilization of this polymer [55]. There was also the increase in the absorption related to peak length of $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, that corresponds to the stretching of O – H, indicating that there was a rupture of H bonds of cellulose [52] and the solubilization of the monomeric unities of hemicellulose. Another modification was observed in the peak 2900 cm^{-1} (stretching of C – H) indicating the rupture of methyl/methylene groups of cellulose [52, 54]. The peak 1427 cm^{-1} was also increase after the pretreatments due to the vibrations of the aromatic rings combined with the plane deformation C – H of lignin [20, 54]. The peaks 1330 e 1372 cm^{-1} also indicated lignin removal because they represent the O – H phenolic and the flexing of C – H in – C – CH₃, respectively [54].

Regarding the porosity (Figure 4), the volume of pores accessible to enzyme and the pore size distribution were determined through the probes diffusion with different diameters (20 to $553\text{ \AA}$) inside the lignocellulosic matrix. The porosity of the pretreated CCP presented an accessible volume to trypsin molecule of 1.57 mL.g^{-1} , which present an orthorhombic

structure with dimensions $a = 54.84$, $b = 58.61$ and $c = 67.47$ Å [56]. With this pores distribution/dimension, we can infer that the pretreated CCP has a geometry that allows the immobilization of trypsin inside the pore and on the surface of the support.

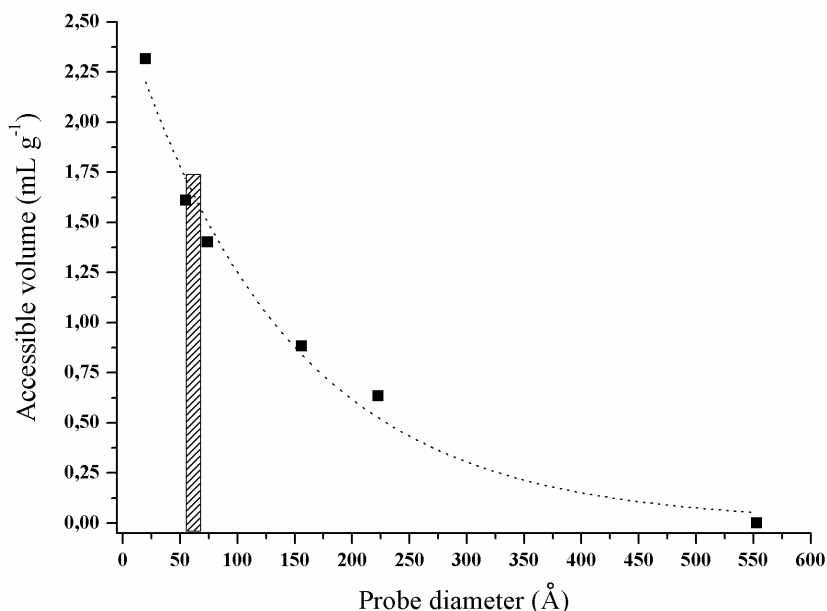


Figura 4. Porosity of the pretreated corn cob powder. The accessible volume per gram of CCP was performed by solute exclusion technique. Six probes with sizes between 20 and 553 Å were used. The indicated area represents the structural dimension of trypsin.

3.2 Immobilization and biochemical characterization of trypsin

The trypsin was immobilized in all of the supports that were activated. The utilization of a lignocellulosic matrix of the CCP pretreated presented a cheap and abundant alternative for the immobilization of this enzyme. For the determination of the alternative support efficiency, a comparative study was conducted with agarose (AG), which is a commercial support largely employed in the immobilization of enzymes, including trypsin [57-59]. As observed in Table 2 the immobilization rate for all the activated supports was higher than 80%, in which the CCP supports presented the highest levels. The exception occurred with IDA-glyoxyl-CCP possibly due to lower number of reactive groups in the support. In the final stage of activation with glyoxyl groups the determination of aldehyde groups by iodometry, resulted in $97 \mu\text{mol.s.g}^{-1}$ agarose and $150 \mu\text{mol.s.g}^{-1}$ corn cob powder after the oxidation with $200 \text{ mmol.L}^{-1} \text{NaIO}_4$.

Tabela 2. Kinetic properties of trypsin immobilized on activated corn cob powder.

Derivatives	IY ^a (%)	EA ^b (%)	OpH ^c	OT ^d (C°)	Half-lifetime (h)	SF ^e
Free trypsin	-	-	9.0±0.01	35±0.05	0,18	
Trypsin-glyoxyl-AG*	82.02±0.0	89.66±0.0	9.0±0.01	50±0.02	212	1,177
Trypsin-glyoxyl-CCP**	85.93±0.0	86.70±0.0	9.0±0.03	60±0.03	200	1,111
Trypsin-glutaraldehyde-AG	83.25±0.0	94.33±0.0	9.0±0.03	45±0.01	0.8	4.44
Trypsin-glutaraldehyde-CCP	90.64±0.0	86.45±0.0	8.5±0.02	45±0.04	0.97	5.38
Trypsin-IDA-glyoxyl-AG	87.25±0.0	85.75±0.0	9.0±0.03	55±0.03	110	611
Trypsin-IDA-glyoxyl-CCP	84.36±0.0	86.92±0.0	9.0±0.01	50±0.02	162	900

*AG: agarose; **CCP: corn cob powder

^a Immobilization yield (IY): percentage of trypsin immobilized on different supports.

^b Expressed activity (EA): ratio between the activity in the derivatives obtained and the initial activity of the offered enzyme.

^c Optimum temperature.

^d Optimum pH.

^e Stabilization factor (SF): ratio between the half-life of the immobilized enzyme and that of the corresponding free enzyme.

In case of the IDA-glyoxyl-AG and IDA-glyoxyl-CCP we obtained 80 $\mu\text{mol.s}^{-1}$ agarose (epoxy groups) and 195 $\mu\text{mol.s}^{-1}$ corn cob powder after hydrolysis with 500 mmol.L^{-1} H_2SO_4 and oxidation with 200 mmol.L^{-1} NaIO_4 [43]. From the total amount of epoxy groups generated (IDA-glyoxyl-AG and IDA-glyoxyl-CCP), about 90% were oxidized into glyoxyl groups. The activation of CCP support is likely related to the hydrophilic characteristic of vegetal fibers due to high density of hydroxyl groups that are distributed along the surface of these materials [60], which are necessary for the chemical activation and immobilization of enzymes. The removal of lignin and, partially, the hemicellulose (Table 2) resulted in the breakdown of the polymeric matrix (Figure 2), providing higher accessibility to the targeted chemical groups. In our study we obtained activated CCP-supports that presented high efficiency in the immobilization of trypsin and the derivatives presented recovered activities similar to those AG with levels above 85% (Table 2). The same range of activity was also found in the study by Marques [45]. The optimum pH, temperature and half-life at 65°C (pH 8.0) of the derivatives were also determined (Table 2). Regarding the optimum pH, there was not relevant difference (trypsin-glutaraldehyde-CCP) with free enzyme. Regarding the optimum temperature, there was difference between free enzyme (35°C) and all derivatives (45°C-60°C). One of the main objectives with immobilization procedure is to achieve enzyme stability [61-63] and in our study the half-life at 65°C (pH 8.0) varied according to the type of supports activation when compared to the free trypsin (~11 minutes).

The highest half -life were found with the derivatives obtained through multipoint covalent immobilization (glyoxyl and IDA-glyoxyl derivatives) because of the structural rigidification that was conferred to the enzyme, as previous related in literature [63].

3.3. Thermal stability of derivatives

The thermal stabilities of soluble enzymes and trypsin-AG/trypsin-CCP derivatives were investigated. All derivatives presented higher stability (65°C; pH 8.0) compared to free enzyme. The derivatives trypsin-glyoxyl-AG (1,177-fold) and trypsin-glyoxyl-CCP (1,111 - fold) were the most stable followed by trypsin-IDA-glyoxyl-CCP (900-fold), trypsin-IDA-glyoxyl-AG (611-fold), trypsin-glutaraldehyde-CCP (5.38-fold) and trypsin-glutaraldehyde-AG (4.44-fold), respectively (Table 2 and Figure 5 A-B).

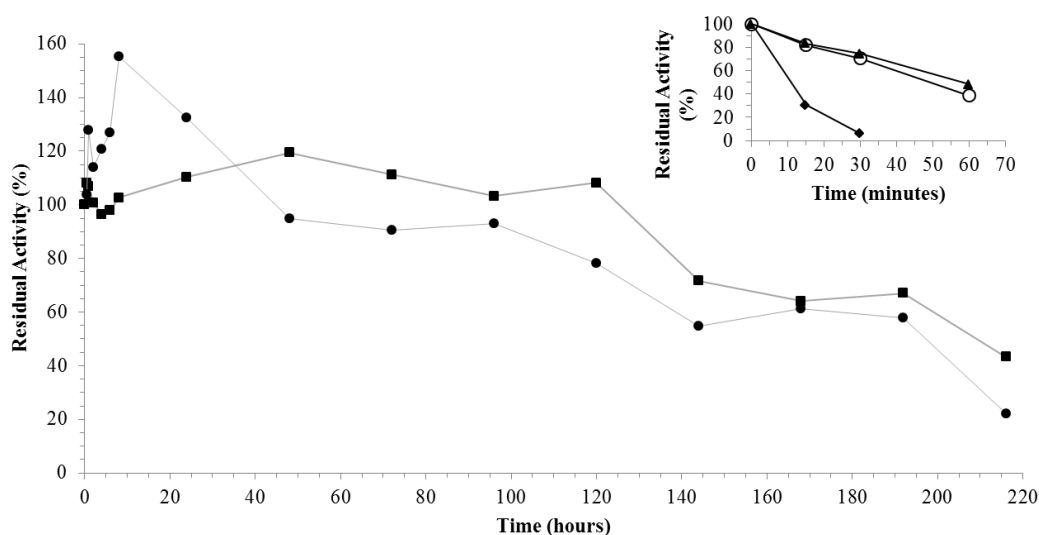


Figure 5A. Thermal stability of free trypsin and derivatives. (■) trypsin-glyoxyl-agarose derivative; (●) trypsin-glyoxyl-CCP derivative. The inner graph represents the time-course of thermal stability of (♦) free trypsin; (▲) trypsin-glutaraldehyde-agarose derivative; (○) trypsin-glutaraldehyde-CCP-derivative. Experiments were carried out at 65°C and pH 8.0. The activity was measured at 25°C and pH 9.0

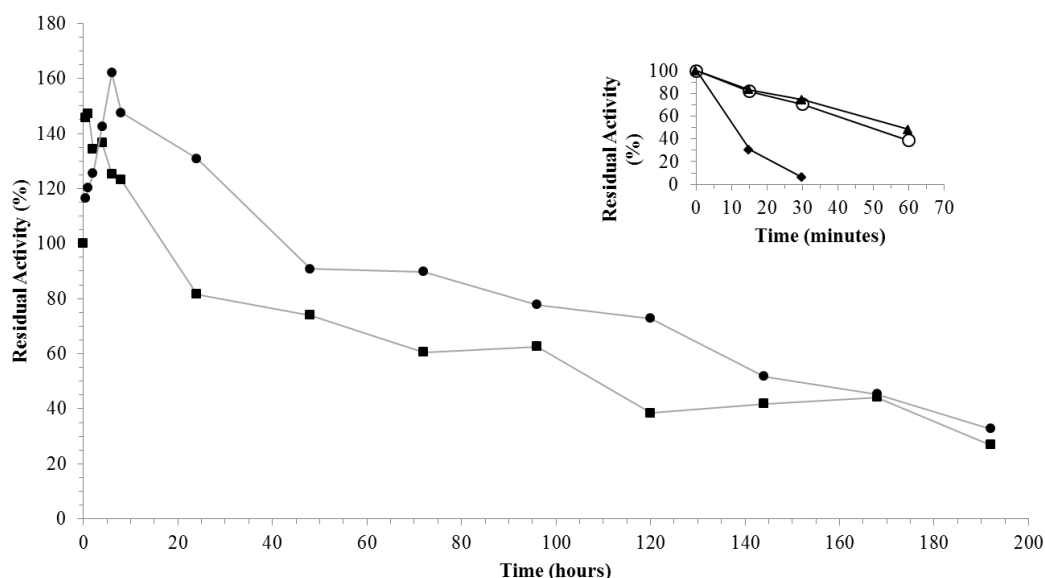


Figure 5B: Thermal stability of free trypsin and derivatives. (■) trypsin-IDA-glyoxyl-agarose derivative; (●) trypsin-IDA-glyoxyl-CCP derivative. The inner graph represents the time-course of thermal stability of (◆) free trypsin; (▲) trypsin-glutaraldehyde-agarose derivative; (○) trypsin-glutaraldehyde-CCP-derivative. Experiments were carried out at 65°C and pH 8.0. The activity was measured at 25°C and pH 9.0

The elevated stabilization factors presented by trypsin-glyoxyl-AG and trypsin-glyoxyl-CCP derivatives are likely related to the presence of high density lysine residues along trypsin (Figure 6), in which the primary reactive amino groups (pH 10.0) allow the establishment of stable multipoint covalent bonds with reactive aldehyde groups in the surface of the support material [24]. Effective results were also obtained in the study by [45, 58]. The same performance was observed for trypsin-IDA-glyoxyl-CCP and trypsin-IDA-glyoxyl-AG derivatives that presented higher stabilization factors than those for free enzymes. The trypsin-glutaraldehyde-CCP and trypsin-glutaraldehyde-AG derivatives presented the lowest thermal stability among the others derivatives evaluated. The explanation that best fits the data is that immobilization in glutaraldehyde supports occurs in pH 7.0 through the bond between the reactive amino terminal of enzyme and the aldehyde groups of support. In the case of trypsin, the simple covalent bond was not suitable to provide effective stability in our experimental conditions. These are explained based on the way that enzyme docks into the different activated supports. The immobilization is oriented to different sites of the enzyme according to the reactive group present in the support, immobilization pH, reactive groups in the surface of the enzyme in predetermined conditions and the rigidification degree that

provides thermodynamic stability to the tertiary structure of enzyme after immobilization [63]. According to the results obtained we verified that CCP can be employed for the immobilization of enzymes and it presented similar characteristics to those found in agarose. Moreover, the greatest advantages of CCP is the lower cost, the large availability, high mechanical resistance, high hidrophilicity and it is an “eco-friendly alternative”.

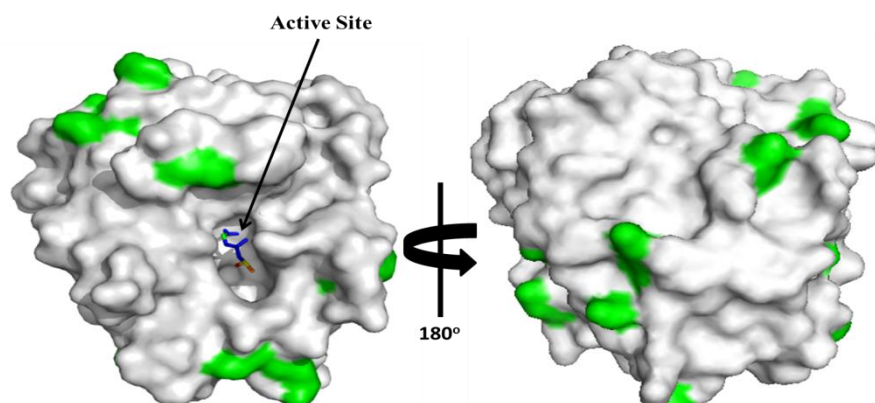


Figura 6. 3D surface structure of trypsin (pdb code 5ptp): Trypsin structure with external lysine residues marked in green. 3D surface structure of trypsin was obtained using PyMol 1.7.4.4.

3.4. Application of derivatives in batch process

The trypsin-glyoxyl-AG/CCP and trypsin-IDA-glyoxyl-AG/CCP were used in the hydrolysis of cheese whey treated up to 5 reuse cycles (45°C/24 h per cycle). Each of the evaluated derivatives had their hydrolysis profile qualitatively analyzed via RP-HPLC, the hydrolysis degree was analyzed with the TNBS reaction and the relative activity using the [46] method through the precipitation of soluble proteins with TCA. Figure 7 shows the chromatographic profiles from cycle 1 and cycle 5 of the hydrolysis performed with the different derivatives.

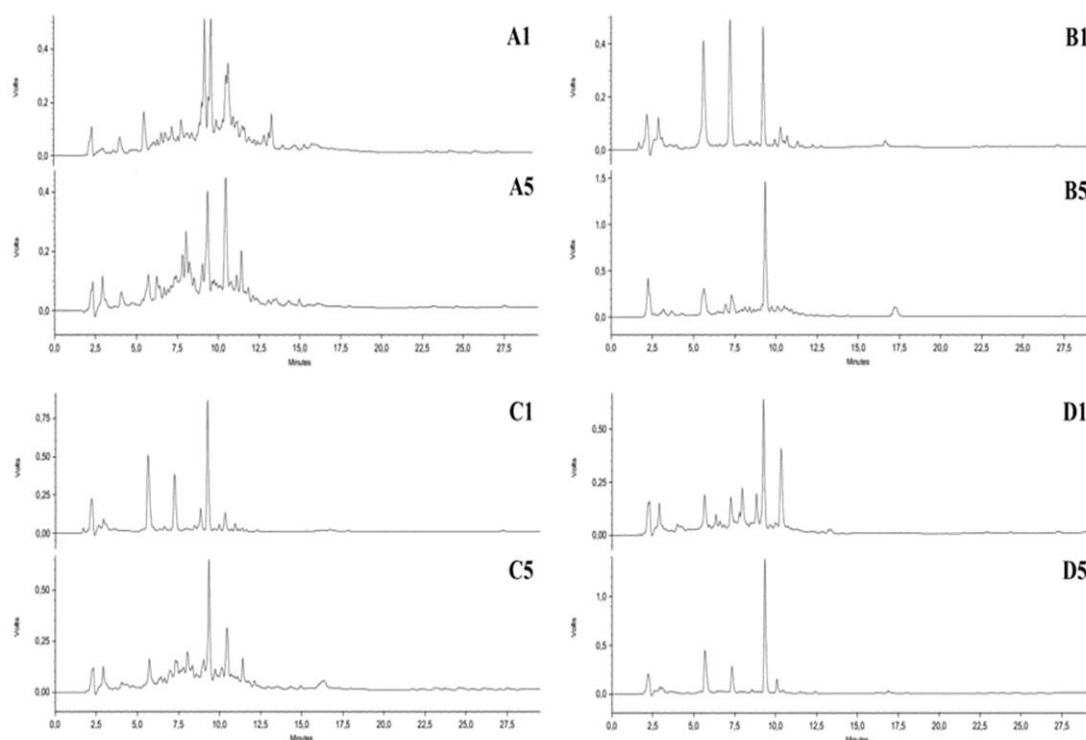


Figure 7. Hydrolysis profile of the cheese whey proteins performed by RP-HPLC. A comparison between the first and fifth cycles of reuse derivatives stabilized trypsin-glyoxyl-AG (A1 and A5) and CCP (B1 and B5); trypsin-IDA-glyoxyl-AG (C1 and C5) and CCP (D1 and D5).

According to Figure 7, the type of activation/immobilization produced protein hydrolysates with similar profiles concerning the peaks observed in the retention times near to 2.25, 5.75, 7.5, 9.5 e 10.5, which demonstrate that enzyme specificity had not changed in the different derivatives. However, there were some small differences in the hydrolysis profile that were likely related to the support geometry and substrate diffusion. The larger difference was observed in the chromatograms related to cycle 1 and 5 of trypsin-glyoxyl-AG derivative (Figure 7A1 and A5) that presented large number of peaks between the retention times of 2 and 13 minutes. The results concerning the hydrolysis degree showed changes between the 5 reuse cycles of each evaluated derivative (Figure 8).

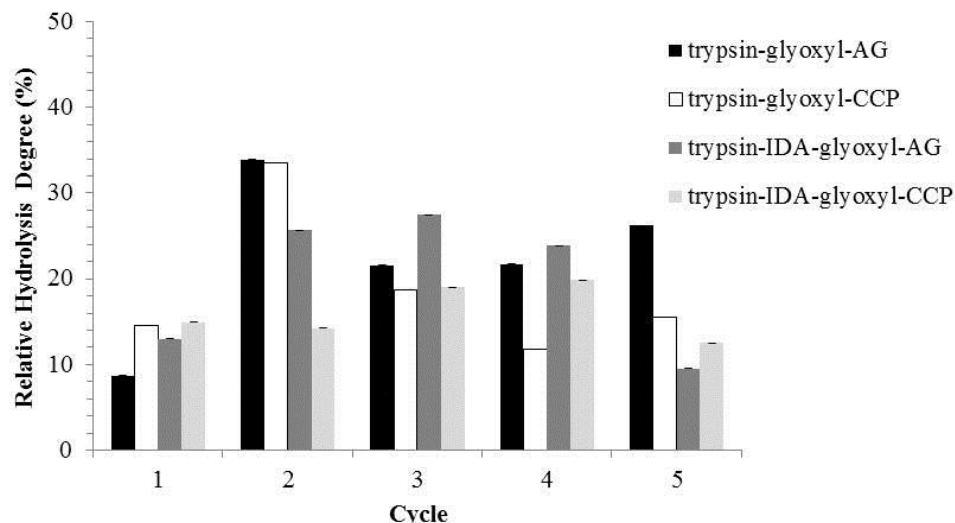


Figure 8. Reuse cycles with stabilized trypsin derivatives.

These variations were probably related to factors such mass transfer between substrate and immobilized enzyme since the cheese whey is composed by a heterogeneous mixture of proteins having molecular mass from 14.4 kDa to > 97 kDa and the orientation that enzyme was immobilized in both supports with different type of activations. It was also verified that trypsin-glyoxyl-AG and trypsin-IDA-glyoxyl-AG derivatives promoted the higher hydrolysis degree. However, the trypsin-glyoxyl-CCP and trypsin-IDA-glyoxyl-CCP derivatives also presented hydrolysis degree higher than 11%. It is worth mentioning that TNBS method depends on the reaction with α and ϵ -amino groups of the amino acids residues [64]. In each hydrolysis cycle the relative activity of the different derivatives was determined (Figure 9). The variations in activity for each hydrolysis cycle was compared to the activity obtained in cycle 1, which was considered as 100%.

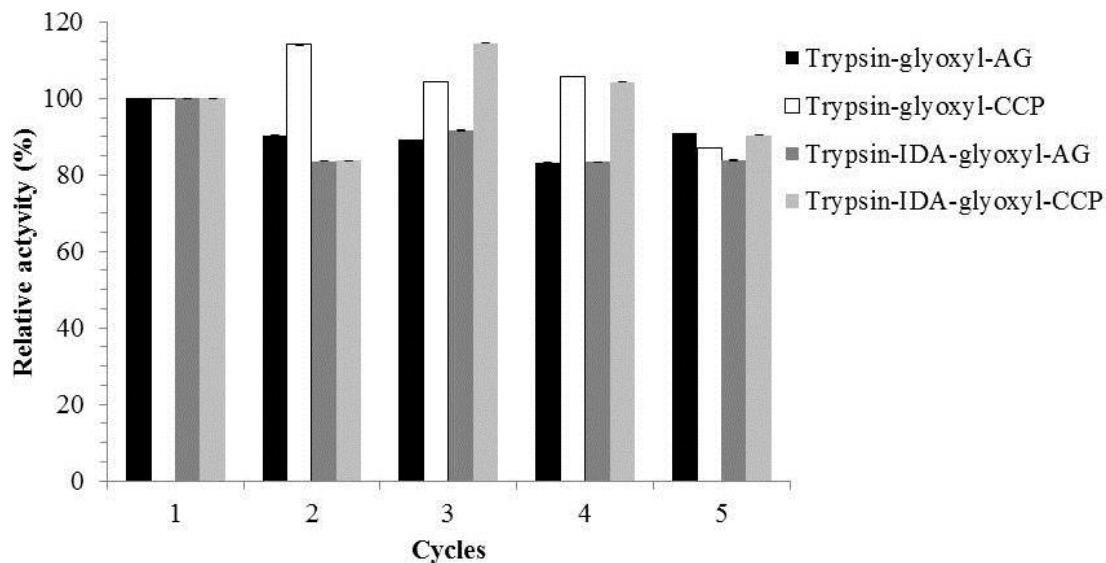


Figure 9. Relative activities of the stabilized trypsin derivatives after five reuse cycles.

The derivatives showed suitable retention of relative activity for reuse cycle 5 with values above 80% compared to cycle 1. In general, all the derivatives evaluated showed good results for the cheese whey hydrolysis. Overall, the trypsin-CCP derivatives became more attractive due to cost and availability of the support material compared to those for agarose.

3.5 Application of derivatives in continuous process

The characterization of the UPB reactor pointed out that real HRT was 84.4 h. Figure 10 shows that this value was close to the theoretical HRT (78 h). It is worth mentioning that in the reaction compartment (packed-bed) the cheese whey proteins interacted with the derivatives for 42 h, which was the HRT of this reactor section (Figure 1).

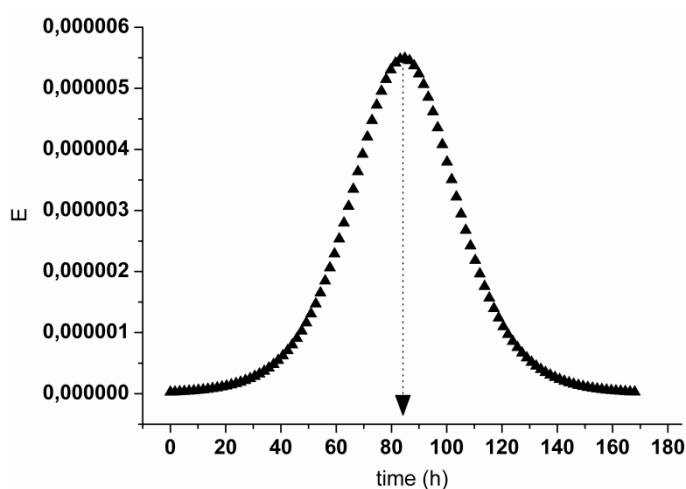


Figure 10. Response curve “E” of the hydrodynamic essay.

In the experimental condition evaluated, the dispersion was 0.034 and the “n” of n-CSTRs model was 14.7, which indicates similarity with the hydrodynamic of a plug-flow reactor (PFR). This hydrodynamic pattern (PFR) is interesting for the process because it corresponds to series of CSTRs operating sequentially and results in a higher volumetric unit conversion [65]. According to the profile shown in Figure 10 and the parameters (θ_h ; $D/u.L$; n) obtained in the hydrodynamic essay, there was not clogging of the packed-bed, flow channelling or pressure drop in the system. Hence, physical limitations of the UPB reactor have not affected the process negatively. Instead, the verification of HD and RA indicated that in continuous operation the performance was further increased.

The average hydrolysis degree in the batch processes (5 reuse cycles - Figure 8) was 18.8% while along the continuous operation (UPB reactor) this value was 23%. This difference is possibly related to improved mass transfer in the UPB reactor due to continuous removal of reaction solution and avoidance of products inhibition. In terms of relative activity the batch and continuous process presented $3.25 \pm 0.03 \text{ U.g}^{-1}$ and $3.04 \pm 0.01 \text{ U.g}^{-1}$, respectively. These similar results were expected since the tests employed in the evaluation of relative activity did not depend on mass transfer characteristics. The continuous process was conducted for 99 h (4 days) at the flowrate of 10.1 mL.h^{-1} , resulting in the substrate loading rate (SLR) of 91.58 mg of proteins per hour per liter of reactor. It is likely that operations with higher SLRs would be perfectly feasible because the HD of 23% is considered high compared to others reported in the literature. In the studies by [66] utilizing soluble trypsin and [19] employing trypsin immobilized in spent grains, the HDs after 3 h of reaction were 4.2 and 4.8%, respectively. As a consequence our system could process higher protein concentrations in lower HRTs until the HD started to decrease to values below 23%.

4. CONCLUSION

The corn cob powder pretreatment for trypsin immobilization was successfully performed and allowed the covalent binding inside the pore and in the surface of the support. Moreover, the biochemical characterization of immobilized trypsin pointed out that trypsin-glyoxyl-CCP derivative had the highest performance regarding the immobilization yield (IY) and very similar results for expressed activity (EA), half-lifetime (HF) and stabilization factor (SF) comparatively to those obtained with trypsin-glyoxyl-AG.

In the batch experiments, all derivatives (trypsin-glyoxyl-AG/CCP and trypsin-IDA-glyoxyl-AG/CCP) were effective in the cheese whey hydrolysis with activities higher than 80% after 5 reuse cycles. In this system the hydrolysis degree using trypsin-glyoxyl-CCP was higher than that obtained in batch experiments. In addition, the other parameters determined in the reactor operation indicated that the system was underutilized and higher flowrates and protein concentrations could be processed.

Overall, the results from batch and continuous experiments collectively suggest positive impacts for future industrial applications due to the development of high performance immobilization of trypsin in low cost supports and their application in a suitable reactor configuration for the conversion of dairy wastes into value-added products.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Bassan JC thanks Brazilian Agencies FAPESP (2012/07680-4 and 2014/12563-2) for financial support. The authors also thank Dr. Rafael Rodrigues Hatanaka from CEMPEQC (Chemistry Institute-UNESP) for IR analysis and Dr. André Ferraz (Engineering School of Lorena/EEL-USP) for porosity analysis; We would like to thank the LME-IQ for the SEM facilities.

6. BIBLIOGRAPHY

- [1] Brena BM, Batista-Viera F. Immobilization of Enzymes. In: Guisan JM, editor. *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2 ed. New Jersey: Human Press Inc.; 2006. p. 15-30.
- [2] Banerjee S, Mudliar S, Sen R, Giri B, Satpute D, Chakrabarti T, et al. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2010;4(1):77-93.
- [3] Genisheva Z, Mussatto SI, Oliveira JM, Teixeira JA. Evaluating the potential of wine-making residues and corn cobs as support materials for cell immobilization for ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2011;34(1):979-85.
- [4] Ittrat P, Chacho T, Pholprayoon J, Suttiwarayanon N, Charoenpanich J. Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014;3:77-82.
- [5] Azubuike CP, Okhamafe AO. Physicochemical, spectroscopic and thermal properties of microcrystalline cellulose derived from corn cobs. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 2012;1-9.
- [6] Cao Q, Xie KC, Lv YK, Bao WR. Process effects on activated carbon with large specific surface area from corn cob. *Bioresource Technology*. 2006;97(1):110-5.
- [7] Wanitwattananurumlug B, Luengnaruemitchai A, Wongkasemjit S. Characterization of Corn Cobs from Microwave and Potassium Hydroxide Pretreatment. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation* 2012;6:528-32.

- [8] Yan JH, Hou YC, Ren SH, Niu MG, Wu WZ. Two-Step Treatment of Corn Cob in H₂O-SO₂ System. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2014;53(34):13256-63.
- [9] Alves CCO, Franca AS, Oliveira LS. Removal of phenylalanine from aqueous solutions with thermo-chemically modified corn cobs as adsorbents. *Lwt-Food Science and Technology*. 2013;51(1):1-8.
- [10] Ashour A, Amer M, Marzouk A, Shimizu K, Kondo R, El-Sharkawy S. Corncobs as a Potential Source of Functional Chemicals. *Molecules*. 2013;18(11):13823-30.
- [11] Kaliyan N, Morey RV. Densification characteristics of corn cobs. *Fuel Processing Technology*. 2010;91(5):559-65.
- [12] Zhang Y, Ghaly AE, Bingxi L. Physical Properties of Corn Residues. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2012;8:44-53.
- [13] Rivas B, Moldes AB, Dominguez JM, Parajo JC. Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: a mathematical interpretation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004;34(7):627-34.
- [14] Sanchez C, Egues I, Garcia A, Llano-Ponte R, Labidi J. Lactic acid production by alkaline hydrothermal treatment of corn cobs. *Chemical Engineering Journal*. 2012;181:655-60.
- [15] D'Souza SF, Godbole SS. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2002;52(1):59-62.
- [16] Silva AM, Tavares APM, Rocha CMR, Cristóvão RO, Teixeira JA, Macedo EA. Immobilization of commercial laccase on spent grain. *Process Biochemistry*. 2012;47:1095-101.
- [17] Brigida AI, Pinheiro AD, Ferreira AL, Goncalves LR. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008;146(1-3):173-87.
- [18] Rocha C, Gonçalves MP, Teixeira JA. Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis. *Process Biochemistry*. 2011;46:505-11.
- [19] Bezerra TMS, Bassan JC, Santos VTO, Ferraz A, Monti R. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. *Process Biochemistry*. 2015;50:417-23.
- [20] DiCosimo R, McAuliffe J, Poulouse AJ, Bohlmann G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(15):6437-74.
- [21] Guisan JM. Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins. In: Guisan JM, editor. *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2 ed. New Jersey: Human Press Inc.; 2006. p. 1-13.
- [22] Tavano OL. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. 2013;90:1-11.
- [23] Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, Lopez-Gallego F, et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39(2):274-80.
- [24] Massolini G, Calleri E. Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods: Recent developments and analytical applications. *Journal of Separation Science*. 2005;28(1):7-21.
- [25] Woodard SL, Mayor JM, Bailey MR, Barker DK, Love RT, Lane JR, et al. Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2003;38:123-30.
- [26] Ali NE, Hmidet N, Ghorbel-Bellaaj O, Fakhfakh-Zouari N, Bougatef A, Nasri M. Solvent-Stable Digestive Alkaline Proteinases from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: Characteristics, Application in the Deproteinization of Shrimp Waste,

- and Evaluation in Laundry Commercial Detergents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011;164(7):1096-110.
- [27] Ktari N, Ben Khaled H, Nasri R, Jellouli K, Ghorbel S, Nasri M. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. *Food Chemistry*. 2012;130(3):467-74.
- [28] Nagpal R, Behare P, Rana R, Kumar A, Kumar M, Arora S, et al. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food & Function*. 2011;2(1):18-27.
- [29] Lekrisompong PP, Miracle RE, Drake M. Characterization of flavor of whey protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(10):6318-27.
- [30] Marshall K. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*. 2004;9(2):136-56.
- [31] Petersen BL, Ward LS, Bastian ED, Jenkins AL, Campbell J, Vuksan V. A whey protein supplement decreases post-prandial glycemia. *Nutrition Journal*. 2009;8:47.
- [32] Power O, Jakeman P, FitzGerald RJ. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*. 2013;44(3):797-820.
- [33] Ruiz-Gimenez P, Salom JB, Marcos JF, Valles S, Martinez-Maqueda D, Recio I, et al. Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. *Food Chemistry*. 2012;131(1):266-73.
- [34] Abraham E, Deepa B, Pothan LA, Jacob M, Thomas S, Cvelbar U, et al. Extraction of nanocellulose fibrils from lignocellulosic fibres: A novel approach. *Carbohydrate Polymers*. 2011;86(4):1468-75.
- [35] Ferraz A, Baeza J, Rodriguez J, Freer J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresource Technology*. 2000;74(3):201-12.
- [36] Santi CJ, Milagres AMF, Ferraz A, Carvalho W. The effects of lignin removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Cellulose Chemistry and Technology*. 2013;20:3165-77.
- [37] Stone JE, Scallan MA. Structural model for the cell wall of water-swollen wood pulp fibres based on their accessibility to macromolecules. *Cellulose Chemistry and Technology*. 1968;2:343-58.
- [38] Guisan JM. Aldehyde-Agarose Gels as Activated Supports for Immobilization-Stabilization of Enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 1988;10(6):375-82.
- [39] Nevell TP. Methods in Carbohydrate Chemistry. In: Whistler B, editor. 3. New York: Academic Press; 1963. p. 210-25.
- [40] Fernandez-Lafuente R, Rosell CM, Rodriguez V, Santana C, Soler G, Bastida A, et al. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology*. 1993;15(7):546-50.
- [41] Betancor L, López-Gallego F, Alonso-Morales N, Dellamora G, Mateo C, Fernandez-Lafuente R, et al. Glutaraldehyde in Protein Immobilization. In: Guisan JM, editor. *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2 ed. New Jersey: Human Press Inc.; 2006. p. 57-64.
- [42] Mateo C, Bolivar JM, Godoy CA, Rocha-Martin J, Pessela BC, Curiel JA, et al. Improvement of Enzyme Properties with a Two-Step Immobilization Process on Novel Heterofunctional Supports. *Biomacromolecules*. 2010;11(11):3112-7.
- [43] Silva JF, Esposito TS, Marcuschi M, Ribeiro K, Cavalli RO, Oliveira V, et al. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). *Food Chemistry*. 2011;129(3):777-82.

- [44] Marques D, Pessela BC, Betancor L, Monti R, Carrascosa AV, Rocha-Martin J, et al. Protein Hydrolysis by Immobilized and Stabilized Trypsin. *Biotechnology Progress*. 2011;27(3):677-83.
- [45] McDonald CE, Chen LL. The Lowry Modification of the Folin Reagent for Determination of Proteinase Activity. *Analytical Biochemistry*. 1965;10:175-7.
- [46] Spadaro AC, Draghetta W, Del Lamma SN, Camargo AC, Greene LJ. A convenient manual trinitrobenzenesulfonic acid method for monitoring amino acids and peptides in chromatographic column effluents. *Analytical Biochemistry*. 1979;96(2):317-21.
- [47] Spellman D, McEvoy E, O'Cuinn G, FitzGerald RJ. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*. 2003;13(6):447-53.
- [48] Levenspiel O. *Chemical Reaction Engineering*. 3 ed. New York: John Wiley & Sons Inc.; 2000. 668 p.
- [49] Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. 2011;29(6):675-85.
- [50] Hu F, Ragauskas A. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *Bioenerg Research*. 2012;5(4):1043-66.
- [51] Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2009;48(8):3713-29.
- [52] Mood SH, Golfeshan AH, Tabatabaei M, Jouzani GS, Najafi GH, Gholami M, et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2013;27:77-93.
- [53] Zhang Y, Yang S, Wu JQ, Yuan TQ, Sun RC. Preparation and Characterization of Lignocellulosic Oil Sorbent by Hydrothermal Treatment of Populus Fiber. *Materials*. 2014;7(9):6733-47.
- [54] Sgriecia N, Hawley MC, Misra M. Characterization of natural fiber surfaces and natural fiber composites. *Composites Part A-Applied Science and Manufacturing*. 2008;39(10):1632-7.
- [55] Chambers JL, Stroud RM. Difference Fourier Refinement of the Structure of DIP-Trypsin at 1.5 Å with a Minicomputer Technique. *Acta Crystallographica Section B*. 1977;33:1824-37.
- [56] Blanco RM, Calvete JJ, Guisan JM. Immobilization-Stabilization of Enzymes - Variables That Control the Intensity of the Trypsin (Amine) Agarose (Aldehyde) Multipoint Attachment. *Enzyme and Microbial Technology*. 1989;11(6):353-9.
- [57] Pedroche J, Yust MM, Mateo C, Fernandez-Lafuente R, Girón-Calle J, Alaiz M, et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40:1160-6.
- [58] Santos JCS, Rueda N, Barbosa O, Millán-Linares M, Pedroche J, Yuste MM, et al. Bovine trypsin immobilization on agarose activated with divinylsulfone: Improved activity and stability via multipoint covalent attachment. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2015;117:38-44.
- [59] George J, Sreekala MS, Thomas S. A review on interface modification and characterization of natural fiber reinforced plastic composites. *Polymer Engineering & Science*. 2001;41(9):1471-85.
- [60] Cao L. Immobilized Enzymes. In: Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology*. 2. Waterloo: Elsevier; 2011. p. 461-76.
- [61] Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: an update. *J Chemistry & Biology*. 2013;6(4):185-205.

- [62] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40(6):1451-63.
- [63] Sashidhar RB, Capoor AK, Ramana D. Quantitation of Epsilon-Amino Group Using Amino-Acids as Reference-Standards by Trinitrobenzene Sulfonic-Acid - a Simple Spectrophotometric Method for the Estimation of Hapten to Carrier Protein Ratio. *Journal of Immunological Methods*. 1994;167(1-2):121-7.
- [64] Zhang C, Xing X-H. Enzyme Bioreactors. In: Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology*. 2. Waterloo: Elsevier; 2011. p. 319-29.
- [65] Ferreira IMPLVO, Pinho O, Mota MV, Tavares P, Pereira A, Goncalves MP, et al. Preparation of ingredients containing an ACE-inhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*. 2007;17(5):481-7.

7. ANEXO 1

1. Método

1.1. Determinação de K_m (constante de Michaelis e Mentem) e $V_{m\max}$ (velocidade máxima) aparentes da tripsina solúvel e derivados-tripsina estabilizados.

A atividade da enzima solúvel e dos diferentes derivados-tripsina estabilizados foram ensaiadas frente a diferentes concentrações do substrato BApNA (0,05 mM-12mM) em tampão carbonato/bicarbonato 100mM, pH 9,0. Os valores de K_m e $V_{m\max}$ da tripsina e dos derivados foram estimados após a elaboração do gráfico de Lineweaver-Burk.

2. Resultados

2.1. Determinação do K_m e $V_{m\max}$ aparentes.

Conforme apresentado na figura 1, a tripsina livre apresentou uma típica cinética Michaeliana.

Figura 1: Gráfico de Michaelis-Mentem da enzima tripsina solúvel comercial.

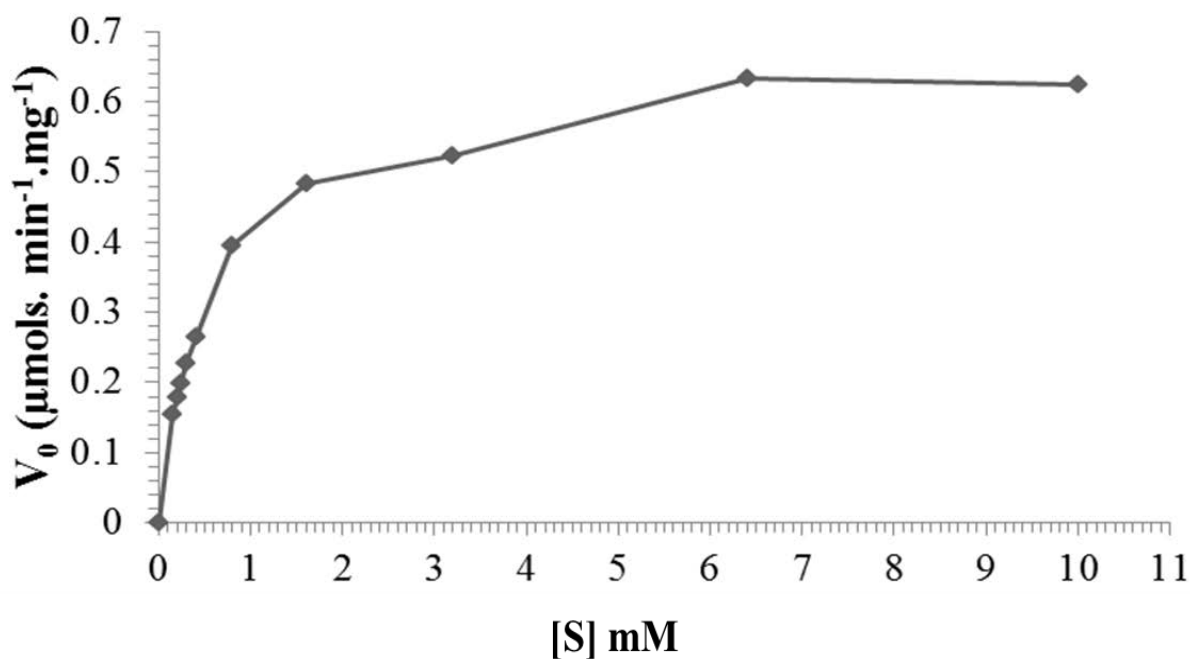


Figura 2: Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima tripsina solúvel. Gráfico de Lineweaver-Burk. O substrato utilizado foi o N_{α} -Benzoyl-DL-arginina- p -nitroanilida (BAPNA) pH 9,0 a 25°C.

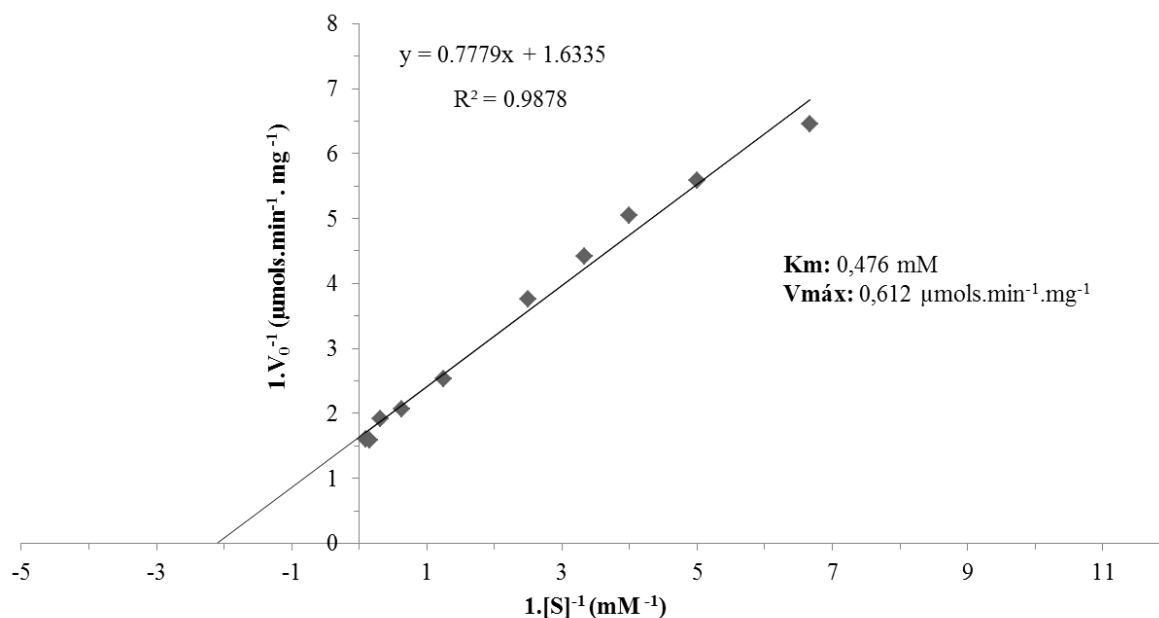


Figura 3: Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ do derivado AG-glioxil-tripsina. Gráfico de Lineweaver-Burk. O substrato utilizado foi o N_{α} -Benzoyl-DL-arginina- p -nitroanilida (BAPNA) pH 9,0 a 25°C.

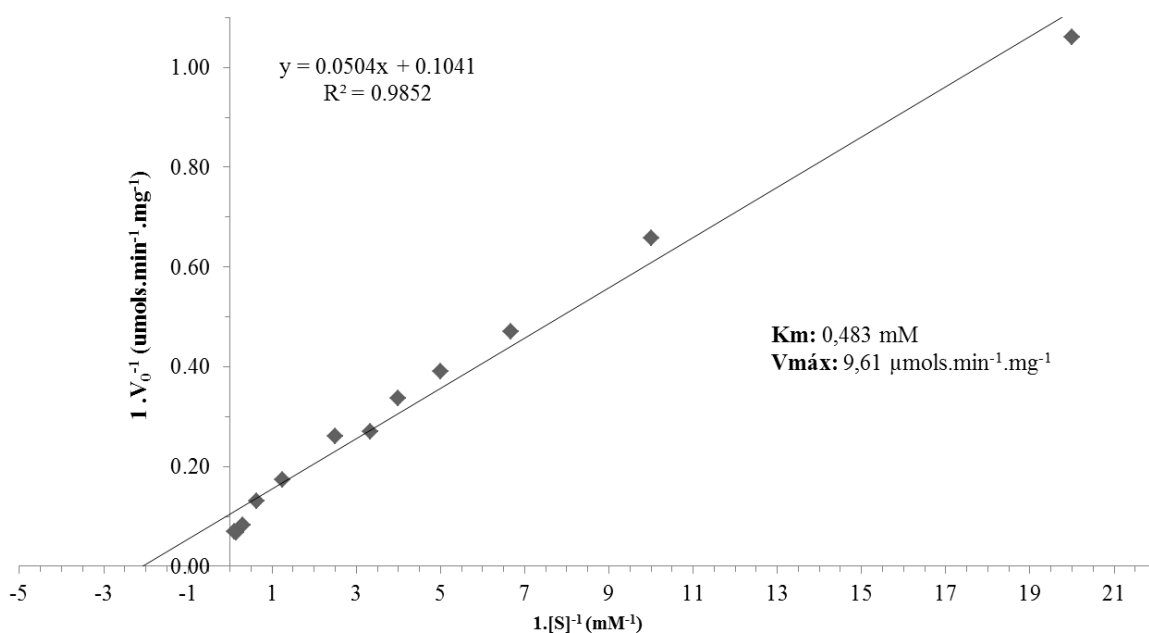


Figura 4: Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ do derivado SM-glioxil-tripsina. Gráfico de Lineweaver-Burk. O substrato utilizado foi o N_{α} -Benzoyl-DL-arginina- p -nitroanilida (BAPNA) pH 9,0 a 25°C.

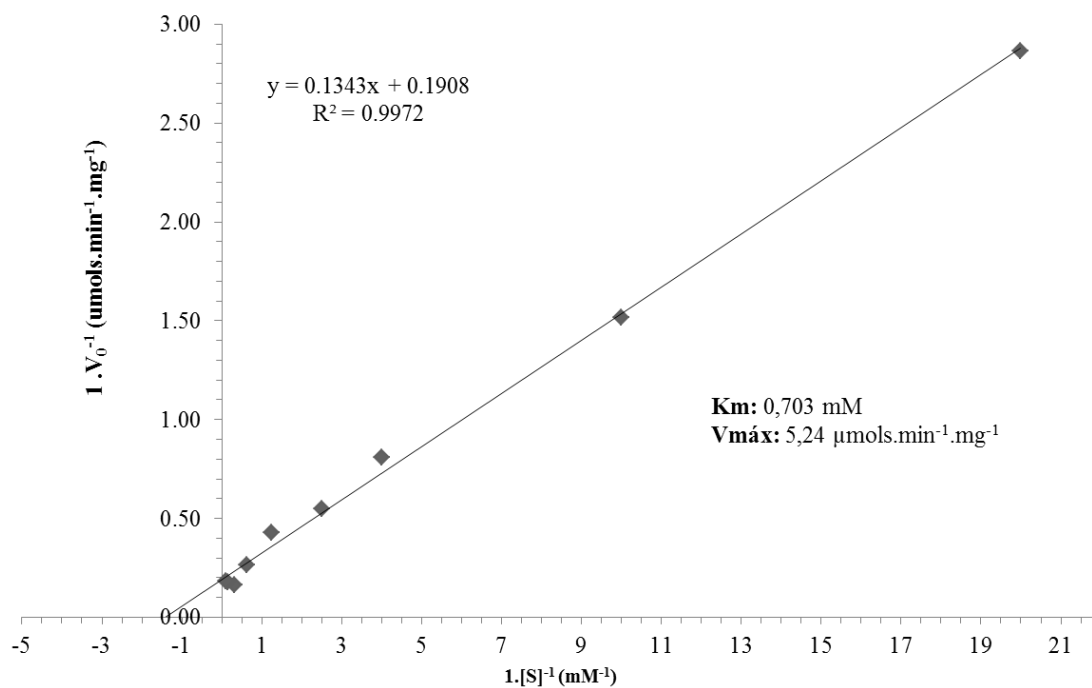


Figura 5: Determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ do derivado AG-IDA-glioxil-tripsina. Gráfico de Lineweaver-Burk. O substrato utilizado foi o N_{α} -Benzoyl-DL-arginina- p -nitroanilida (BAPNA) pH 9,0 a 25°C.

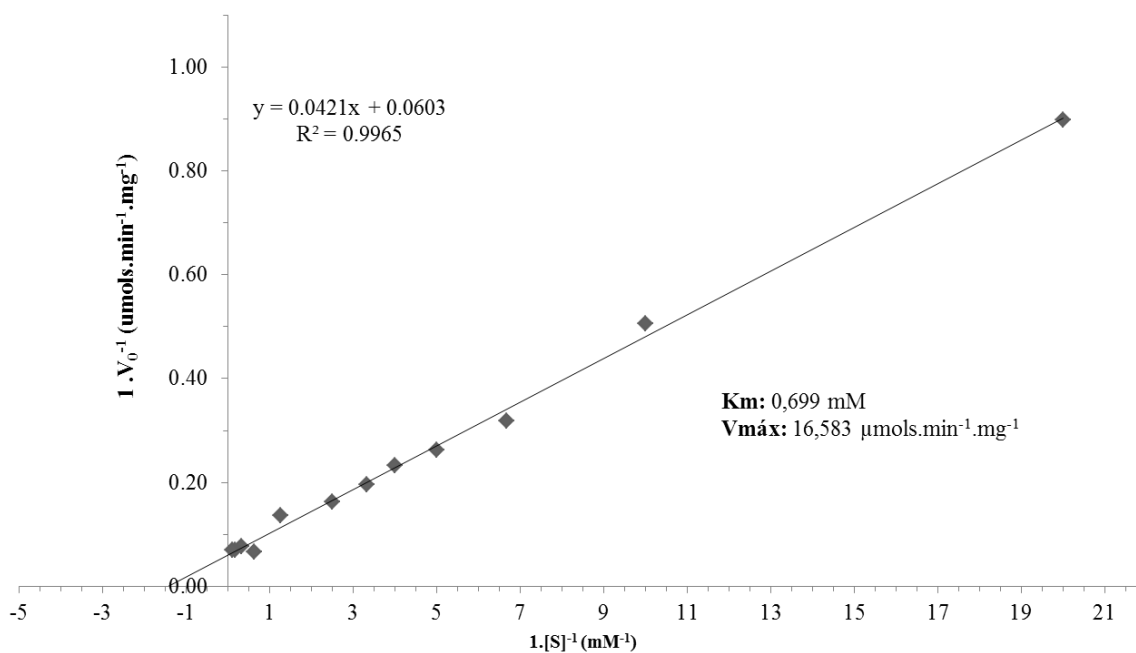


Figura 6: Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ do derivado SM-IDA-glioxil-tripsina. Gráfico de Lineweaver-Burk. O substrato utilizado foi o N_{α} -Benzoyl-DL-arginina- p -nitroanilida (BApNA) pH 9,0 a 25°C.

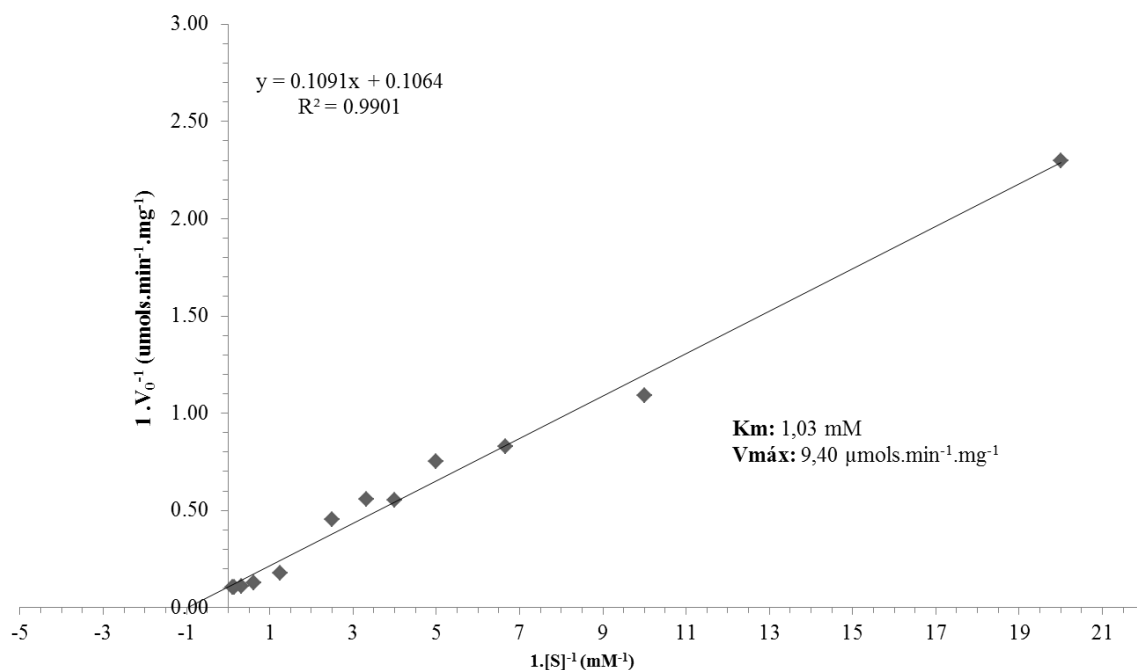


Tabela 1. Km e Vmáx da tripsina livre e dos diferentes derivados-tripsina estabilizados.

Tripsina	Km (mM)	Vmáx. ($\mu\text{mols.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)
E _(livre)	0,476	0,612
AG*-glioxil-tripsina	0,483	9,61
SM**-glioxil-tripsina	0,703	5,24
AG-IDA-glioxil-tripsina	0,699	16,58
SM-IDA-glioxil-tripsina	1,03	9,40

*AG: agarose; **SM: sabugo de milho.

A constante de Michaelis (K_m) é um parâmetro que mostra a afinidade da enzima pelo substrato. Os resultados obtidos (Tabela 1) mostram uma comparação entre os derivados estabilizados AG-tripsina e SM-tripsina. Os derivados AG-tripsina apresentaram valores de K_m inferiores aos obtidos para os derivados SM-tripsina o que significa uma maior afinidade pelo substrato. Para essa diferença de quase 2 vezes trabalhamos com a hipótese de que o suporte pó de sabugo de milho apresenta uma geometria e tamanho de poros distintas da agarose. Conforme resultado encontrado para porosidade, o pó de sabugo de milho apresentou um volume acessível de $1,53 \text{ mL.g}^{-1}$ (Figura 4, capítulo 1) para a dimensão da estrutura

terciária da tripsina, possibilitando que parte da carga de enzima oferecida para imobilização seja imobilizada no interior do poro. Se isso é uma verdade, a imobilização no interior do poro poderia ser uma barreira física para o efetivo contato da enzima com o substrato. Infelizmente não encontramos na literatura dados sobre a porosidade da agarose, mas os resultados sugerem que ou a agarose possui poros pequenos que impossibilitam a imobilização da tripsina em seu interior e dessa forma grande parte da enzima seria imobilizada na superfície do suporte, ou o poro possui dimensões superiores aos poros do sabugo de milho permitindo a imobilização e o livre acesso do substrato para seu interior do poro. Como as ativações para ambos suportes foram iguais, descartamos a hipótese de que a enzima possa estar sendo imobilizada por regiões diferentes de sua estrutura terciária, pois o tipo de ativação é capaz de direcionar a imobilização da enzima para a região onde estão os grupos reativos específicos para que haja a interação enzima-suporte de acordo com condições de reação pré-determinadas.

Entretanto, mesmo que os valores de K_m demonstrem uma menor acessibilidade pelo substrato atribuída aos derivados estabilizados SM-tripsina, esses derivados mostram ser capazes de hidrolisar as proteínas do soro de queijo bovino e bubalino com boa retenção de atividade e eficiência catalítica, após 5 ciclos de reuso. Além disso a imobilização multipontual covalente em pó de sabugo de milho foi capaz de conferir boa estabilidade térmica a enzima tripsina.

Capítulo 2

IMOBILIZAÇÃO DA PEPSINA EM PÓ DE SABUGO DE MILHO ATIVADO

RESUMO

O pó de sabugo de milho (SM) mostrou ser uma alternativa viável para imobilização da pepsina. A ativação do suporte alternativo foi conduzida de acordo com a metodologia utilizada para ativação da agarose (AG). Obtivemos para a agarose 97 $\mu\text{mols.g}^{-1}$ de grupos aldeídos reativos contra 150 $\mu\text{mols.g}^{-1}$ para o pó de sabugo de milho. Para ambos os suportes cerca de 70% da enzima oferecida ligou-se com apenas 1 hora de imobilização, com atividade recuperada de 67%. O pH de máxima atividade para os derivados AG e SM-glutaraldeído-pepsina foi 1,5, o mesmo encontrado para a enzima livre. Em relação a temperatura, resultados mostraram que os derivados apresentaram máxima atividade a 60°C, e para a enzima livre foi de 55°C. Com relação a estabilidade térmica a 45°C, os derivados AG e SM-glutaraldeído-pepsina apresentaram meia vida de 36 e 37 horas respectivamente, e 26 horas para a enzima livre, com fatores de estabilização de 1,38 e 1,42 vezes em relação a enzima livre. O derivado SM-glutaraldeído-pepsina mostrou ser efetivo na hidrólise dos soros de queijo bovino e bubalino em duas diferentes configurações de reatores: batelada e de leito empacotado, sendo o soro de queijo bovino mais susceptível à ação da pepsina imobilizada.

ABSTRACT

The corn cob powder (CCP) proved to be a viable alternative for immobilization of pepsin on agarose (AG). Activation of the alternative support was carried out according to methodology used for agarose. We obtained 97 $\mu\text{mols.g}^{-1}$ of reactive aldehyde groups for agarose and 150 $\mu\text{mols.g}^{-1}$ for the corn cob powder. About 70% of the enzyme offered for each support was immobilized after 1 hour of reaction, with expressed activity of 67%. Maximum activities of the derivatives AG and CCP-glutaraldehyde-pepsin were at pH 1.5 and at 60°C, while the free enzyme presented maximum activity at the same pH value but at 55°C. With respect to thermal stability at 45°C derivatives AG and CCP-glutaraldehyde-pepsin had half-life of 36 and 37 h respectively, and the free enzyme 26 h, with stabilizing factors of 1.38 and 1.42 times compared to the free enzyme. The derivative SM-glutaraldehyde-pepsin showed to be effective in the hydrolysis of bovine and buffalo cheese whey in two different configurations of reactors: batch and packed bed, but bovine cheese whey was more susceptible to the hydrolysis by the immobilized pepsin.

1. INTRODUÇÃO

As pepsinas são proteases pertencentes à família das aspártico proteases (EC 3.4.23) que desempenham importante função digestiva em vertebrados e invertebrados (Brier et al., 2007; Jin et al., 2008). Para os vertebrados a pepsina A (EC 3.4.23.1) é a principal enzima do suco gástrico e por ser essencial na digestão de alimentos é extensivamente estudada e sua estrutura terciária já foi determinada com alta resolução (Cao et al., 2011). Em virtude de sua função biológica, a pepsina A possui ampla especificidade relativa com “preferência” para clivar ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos aromáticos hidrofóbicos. Trata-se de uma enzima altamente estável e ativa em baixos valores de pH ($\text{pH} < 4,0$), mas ao ser exposta a ambientes neutros ou alcalinos, calor e agentes desnaturantes é rapidamente desnaturada e inativada (Cooper et al., 1990; Cardoso et al., 2009; Dee et al., 2009).

Um grande esforço tem sido realizado para tentar compreender os mecanismos que determinam a estabilidade conformacional e cinética de uma enzima (Dee et al., 2011), pois a manutenção de sua estrutura tridimensional nativa por certo período de tempo em condições ambientais específicas, são fundamentais para o sucesso da aplicação industrial desses biocatalisadores (Cardoso et al., 2009). A pepsina é uma importante enzima comercial que possui várias aplicações na indústria de alimentos com destaque para produção de queijos e derivados do leite, na indústria farmacêutica como auxiliar digestivo, na indústria de couros para remoção de residuais proteicos e em laboratórios para obtenção de hidrolisados (Meridor e Gedanken, 2014).

O uso de enzimas em processos alimentícios já está bem estabelecido, entretanto a busca por maneiras de aplicação mais eficazes e/ou diversificada com relação ao custo/benefício são um campo inesgotável de estudos. Atualmente o foco está em abordagens inovadoras capazes de gerar um novo *design* de biocatalisadores que sejam mais estáveis a variáveis ambientais como pH e temperatura, menos susceptível a agentes de inibição e que possam operar em sistemas contínuos. Avanços contínuos e substanciais foram conseguidos nos campos da biologia molecular, engenharia de proteínas e técnicas de imobilização de enzimas (Fernandes, 2010).

A imobilização de enzimas é vista como uma ferramenta chave na busca de alternativas para o aumento da aplicação industrial. Mesmo com toda pesquisa já desenvolvida nessa área, muito ainda deve ser feito, uma vez que não há regras e condições unânimes quanto à seleção de um bom suporte adequado ao processo e métodos de imobilização que devem associar

satisfatoriamente requisitos técnicos e econômicos atrativos e seguros dentro de quaisquer processos industriais em grande escala (Fernandes, 2010; Cao, 2011).

No que diz respeito à automação de processos, enzimas imobilizadas podem ser empregadas em uma variedade de configurações de reatores que possibilitem o uso de elevadas concentrações do biocatalisador permitindo operação contínua com considerável economia de enzimas, fácil recuperação e separação do produto em relação ao biocatalisador (Zhang e Hing, 2011; Cao, 2011).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi imobilizar covalentemente a enzima pepsina em suporte alternativo de baixo custo, pó de sabugo de milho, para obtenção de hidrolisados a partir do soro de queijo bovino e bubalino usando reator de leito empacotado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Pepsina (Sigma Aldrich®), agarose CL-6B (GE Healthcare), pó de sabugo de milho gentilmente doado pela SAGRAN (Indústria e Comércio de Ingredientes para ração Ltda.), Salto Grande/SP, soro de queijo bovino e bubalino produzido em laboratório. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico

2.2. Métodos

2.2.1. Imobilização

2.2.1.1. Suportes

Foram utilizados os suportes agarose CL-6B (Cross linked 6 Beads) e pó de sabugo de milho.

2.2.1.2. Ativação da agarose (AG) e pó de sabugo de milho (SM)

- **Ativação:** as matrizes poliméricas foram ativadas a gliceril por meio da eterificação com glicidol (2,3-epoxi-propanol) em meio alcalino na presença de NaBH₄ (borohidreto de sódio) seguindo metodologia descrita por Guisán (1988) com adaptações.

- Descrição mais detalhada do procedimento

a) Para ativação da agarose: 105g do suporte foi misturado a 30mL de água destilada e 50mL de NaOH 1,7 mol.L⁻¹ previamente gelada. Em agitação suave a essa suspensão foram adicionadas 3,4g de NaBH₄. Após completa dissolução do NaBH₄ adicionou-se vagarosamente

b) Para ativação do pó de sabugo de milho: foi realizado procedimento idêntico ao empregado para a ativação da agarose.

Os suportes ativados com grupos gliceril foram oxidados com uma solução de periodato de sódio (NaIO_4) 100mM sob agitação suave por 90 minutos, quando ocorre a ruptura do grupo gliceril, formando grupos glioxil (Figura 1). O gel foi então lavado abundantemente com água destilada e filtrado a vácuo. A reação de oxidação com periodato é estequiométrica, podendo-se controlar o grau de ativação (Guisán, 1988). Para cada 1g de suporte foram adicionados 10 mL de uma solução contendo 2 mL de NaIO_4 100mM e 8mL de água destilada.

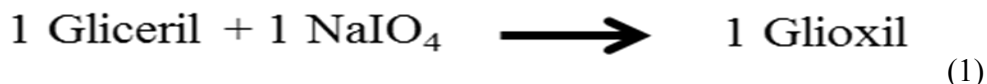
Matriz **Gliceril** **Suporte glicoxil**

The diagram illustrates the chemical synthesis of a glyoxyl support from a matrix and glycerol. It is divided into three stages:

- Matriz:** A vertical black bar representing the matrix with four horizontal lines, each ending in a hydroxyl group (-OH).
- Gliceril:** A vertical black bar representing glycerol with four horizontal lines, each ending in a hydroxyl group (-OH). Above each line is a glycidyl ether group: $\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-OH}$. A reaction arrow points from the matrix to this stage, with an epoxide ring and NaOH written above and below the arrow, respectively.
- Suporte glicoxil:** A vertical black bar representing the glyoxyl support with four horizontal lines, each ending in a glyoxyl group: $\text{OCH}_2\text{C}(\text{H})=\text{O}$. A reaction arrow points from the glycerol stage to this stage, with IO_4^- written above the arrow.

60

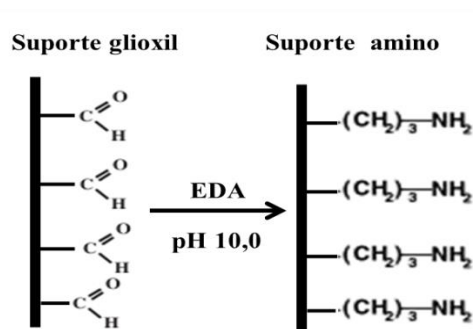
processo de oxidação é possível determinar a quantidade de grupos glioxil formados. A equação (1) ilustra a reação:



2.2.1.4. *Preparo do suporte agarose-monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE-agarose) e SM-monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE-SM).*

Os suportes glioxil anteriormente descritos sofreram reação com etilenodiamina (EDA) 2 mol. L⁻¹, em pH 10,0 por duas horas, sob agitação suave. Em seguida, adicionou-se NaBH₄, mantendo por mais duas horas em agitação suave (Figura 2). Ao final do período, os suportes foram lavados abundantemente com tampão acetato de sódio 200 mmol. L⁻¹ pH 4,0 seguido de tampão borato de sódio 100 mmol. L⁻¹ e, finalmente, com água destilada também em abundância (Fernández-Lafuente et al., 1993). Nestas condições, a conversão de grupos glioxil em grupos amino atinge 100%, conforme descrito por Guisán et al. (1997) e Fernández-Lafuente et al. (1999). **Obs:** a ativação à grupos amino foi realizada exclusivamente para a obtenção do suporte glutaraldeído.

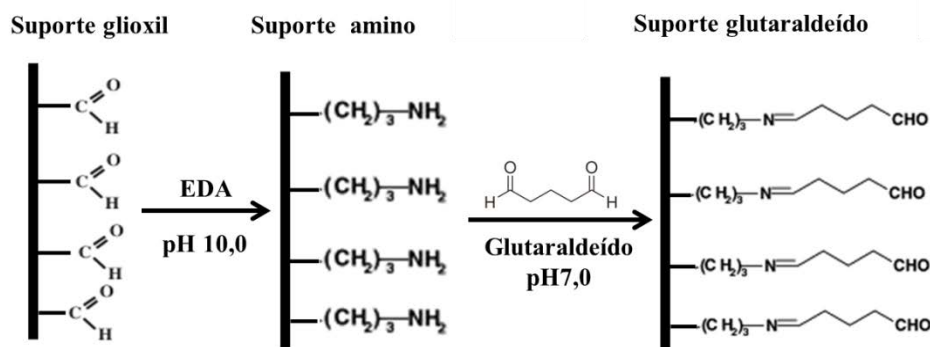
Figura 2: Esquema simplificado ilustrando o processo de ativação do suporte monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE ou amino) contendo aminos primários.



2.2.1.5. *Preparo do suporte agarose-glutaraldeído e SM-glutaraldeído*

Os suportes MANAE ou amino, sofreram reação com glutaraldeído. Primeiramente adicionou-se aos suportes amino tampão fosfato de sódio 200 mmol.L⁻¹, pH 7,0. A esta suspensão adicionou-se lentamente glutaraldeído a 25% (v/v) até uma concentração final de 1,59 mol.L⁻¹, ajustando-se o pH para 7,0 se necessário (Figura 3). Esta suspensão foi mantida em agitação suave por 14 horas. Os suportes foram lavados abundantemente com água destilada e filtrados a vácuo. A imobilização em suporte glutaraldeído deve ser realizada logo após a sua ativação (Betancor et al. 2006)

Figura 3: Esquema simplificado ilustrando o processo de ativação do suporte glutaraldeído.



2.2.2. Determinação da atividade enzimática da pepsina.

A pepsina é uma endopeptidase presente no suco gástrico que cliva preferencialmente a ligação entre resíduos hidrofóbicos aromáticos (Phe, Trp e Tyr). A atividade proteolítica da pepsina foi determinada através de metodologia descrita por Bisswanger (2004) pela hidrólise de uma solução 2% de hemoglobina bovina desnaturada com HCl 0,3M, onde uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de tirosina por minuto a 37°C. A hemoglobina desnaturada 2% foi obtida pela dissolução de 2,5g de hemoglobina bovina em 100 mL de água MiliQ com auxílio de pérolas vidro e agitador de soluções por cerca de 10 minutos. Em seguida a solução foi filtrada em papel de filtro e a 80 mL da solução de hemoglobina foram adicionados 20 mL de HCl 0,3M. A reação foi conduzida de acordo com a tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Procedimento para determinação da atividade proteolítica da pepsina

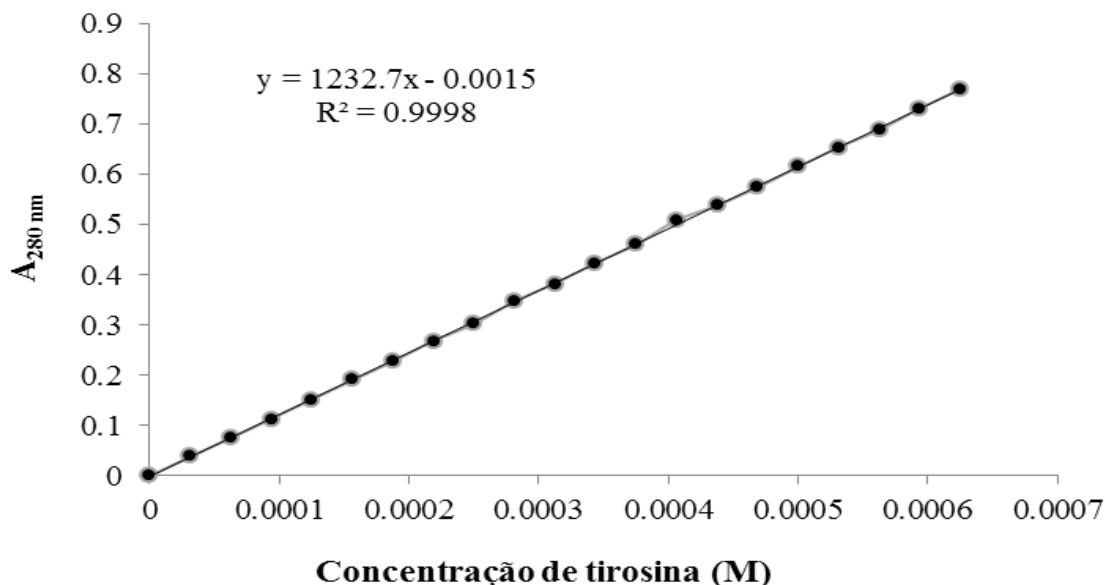
Reagentes	Amostra	Branco
Solução hemoglobina 2% incubada a 37°C	0,3mL	0,3mL
Ácido tricloroacético 0,3M (37°C)	----	0,6mL
Pepsina 0,8mg/mL em HCl 0,01M	0,1mL	0,1mL
10 minutos de incubação a 37°C		
Ácido tricloroacético 0,3M (5minutos, 37°C)	0,6mL	----

Fonte: Bisswanger, 2004

Após os 10 minutos de incubação a reação foi interrompida com a adição de TCA 0,3M. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro acoplado a funil de vidro sinterizado. A atividade da pepsina foi estimada no sobrenadante através da leitura em $\lambda=280nm$. O coeficiente de extinção molar foi

determinado através de uma curva analítica (Figura 4) utilizando como padrão a tirosina. O coeficiente de extinção molar obtido foi de $1237,7 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Neste estudo foi utilizada a pepsina comercial (Sigma-Aldrich®) e o substrato utilizado foi hemoglobina bovina (Sigma-Aldrich®).

Figura 4. Curva analítica de tirosina para determinação da atividade enzimática da enzima pepsina.



2.2.3. Preparo dos derivados (enzima ligada ao suporte)

2.2.3.1. Imobilização da pepsina em agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina.

A imobilização da enzima pepsina nos diferentes suportes foi efetuada através da mistura da enzima (8mg/g de suporte) e do suporte ativado em uma solução tampão com pH adequado para que ocorra a interação entre os grupos reativos da enzima com os grupos reativos do suporte.

O rendimento do processo de imobilização foi definido como a relação entre as atividades do sobrenadante e na fração de enzima solúvel (branco), de acordo com a equação (2):

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (2)$$

Onde: **A** é a atividade enzimática da solução utilizada para imobilização (controle) que se encontrava em uma concentração de 0,8mg de enzima para cada 1mL de solução e **B** é a atividade encontrada no sobrenadante, ou seja, a fração de enzima que não se ligou ao suporte.

Além do rendimento de imobilização também foi calculada a atividade recuperada que é a razão entre atividade enzimática encontrada da suspensão no final do processo de imobilização e a atividade inicial da carga de enzima oferecida (controle). O cálculo foi realizado de acordo com a equação (3):

$$\text{Atividade recuperada (\%)} = \frac{C}{A} \times 100 \quad (3)$$

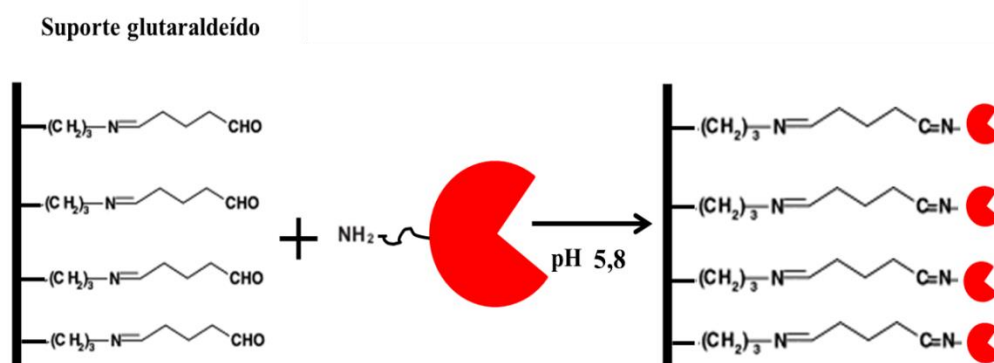
Onde: **A** é a atividade enzimática da solução utilizada para imobilização (controle), e **C** a atividade da suspensão obtida após a imobilização.

2.2.3.2. Derivado agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina

Para obtenção dos derivados agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina seguimos a metodologia descrita por Kurimoto et al. (2001).

Os suportes agarose-glutaraldeído e SM-glutaraldeído foram lavados abundantemente com HCl 1mM seguido pelo tampão de imobilização (Tampão acetato de sódio 0,1M pH5,8 contendo 0,5M de NaCl) e filtrados em funil de vidro sinterizado. Para a imobilização a enzima pepsina foi dissolvida em um pequeno volume de HCl 1mM e adicionada à suspensão (suportes ativados + tampão de imobilização). A pepsina estava em concentração de 0,8 mg de proteína/mL de suspensão (para cada grama de suporte foram adicionados 10 mL de tampão de imobilização). A mistura foi mantida em suave agitação por 24 horas a 4°C (Figura 5). Transcorrido o tempo de imobilização os derivados foram filtrados e lavados com tampão de imobilização para remoção de moléculas de pepsina que não se ligaram ao suporte. Os grupos reativos remanescentes do suporte foram bloqueados pela reação com glicina 0,2M pH 5,0 a 4°C por 24 horas. O filtrado foi novamente lavado com tampão de imobilização e armazenado a 4°C até o momento das análises.

Figura 5: Ilustração da imobilização covalente unipontual de enzimas em suporte glutaraldeído. A imobilização ocorre através do amino terminal da enzima.



Fonte: Próprio autor

2.2.4. Caracterização físico-cinética da pepsina livre e imobilizada nos diferentes suportes ativados com glutaraldeído.

2.2.4.1. Determinação de pH de máxima atividade

A determinação do pH ótimo da enzima solúvel (0,8mg/mL) e dos diferentes derivados (10 mg) foi realizada em diferentes valores de pH variando de pH 1,0 a pH 5,0. Para os distintos valores de pH foram utilizados soluções de HCl (pH 1,0, 1,5) e tampão McIlvaine 100mM (pH: 2,0, 2,5, 3,0, 4,0; 5,0). Os procedimentos foram realizados a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e a determinação da atividade foi realizada conforme **item 2.2.2.**, onde para a enzima livre foram utilizados 0,1 mL de uma solução 0,8 mg/mL e para a imobilizada, 10 mg derivado. A concentração dos demais reagentes, tempo e temperatura de reação foram mantidos.

2.2.4.2. Determinação da temperatura de máxima atividade

A determinação da temperatura ótima da enzima solúvel (0,8mg/mL) e dos diferentes derivados (10 mg) foram realizadas no intervalo de 25 a 70°C . A reação foi conduzida no pH ótimo obtido no item anterior. A atividade enzimática para a enzima solúvel foi realizada como descrito no **item 2.2.2.**

2.2.4.3. Determinação da estabilidade ao pH da enzima pepsina solúvel

A estabilidade ao pH foi realizada com o objetivo de se verificar a estabilidade da enzima livre (0,8mg/mL) frente a diferentes valores de pH. O interesse maior foi determinar se a enzima solúvel suportaria uma exposição ao pH de imobilização por pelo menos 2 horas de incubação, período em que as interações entre enzima e suporte normalmente já aconteceram. Para o ensaio de estabilidade ao pH, a enzima pepsina solúvel foi incubada em

diferentes valores de pH (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0) a 25°C por até 24 horas. Foram determinadas atividades em diferentes intervalos de tempo (0,1,2,3,5,8 e 24). As atividades foram medidas no pH de máxima atividade (pH 1,5 a 37°C).

2.2.4.4. Ensaio de estabilidade térmica da enzima pepsina solúvel e dos diferentes derivados.

A estabilidade térmica da enzima livre (0,8mg/mL) e dos diferentes derivados (10 mg) foi determinada a temperatura de 45°C por até 48 horas. A enzima solúvel e os derivados foram incubados em HCl 0,3M (pH 1,5) e as atividades foram determinadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 5, 8, 24, 30 e 48 horas. Para a enzima solúvel ainda foram realizados ensaios de estabilidade térmica nas temperaturas de 25, 35, 55, 60, 70°C, por até 3 horas.

2.2.5. Obtenção do soro de queijo bovino e bubalino

Os soros de queijo bovino e bubalino foram obtidos a partir do leite integral pasteurizado com adição da enzima renina de *Aspergillus niger* (Estrela®). Para cada litro de leite foi utilizada a proporção de 0,6% v/v de renina e CaCl₂ (0,5 mol/L, 0,5%). A mistura foi mantida durante uma hora a 35°C. Decorrido o tempo de coagulação, os sólidos foram separados através de filtração simples em gaze (Custódio, 2005). O soro produzido foi dialisado por 24 horas em membrana celulósica Trip-Fort (Hoechst) em constante agitação contra água destilada a 8°C para a remoção de lactose. No intervalo de 24 h foram realizadas três trocas de água (McPhie, 1971). Após a diálise, foi adicionado ao soro, caulim, na proporção de 0,6 g/30 mL de soro para adsorção da gordura. O soro foi centrifugado a 4°C (7400 x g; 30 min.) para separação do caulim. O soro dialisado, desengordurado e centrifugado foi armazenado em frascos identificados, e congelados até o momento dos ensaios.

2.2.6. Dosagem de proteínas totais e lactose no soro de queijo bovino e bubalino deslactosado e desengordurado.

A dosagem de proteína foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) e a proteína soroalbumina bovina (BSA) foi utilizada para obtenção da curva analítica de proteínas (Figura 6). Para dosagem de lactose foi utilizado a determinação de açúcares redutores pelo método de Miller (1959) usando curva analítica de lactose (Figura 7).

Figura 6: Curva analítica de SBA para determinação de proteínas no soro de queijo segundo o método de Bradford (1976).

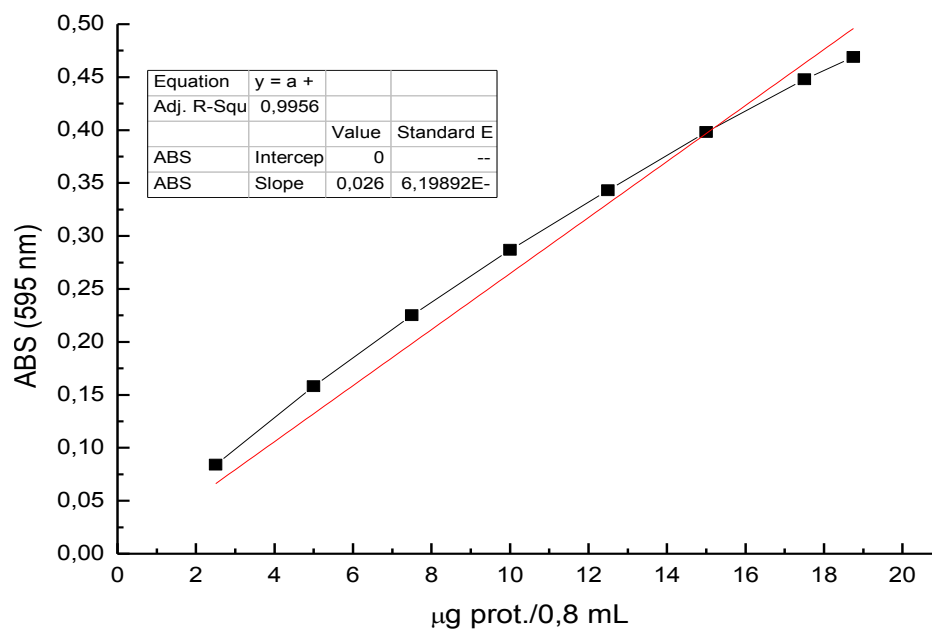
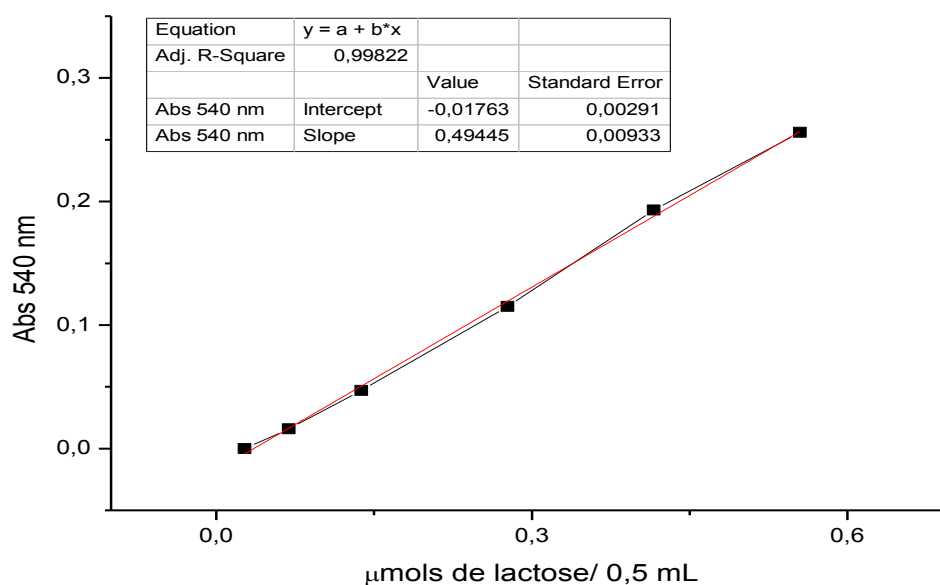


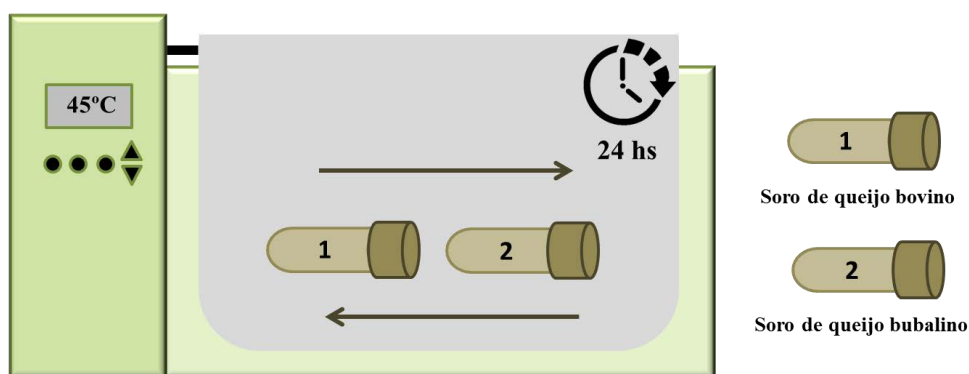
Figura 7: Curva analítica de lactose para determinação de açúcar redutor no soro de queijo segundo o método de Miller (1959).



2.2.7. Hidrólise do soro de queijo bovino e bubalino tratados com o derivado estabilizado e SM-glutaraldeído-pepsina em batelada.

Para a hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino e bubalino em reator de batelada 2,5g do derivado SM-glutaraldeído-pepsina foi homogeneizado em 5 mL de soro de queijo (pH 2,0). A hidrólise foi conduzida em banho-maria Dubnoff à 45°C/24 horas sob agitação (Figura 8).

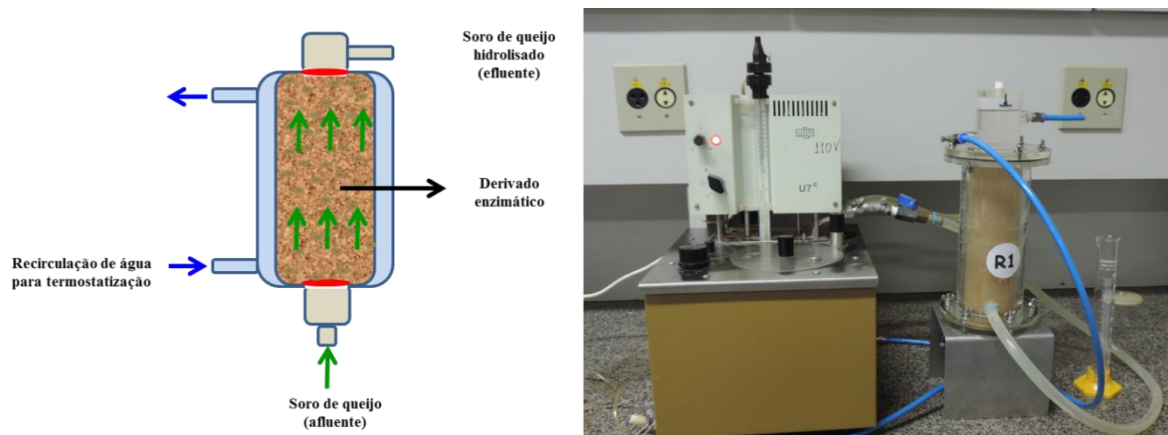
Figura 8: Esquema ilustrando o uso de reator em batelada para a hidrólise das proteínas do queijo bovino e bubalino utilizando o derivado enzimático SM-glutaraldeído-pepsina.



2.2.8. Hidrólise do soro de queijo bovino e bubalino tratados com o derivado SM-glutaraldeído-pepsina em reator de leito empacotado.

Para a hidrólise dos soros de queijo bovino e bubalino foi utilizado um reator de leito empacotado e encamisado de escala laboratorial com volume total de 0,5 L e volume útil de 0,25 L. A razão derivado enzimático/volume útil foi de 1:2. O fluxo do substrato através do leito foi ascendente, constante no sentido axial e longitudinal (fluxo pistão). A vazão foi de 10,1 mL/hora e o soro foi acidificado (pH 2,0) com HCl 0,1M. A hidrólise transcorreu a 45°C até a obtenção do volume de produto necessário para as análises necessárias (Figura 9).

Figura 9: Esquema ilustrando o uso de reator de leito fixo para a hidrólise das proteínas do queijo bovino e bubalino utilizando os derivados enzimáticos SM-glutaraldeído-pepsina.



2.2.9. Análise dos diferentes hidrolisados proteicos por SDS-PAGE

As proteínas do soro de queijo bovino e bubalino e seus hidrolisados foram caracterizadas por SDS-PAGE (12%) com base no método LaemmLi (1970), utilizando como padrão de massa molar o kit GE Lifesciences® composto por fosforilase B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). As condições de corrida foram de 200V e 20mA.

2.2.10. Análise dos diferentes hidrolisados proteicos por RP- HPLC.

A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), em escala analítica, foi efetuada em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi do tipo ultrapura. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ Nucleosil (250 x 4,6 mm), $\Phi = 5\mu\text{m}$, 300Å de porosidade, com gradiente linear de 5-95% (solvente A: água contendo 0,045% de TFA e solvente B: acetonitrila contendo 0,036% de TFA em 30 minutos), com fluxo de 1,0 mL/minuto e detecção em 220 nm.

3. RESULTADOS

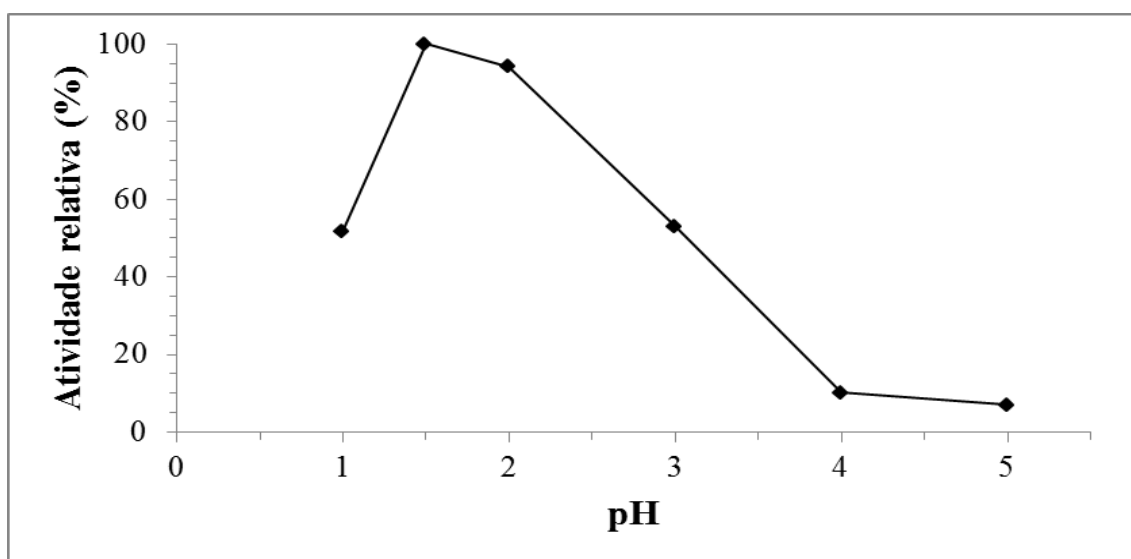
3.1. Caracterização cinética da enzima pepsina solúvel.

3.1.1. Determinação do pH de atividade máxima.

A máxima atividade da enzima pepsina solúvel utilizada nos experimentos foi em pH 1,5 (Figura 10). A pepsina é uma aspártico-protease que catalisa reações em condições altamente ácidas e é irreversivelmente desnaturada em condições neutras e alcalinas (Cardoso

et al., 2009; Dee et al., 2009). Isso se dá pelo fato de que a pepsina possui apenas quatro resíduos de aminoácidos carregados positivamente, ou seja, dois resíduos de arginina, um resíduo de lisina e um resíduo de histidina (Tanaka e Yada, 2001). Apresenta pH de máxima atividade entre 1,8 e 4,6 e essa variação está relacionada diretamente ao organismo produtor e também ao substrato que hidrolisa conforme [http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.1#pH OPTIMUM](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.1#pH%20OPTIMUM).

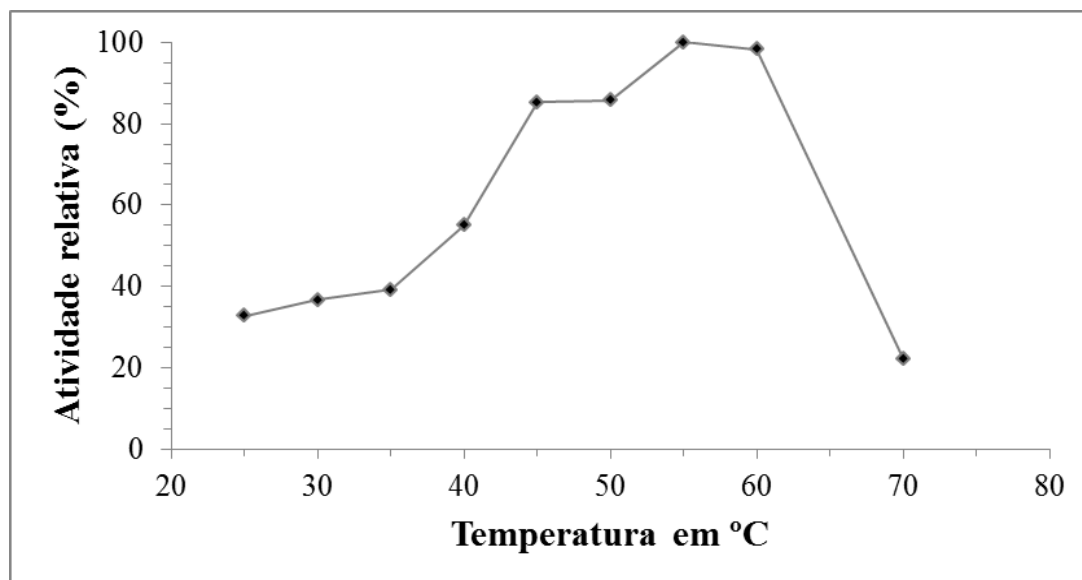
Figura 10: Efeito do pH na atividade da enzima pepsina solúvel.



3.1.2. Determinação da temperatura de máxima atividade.

A temperatura é conhecida por influenciar na velocidade das reações químicas, por isso é de se esperar que diferentes temperaturas sejam capazes de afetar a energia cinética (Elias et al., 2014) e a estereoquímica das reações catalisadas por enzimas (Phillips, 1996). Quando se trabalha com enzimas, uma das formas mais fáceis e simples de se controlar a taxa de reação é a temperatura, que tanto pode ser usada para se inativar a ação de uma enzima, como também para maximizar a conversão de um substrato em produto. A temperatura de máxima atividade encontrada neste estudo para a enzima pepsina solúvel foi de 55°C (Figura 11). Na literatura foi possível encontrar valores que variam de 35 a 50° C de acordo com [http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.1#TEMPERATURE OPTIMUM](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.1#TEMPERATURE%20OPTIMUM).

Figura 11. Efeito da temperatura na atividade da enzima pepsina solúvel

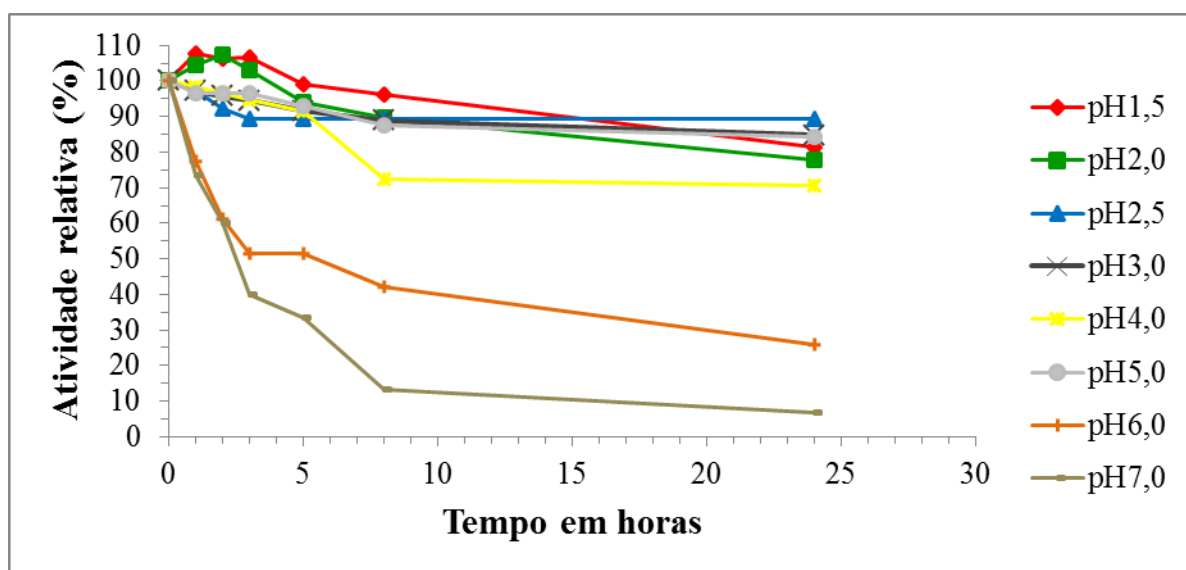


3.1.3. Determinação da estabilidade ao pH.

A estabilidade de uma enzima em um determinado pH é um parâmetro crucial quando se busca a aplicação de um biocatalisador. Assim como a temperatura, o pH de um meio reacional catalisado por uma enzima é fator determinante sobre a atividade enzimática, pois é capaz de controlar ou até mesmo interromper uma reação através da desnaturação da estrutura terciária das enzimas. No caso da pepsina ela é extremamente instável em valores de pH acima de 7,0 sendo irreversivelmente inativada quase que instantaneamente. Isso ocorre porque 12,5% dos 327 resíduos de aminoácidos que constituem a pepsina são ácidos (Asp+Glu) onde o aumento gradativo do pH faz com que haja a dissociação desses resíduos provocando uma repulsão que leva a desnaturação da enzima (Kubota et al., 2010). Em nosso estudo a enzima pepsina solúvel mostrou-se bastante estável em um intervalo de pH de 1,5 a 5,0 mantendo sua atividade catalítica acima de 70% por até 24 horas de incubação (Figura 12). Nos valores de pH 6,0 e 7,0 com apenas 3 horas de incubação houve uma redução da atividade em cerca de 50% e 60% respectivamente. Em processos de imobilização por ligação covalente uni ou multipontual a estabilidade ao pH é um fator crucial para a efetivação da interação suporte-enzima, uma vez que os valores de pH utilizados no processo são normalmente pH 7,0 (covalente unipontual) e pH 10,0 (covalente multipontual). No caso da pepsina que é bastante instável a ambos os valores de pH, tivemos que buscar informações na literatura e fazer adequações no processo de imobilização, para minimizar o efeito de pH mais elevados sobre a estrutura terciária e consequentemente sobre a atividade catalítica. Com esses resultados de estabilidade ao pH percebemos que não seria possível a imobilização por

ligação multipontual covalente que ocorre necessariamente em pH 10,0, onde a imobilização ocorre através dos grupos amino dos resíduos de lisina que encontram-se desprotonados e reativos. Como é de conhecimento, a pepsina apresenta poucos resíduos de lisina em sua superfície impossibilitando esse tipo de imobilização. A partir disso optamos pela imobilização unipontual em suporte ativado com o reagente bifuncional glutaraldeído onde podemos trabalhar com valores de pH igual ou abaixo de 7,0.

Figura 12. Estabilidade da pepsina solúvel em diferentes valores de pH.

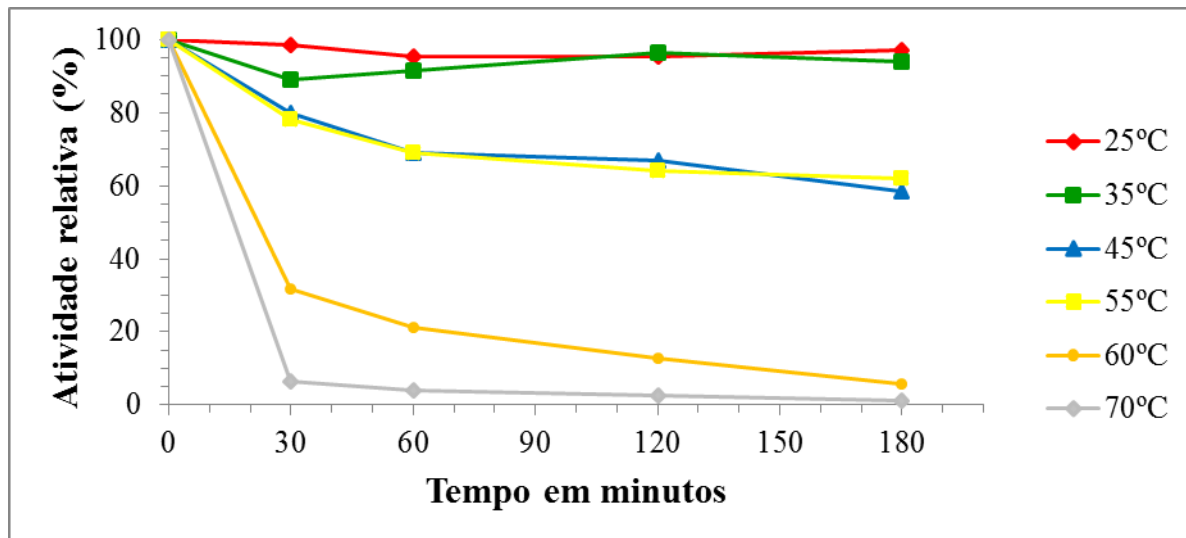


3.1.4. Determinação da estabilidade térmica.

A enzima mostrou uma boa estabilidade térmica por até 3 horas nas temperaturas de 25 e 35°C, mantendo sua atividade acima de 90% com relação à atividade inicial. Nas temperaturas de 45 e 55°C com 3 horas de incubação a enzima manteve cerca de 60% de sua atividade. Em temperaturas superiores a 55°C (60°C e 70°C) com apenas 30 minutos de incubação, a pepsina reduziu sua atividade drasticamente perdendo aproximadamente 70% e 94% de sua atividade inicial respectivamente (Figura 13). Na literatura encontramos resultados semelhantes, mostrando que acima de 55°C a enzima pepsina mostrou-se bastante instável, perdendo quase que totalmente sua capacidade catalítica (Altun e Cetinus, 2007; Poojari et al., 2009). A estabilidade da enzima em diferentes temperaturas é uma variável importante, pois são características cinéticas que influem na escolha de um biocatalisador para atuar em uma determinada reação ou processo com condições reacionais previamente determinadas. Além disso, quando o objetivo é a imobilização de uma enzima, este é um

parâmetro cinético importante para verificar o quanto à imobilização é capaz de manter ou modificar as características cinéticas em relação à enzima solúvel.

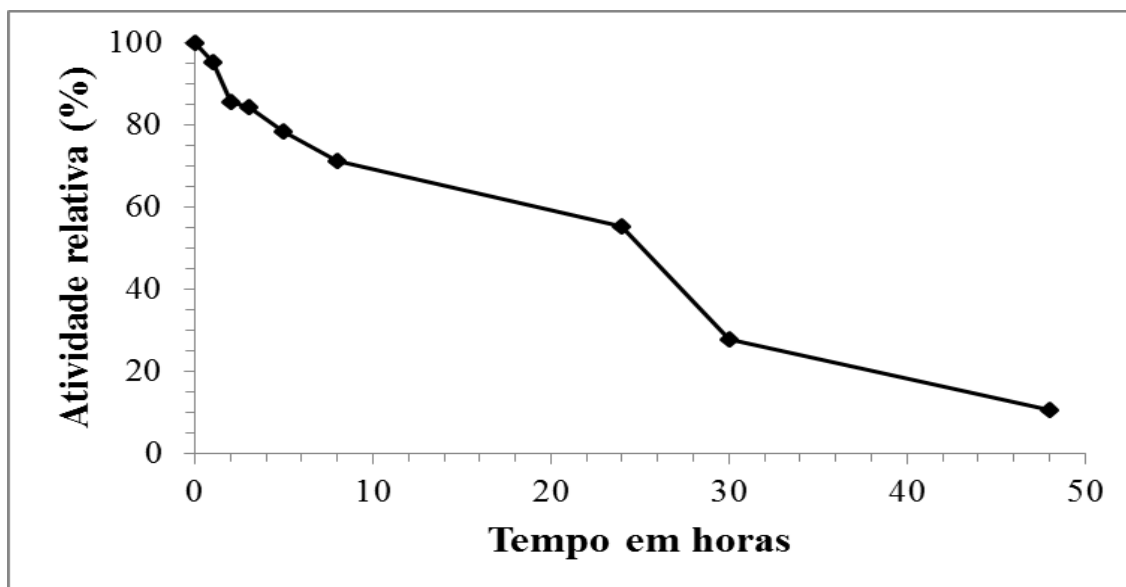
Figura 13. Estabilidade térmica da pepsina solúvel frente a diferentes temperaturas.



3.1.5. Inativação térmica da pepsina solúvel.

A inativação térmica foi realizada a temperatura de 45°C. Como pode ser verificado pela Figura 14 a pepsina manteve mais de 70% de sua atividade com 8 horas de incubação. Com 24 horas de incubação sua atividade foi de aproximadamente 50% com relação atividade inicial, mostrando ser uma enzima bastante estável nesta temperatura. A inativação térmica foi realizada em 45°C, pois é nessa temperatura que estamos realizando a hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino e bubalino com as proteases pepsina e tripsina imobilizadas. Essa temperatura foi escolhida, pois não influenciará a estrutura nativa das proteínas provocando uma possível agregação impossibilitando a hidrólise e também onde os derivados (enzima+suporte) apresentam uma boa atividade catalítica, próxima a sua atividade máxima.

Figura 14. Inativação térmica a 45°C da enzima pepsina solúvel.



3.2. Estudos de imobilização

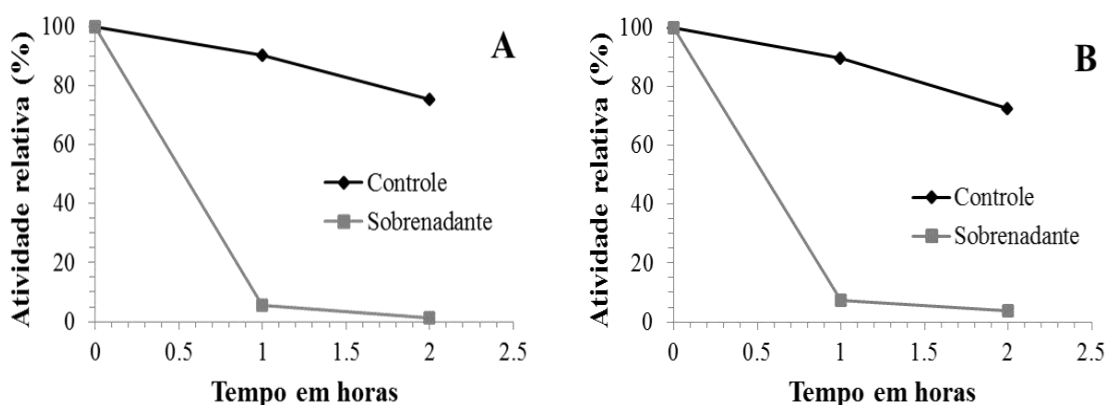
3.2.1. Trajetória de imobilização da pepsina em suporte agarose-glutaraldeído e SM-glutaraldeído.

A imobilização nos suportes agarose-glutaraldeído e SM-glutaraldeído da enzima pepsina ocorreu rapidamente. Após 2 horas de incubação tivemos um rendimento de imobilização de 98,4% e 95% para suportes citados respectivamente, com atividade recuperada de 88,24 % para o derivado agarose e 94% para o derivado pó de sabugo de milho. Ao final de duas horas a atividade da enzima livre (controle) manteve-se em aproximadamente 75% com relação à atividade inicial (Figura 15 A e B). Conforme já abordado, a pepsina é uma enzima ácida que é extremamente afetada por valores de pH acima de 6,0. Em nosso estudo a imobilização foi conduzida em pH 5,8 (Tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,8 contendo 0,5M de NaCl), nessas condições conseguimos minimizar o efeito do pH com relação a atividade enzimática. Segundo Kurimoto et al. (2001) o uso de um sal parece estabilizar o estado nativo da enzima enfraquecendo a repulsão eletrostática que ocorre entre os resíduos de Asp e Glu presentes em grande quantidade na estrutura terciária da pepsina, tornando seu estado nativo mais estável, mesmo em valores de pH acima de 5,5. A imobilização em suportes glutaraldeído de modo geral apresenta eficiência máxima quando o pH está entre 7,0 e 8,0, permitindo que a proteína seja imobilizada pelo grupo amino mais reativo e exposto nestas condições, ou seja, o grupo amino terminal (pKa 7-8). No estudo, em pH 5,8, a imobilização em glutaraldeído ocorreu em taxas acima de 50%, resultado

semelhante ao relatado por Mateo et al. 2005, que verificaram a porcentagem de imobilização em suporte glutaraldeído em diferentes valores de pH.

Contudo, a reação entre a carbonila livre e o amino terminal resulta na formação de uma Base de *Schiff* (iminas) muito instável as variações de pH e temperatura do microambiente, sendo importante a utilização de um agente redutor (glicina) para formação de uma amina secundária mais estável as variações que podem vir a ocorrer no ambiente de imobilização. Além disso, o agente redutor também neutraliza os grupos aldeídos remanescentes impossibilitando sua reação com outros grupos reativos presentes na superfície da enzima (Kurimoto et al., 2001). Os derivados pepsina-glutaraldeído-agarose e pepsina-glutaraldeído-SM apresentaram uma atividade final de 4,5 e 4,7 U.g⁻¹, respectivamente.

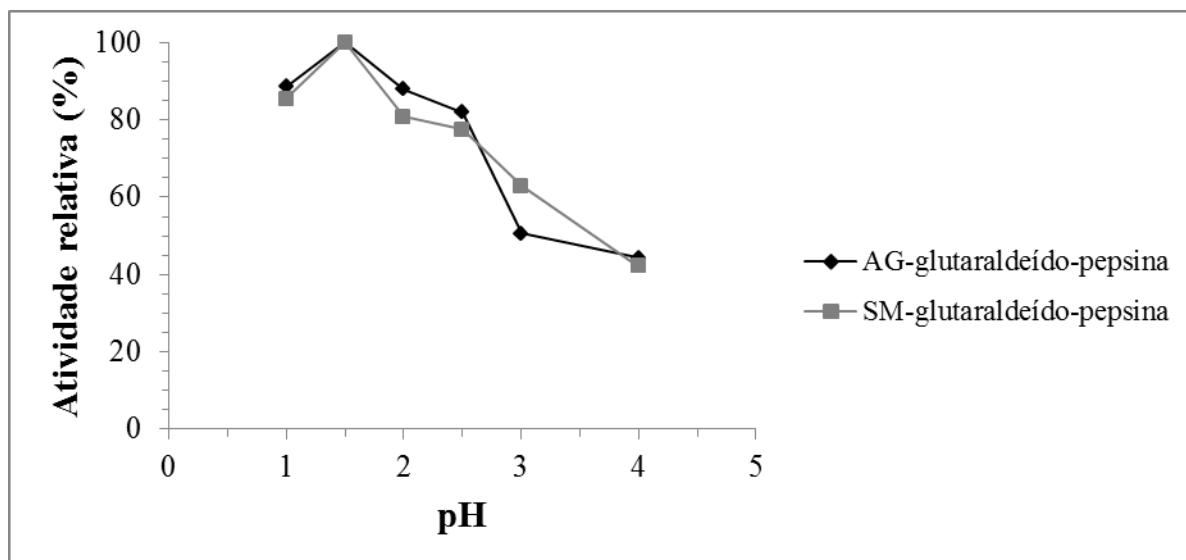
Figura 15. Curso de imobilização da enzima pepsina nos suportes glutaraldeído em pH 5,8. **A)** suporte agarose-glutaraldeído; **B)** suporte SM-glutaraldeído.



3.2.2. Determinação do pH de máxima atividade para os derivados agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina.

O pH de máxima atividade para ambos os derivados da pepsina foi de 1,5, igual o encontrado para a enzima solúvel. Na Figura 16 podemos observar que os derivados possuem uma faixa de pH de 1,0 a 2,5 onde a enzima apresenta uma boa atividade catalítica com atividades variando de 77, 54% a 88,56% com relação à enzima solúvel. Com relação à matriz de imobilização (agarose ou pó de sabugo de milho) ambos os derivados apresentam praticamente o mesmo perfil de atividade para os diferentes valores de pH testados.

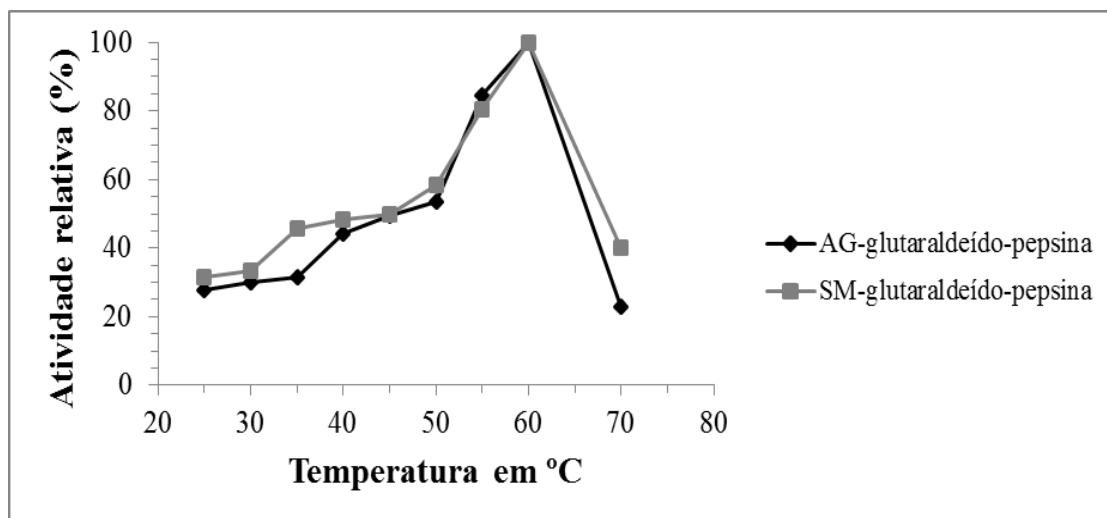
Figura 16. : Efeito do pH na atividade da enzima pepsina imobilizada em diferentes suportes ativados.



3.2.3. Determinação das temperaturas de máxima atividade dos derivados agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina

Na Figura 17 é possível observar que a imobilização nos diferentes suportes ativados causou uma alteração nas temperaturas ótimas dos derivados comparados com a enzima solúvel (55°C) fato já esperado, uma vez que a enzima se liga aos suportes de diferentes formas o que pode produzir diferentes configurações de sua estrutura tridimensional, além disso, o tipo e o número de ligações que ocorrem no processo de imobilização tem um efeito direto sobre as características cinéticas do derivado obtido. Para ambos os derivados a temperatura de máxima atividade foi de 60°C, porém os derivados possuem uma boa eficiência catalítica também a 55°C mantendo sua atividade em cerca de 80% com relação à atividade na condição de máxima atividade.

Figura 17: Efeito da temperatura na atividade da enzima pepsina imobilizada em diferentes suportes ativados.

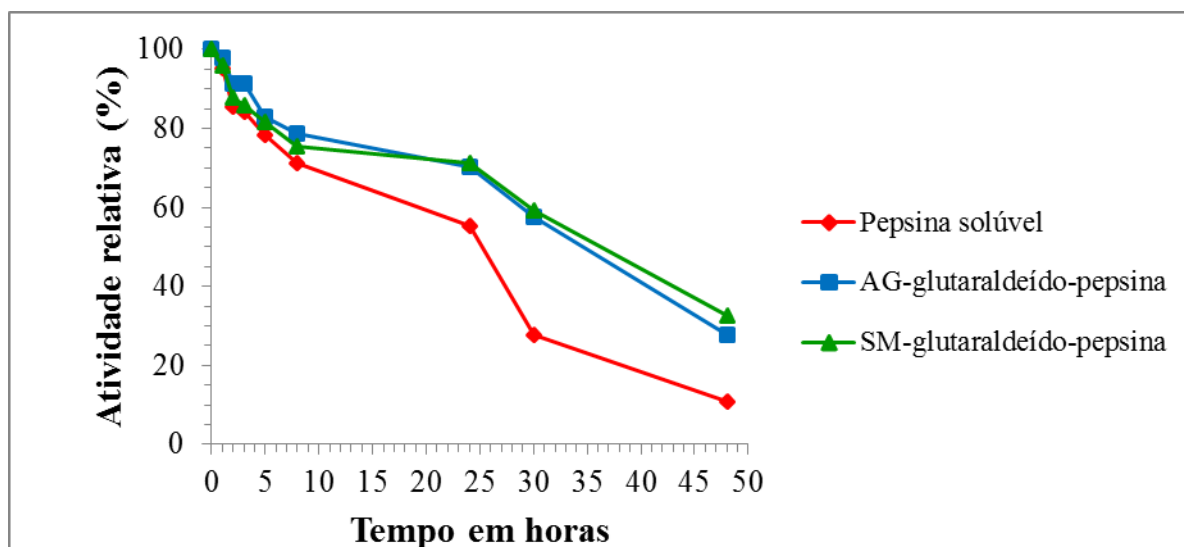


2.2.5. Estabilidade térmica dos derivados agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina comparado com a enzima solúvel.

O estudo do comportamento da enzima solúvel e dos derivados tendo como matriz polimérica a agarose e o pó de sabugo de milho frente à longa incubação em temperatura de 45°C e pH 2,0 está mostrado na Figura 18 onde é possível verificar que os diferentes derivados apresentam similar estabilidade com a enzima solúvel nas primeiras 8 horas de incubação, a partir desse ponto os derivados apresentaram uma maior estabilidade com relação à enzima solúvel. Com 24 horas de incubação a enzima solúvel reduziu sua atividade em cerca de 55% com relação à atividade inicial, já os derivados agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina reduziram cerca de 30% de sua atividade inicial. Quanto à meia vida, a enzima solúvel perdeu 50% da atividade inicial com cerca de 26 horas e os derivados agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina com cerca de 36 e 37 horas respectivamente.

A imobilização da pepsina nos suportes agarose-glutaraldeído e SM-glutaraldeído promoveu um aumento da estabilidade de 1,38 e 1,42 vezes respectivamente, em relação à enzima solúvel. Esse fator de estabilização foi calculado pela razão entre a meia vida dos derivados e a meia vida da enzima solúvel. A meia vida da enzima é definida como o momento em que a enzima apresenta apenas 50% de sua atividade inicial.

Figura 18. Estabilidade térmica dos derivados agarose-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina comparados à enzima solúvel. Os experimentos foram realizados a 45°C e em pH 2,0



Essa semelhança entre derivados estáveis obtidos com diferentes matrizes poliméricas é muito interessante, pois o pó de sabugo de milho em relação à agarose tem a grande vantagem de ser um suporte de baixo custo e de fácil derivatização, fatores que são levados em conta quando se objetiva a aplicação em larga escala de derivados enzimáticos.

2.3. Dosagem de proteínas e lactose no soro de queijo bovino e bubalino tratados.

Na Tabela 2 estão representados os resultados obtidos para concentração de proteínas e lactose para o soro de queijo bovino e bubalino.

Tabela 2: Dosagem de proteínas dos soros de queijo bovino e bubalino tratado (deslactosado e desengordurado).

Amostra	Proteínas (g/L)	Lactose (g/L)
Soro de queijo bovino tratado	7,2±0,13	1,42 ±0,09
Soro de queijo bovino (Romám et al., 2011).	5,4	-
Soro de queijo bubalino tratado	9,8±0,11	1,23±0,14
Soro de queijo bubalino (Lira et al., 2009).	11,9	-

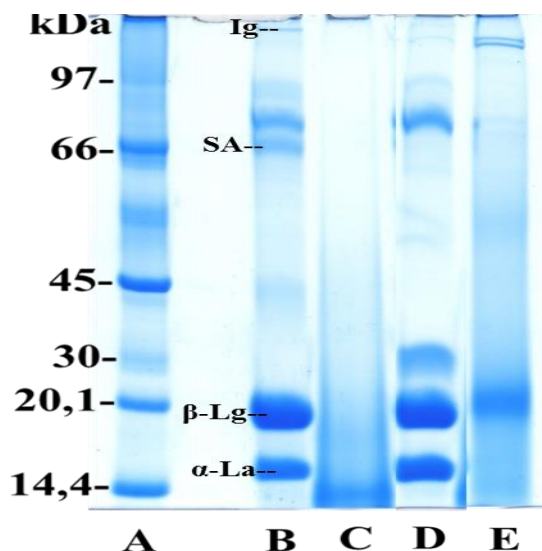
Observa-se pela Tabela 2 que a concentração de proteínas para o soro de queijo bovino preparado em nosso laboratório foi maior que a concentração encontrada em trabalho realizado por Romám et al. (2009). Já para o soro de queijo bubalino a concentração de

proteínas foi um pouco menor com relação ao encontrado por Lira et al. (2009). Cabe ressaltar que, além dos métodos analíticos e tratamentos utilizados, as diferenças de concentração destes compostos estão relacionadas a diferentes raças, fatores genéticos e ambientais conforme já descrito pela literatura.

2.4. Análise por SDS-PAGE dos hidrolisados do soro do queijo bovino e bubalino obtidos em reator de batelada e de leite empacotado com SM-glutaraldeído-pepsina

As Figuras 19 e 20 representam os zimogramas dos hidrolisados obtidos a partir das proteínas do soro de queijo bovino e bubalino em reator de batelada e de leite empacotado, respectivamente.

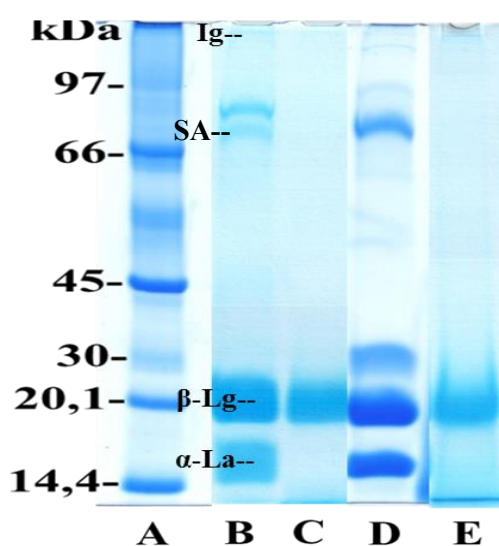
Figura 19: SDS-PAGE – 12% do soro de queijo bovino e bubalino antes e após hidrólise em reator de batelada com o derivado enzimático SM-glutaraldeído-pepsina. A coloração foi feita com Brilliant Blue G-coloidal (Sigma®). (A) Padrão de massa molecular (5 μ L); (B e D) soro de queijo bovino e bubalino não hidrolisado (20 μ L); (C e E) soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com o derivado SM-glutaraldeído-pepsina (20 μ L). A hidrólise foi conduzida a 45°C/24horas e o pH de hidrólise foi 2,0. Ig: imonoglobulina; SA: soro albumina; α -La: α -lactoalbumina; β -Lg: β -lactoglobulina.



Podemos verificar que a hidrólise das proteínas dos soros de queijo bovino e bubalino foi bastante efetiva no reator em batelada nas condições já descritas anteriormente. O perfil de hidrólise por SDS-PAGE, mostra que para o soro bovino a hidrólise foi mais efetiva, onde a α -lactoalbumina mostrou ser mais resistente à hidrólise, diferentemente do hidrolisado do soro

bubalino, onde podemos ver a presença de uma banda menos intensa referente à β -lactoglobulina. Ainda no soro bubalino temos bandas proteicas de massa molar $>97\text{kDa}$ que permaneceram após a hidrólise. Mesmo com essas pequenas diferenças interespecies, a hidrólise com o derivado estabilizado SM-glutaraldeído-pepsina (Figura 19; **C e E**) promoveu o desaparecimento da maioria das bandas proteicas quando comparamos com o soro de queijo não hidrolisado (Figura 19; **B e D**) levando-nos a crer que houve uma hidrólise bastante efetiva da maioria das proteínas do soro para ambas as espécies, mostrando que a enzima pepsina imobilizada em suporte alternativo pó de sabugo de milho pode ser boa alternativa para produção de hidrolisados proteicos, gerando economia quanto ao reuso do catalisador, fácil separação do produto, aproveitamento de um resíduo lignocelulósico abundante e de baixo custo para imobilização e utilização de um resíduo altamente poluidor da indústria de laticínios que pode gerar produtos de hidrólise de alto valor agregado como peptídeos bioativos.

Figura 20: SDS-PAGE – 12% do soro de queijo bovino e bubalino antes e após hidrólise em reator de leite empacotado com o derivado enzimático SM-glutaraldeído-pepsina. A coloração foi feita com Brilliant Blue G-coloidal (Sigma®). (**A**) Padrão de massa molecular (5 μL); (**B e D**) soros de queijo bovino e bubalino não hidrolisados (20 μL); (**C e E**) soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com o derivado SM-glutaraldeído-pepsina (20 μL). A hidrólise foi conduzida a 45°C/24horas e o pH de hidrólise foi 2,0. Ig: imonoglobulina; SA: soro albumina; α -La: α -lactoalbumina; β -Lg: β -lactoglobulina.



A Figura 20 mostra o perfil de hidrólise do soro de queijo bovino (**B**) e bubalino (**D**) obtido em reator de leite empacotado. Em ambos os casos verificamos que perfis de hidrólise

muito similares (Figura 20; **C e E**). A hidrólise com o derivado SM-glutaraldeído-pepsina promoveu a hidrólise das proteínas acima de 66 kDa (soroalbumina e imunoglobulinas) e também a hidrólise da α -lactoalbumina (14,2 kDa) sendo a β -lactoglobulina (18,4 kDa) a mais resistente à hidrólise, mesmo após 24 horas de reação para ambas as espécies. Assim como no reator de batelada, o derivado SM-glutaraldeído-pepsina também pode ser empregado em reator de leite empacotado e promover uma hidrólise bastante efetiva das proteínas do soro de queijo. Claro que trabalhamos com condições de hidrólise favoráveis a enzima em questão, futuramente nosso objetivo será variar condições de processo como tempo de detenção hidráulica, vazão, relação derivado enzimático/substrato, no intuito de se obter condições de processo com maior economia de tempo, energia e catalisador, para que tenhamos a máxima eficiência de processo, ou seja, o próximo passo será a padronização de processo e possivelmente aumento de escala. Enzimas imobilizadas e estabilizadas são muito atraentes quando se busca automação de processos, pois permitem utilizar diferentes *designs* de reatores que atendam as necessidades de cada processo.

2.5. Análise por RP-HPLC dos hidrolisados do soro de queijo bovino e bubalino obtidos em reator em batelada e de leite empacotado.

Os perfis cromatográficos qualitativos dos hidrolisados bovino e bubalino obtidos em reator de batelada e de leite empacotado utilizando o derivado SM-glutaraldeído-pepsina (Figuras 21 e 22; **C e D**) corroboram com os respectivos zimogramas (Figuras 19 e 20; **C e E**). Os perfis de hidrólise obtidos em reator de batelada mostram que o soro de queijo bovino foi mais susceptível a ação da enzima pepsina imobilizada (Figura 21; **C**) com a detecção de maior número de picos em relação ao hidrolisado do soro bubalino (Figura 21; **D**) e também com relação ao soro de queijo bovino não hidrolisado (Figura 21; **A**). Para o soro de queijo bubalino, a hidrólise foi menos efetiva, porém obtivemos um perfil diferente quando comparamos com o soro de queijo bubalino não hidrolisado (Figura 21; **B e D**), mostrando que houve ação enzimática.

Figura 21: Perfil cromatográfico qualitativo dos soros de queijo bovino e bubalino não hidrolisados (**A e B**) e hidrolisados (**C e D**) com SM-glutaraldeído-pepsina em reator de batelada (45°C/24 horas e pH 2,0).

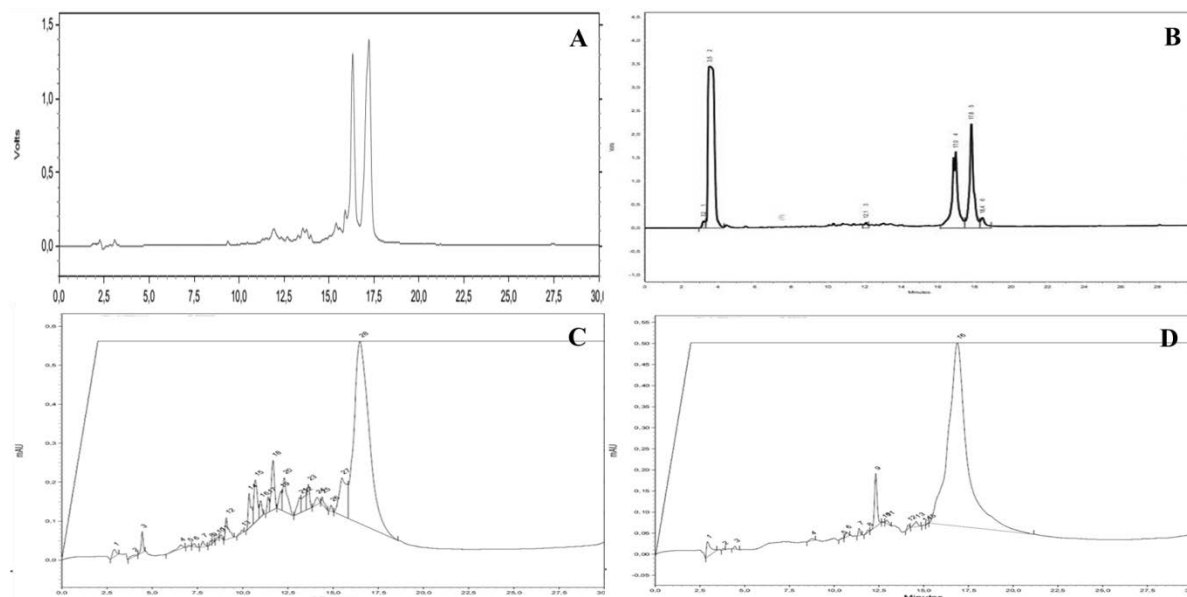
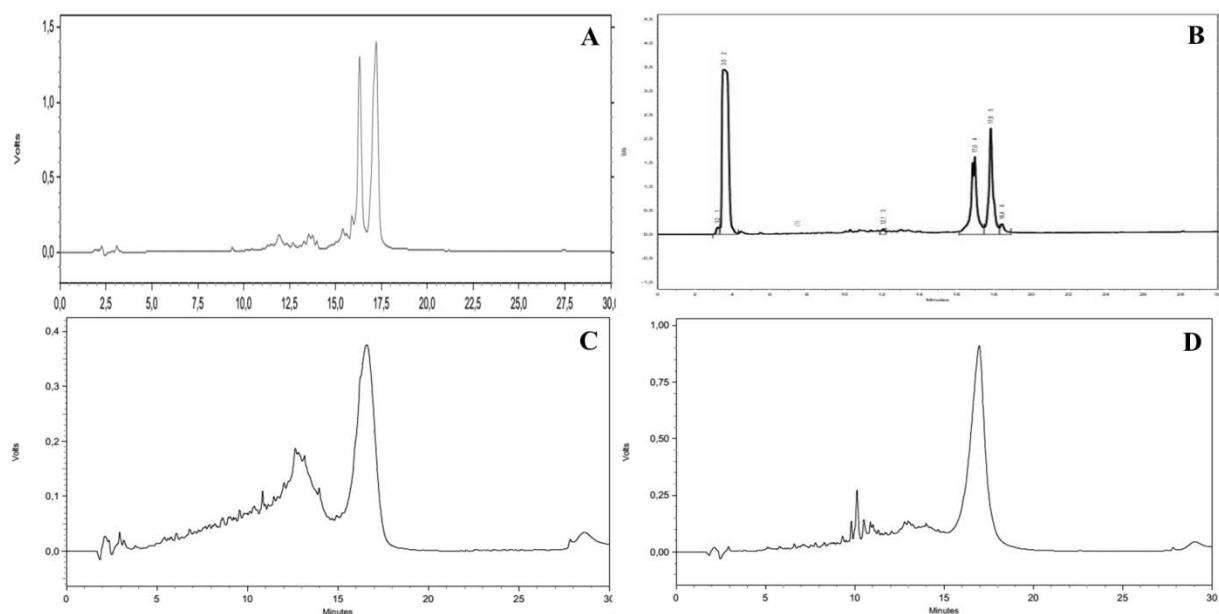


Figura 22: Perfil cromatográfico qualitativo dos soros de queijo bovino e bubalino não hidrolisados (**A e B**) e hidrolisados (**C e D**) com SM-glutaraldeído-pepsina em reator de leite empacotado (45°C/24 horas e pH 2,0).



Os perfis obtidos em reator de leite fixo mostram que a hidrólise ocorreu para ambas as espécies (Figura 22; **C e D**) comparado aos respectivos soros de queijo não hidrolisados (Figura 22; **A e B**). Ao compararmos os perfis qualitativos interespecíes (Figura 22; **C e D**) podemos inferir que a hidrólise em reator de leite empacotado foi um pouco mais efetiva para

o soro de queijo bovino (Figura 22; C) quando comparamos com o soro de queijo bubalino (Figura 22; D). Essas pequenas variações podem estar associadas a pequenas diferenças que podem existir na sequência de aminoácidos que compõem a estrutura terciária das principais proteínas do soro em ambas as espécies.

3. CONCLUSÃO

A enzima pepsina foi imobilizada com sucesso em pó de sabugo de milho ativado, entretanto, por se tratar de uma enzima ácida, tivemos bastantes dificuldades para encontrar um meio de imobilizá-la covalentemente, uma vez que a maioria das técnicas de imobilização que envolve ligação covalente são realizadas em valores de $\text{pH} \geq 7,0$, onde os grupos envolvidos apresentam-se mais reativos e a imobilização se dá com o máximo de rendimento e efetividade. Os resultados de imobilização obtidos para a agarose e pó de sabugo de milho foram muito semelhantes, mostrando que esse resíduo lignocelulósico abundante e de baixo custo apresenta grande potencial para imobilização de enzimas. O derivado SM-glutaraldeído-pepsina foi utilizado em duas diferentes configurações de reatores e aplicados na hidrólise do soro de queijo onde obtivemos hidrólise parcial das proteínas do soro bovino e bubalino com a liberação de peptídeos, que serão estudados quanto a possíveis propriedades bioativas. Os resultados até o momento foram satisfatórios, entretanto maiores estudos para automação e eficiência de processo são necessários para que esta tecnologia seja aplicada visando aumento de escala.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTUN G.D., CETINUS S. A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, v.100, p. 964–971, 2007.

BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Glutaraldehyde in Protein Immobilization. In: Guisan JM (Ed). **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2 ed. New Jersey: Human Press Inc.; 2006. p. 57-64.

BISSWANGER, H. **Practical Enzymology**. Wiley-VHC 1ªed., 2004, 255p.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRIER, S.; MARIA, G.; CARGINALE, V.; CAPASSO, A.; WU, Y.; TAYLOR, R.M.; BOROTTO, N.B.; CAPASSO, C.; ENGEN, J.R. Purification and characterization of pepsins

A1 and A2 from the Antarctic rock cod *Trematomus bernacchii*. **FEBS Journal**, v.274, p.6152–6166, 2007.

CAO, M.J.; CHEN, W.Q.; DU, C.H.; YOSHIDA, A.; LAN, W.G.; LIU, G.M.; SU, W.J. Pepsinogens and pepsins from Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.158, p.259–265, 2011.

CAO, L. Immobilized Enzymes. In: MOO-YOUNG, M. (Ed). **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Academic Press, 2011. v.2, chap.34, p.461-476.

CARDOSO, T.; OLIVEIRA, C.; SARMENTO, A.C.; PEREIRA, A.; NUTLEY, M.A.; JESS, T.; KELLY, S.M.; COOPER, A.; PRICE, N.C.; PIRES, E.; BARROS, M. Acetonitrile-induced unfolding of porcine pepsin A: A proposal for a critical role of hydration structures in conformational stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.45, p.213–220, 2009.

COOPER, J.B.; KHAN, G.; TAYLOR, G.; TICKLE, I.J.; BLUNDELL, T.L. X-ray Analyses of Aspartic Proteinases. II. Three-dimensional Structure of the Hexagonal Crystal Form of Porcine Pepsin at 2.3 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.214, p.199-222, 1990.

CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A.J.; MARQUES, D.P.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C; MONTI, R. Hydrolysis of cheese whey proteins with trypsin, Chymotrypsin and carboxypeptidase A. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.16, n.2, p.105-109, 2005.

DEE, D.R.; FILONOWICZ, S.; HORIMOTO, Y.; YADA, R.Y. Recombinant prosegment peptide acts as a folding catalyst and inhibitor of native pepsin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1794, p.1795–1801, 2009.

DEE, D.R.; MYERS, B.; YADA, R.Y. Dynamics of Thermodynamically Stable, Kinetically Trapped, and Inhibitor-Bound States of Pepsin. **Biophysical Journal**, v.101 p.1699–1709, 2011.

ELIAS, M.; WIECZOREK, G.; ROSENNE, S.; TAWFIK, D.S. The universality of enzymatic rate - temperature dependency. **Trends in Biochemical Sciences**, v.39, p.1-7, 2014.

FERNANDES, P. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. **Enzyme Research**, v.2010, p.1-19, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, J.M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p.546-50, 1993.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRÍGUEZ, V.; MATEO, C.; PENZOL, G.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA, F.; GUISÁN, J.M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-

immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.7, p.181-189, 1999.

GUISAN, J.M. Aldehyde-Agarose Gels as Activated Supports for Immobilization-Stabilization of Enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.375-382, 1988.

GUISÁN, J.M., BASTIDA, A.; BLANCO, R.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUNCEDA, E. Immobilization of enzymes on glyoxyl-agarose: strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment. In: Bickerstaff, G.F. **Immobilization of enzymes and cells**. 1st ed. New Jersey: Humana Press, 1997, p.289-298.

JIN, K.S.; RHO, Y.; KIM, J.; KIM, H.; KIM, I.J.; REE, M. Synchrotron Small-Angle X-ray Scattering Studies of the Structure of Porcine Pepsin under Various pH Conditions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 15821–15827, 2008.

KUBOTA, K.; METOKI, Y.; ATHAUDA, S.B.P.; SHIBATA, C.; TAKAHASHI, K. Stability profiles of nepenthesin in urea and guanidine hydrochloride: comparison with porcine pepsin A. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.74, p.2323-2326, 2010.

KURIMOTO, E.; HARADA, T.; AKIYAMA, A.; SAKAI, T.; KATO, K. *In Vitro* refolding of porcine pepsin immobilized on agarose beads. **Journal Biochemistry**, v.130, p.295-297, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LIRA, H. L.; SILVA, M.C.D.; VASCONCELOS, M.R.S.; LIRA, E.L.; LOPEZ, A.M.Q. Microfiltração do soro de queijo de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 33-37, 2009.

MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; GRAZU, V.; PESSELA, B.C.C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIEIRA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.456-462, 2005.

McPHIE, P. **Methods in Enzymology**, v.16, p. 23-32, 1971.

MERIDOR, D.; GEDANKEN, A. Enhanced activity of immobilized pepsin nanoparticles coated on solid substrates compared to free pepsin. **Enzyme and Microbial Technology**, v.67, p.67–76, 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

NEVELL, T.P. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. In: Whistler B, editor. 3. New York: Academic Press, p. 210-25, 1963.

PHILLIPS, R. S. Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: prospects for exploitation. **Trends in Biotechnology**, v.14, p.13-16, 1996.

POOJARI, Y.; PALSULE, A. S.; CLARSON, S. J.; GROSS, R. A. Immobilization and activity of pepsin in silicone elastomers. **Silicon**, v.1, p.37– 45, 2009.

ROMÁM, A.; WANG, J.; CSANÁDI, J.; HODÚR, C.; VATAI, G. Experimental investigation of the sweet whey concentration by nanofiltration. **Food Bioprocess Technology**, v.4, p. 702 – 709, 2011.

TANAKA T., YADA R.Y. N-terminal portion acts as na initiation of the inactivation of pepsina t neutral pH. **Protein Engineering**, v.14, p.669-674, 2001.

ZHANG, C.; HING, X.H. Enzyme Bioreactors. In: MOO-YOUNG, M. (Ed). **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Academic Press, 2011. v.2, chap. 23, p.319-329.

5. ANEXO 1

Reuso dos derivados AG-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina: determinação do grau de hidrólise e atividade relativa após 5 ciclos de reuso.

1. Método

1.1. Reuso (grau de hidrólise)

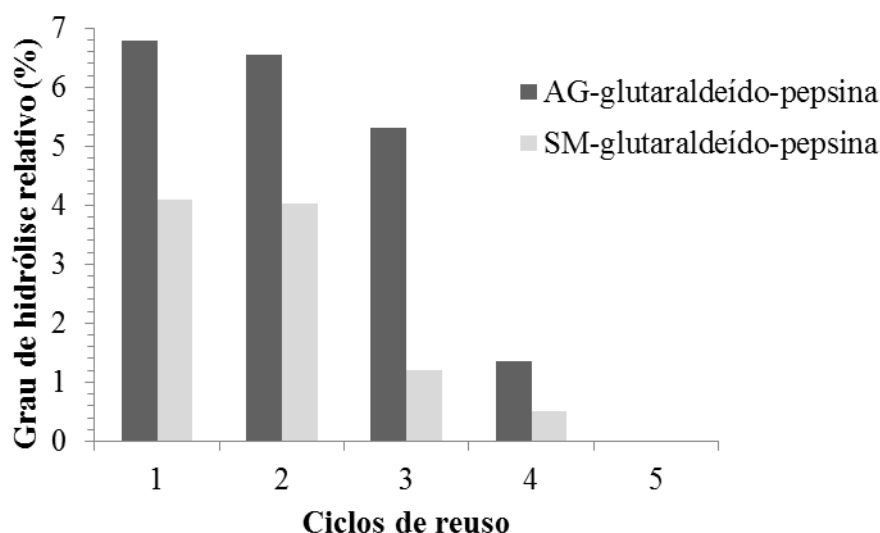
Metodologia descrita no capítulo 1, item 2.5.

1.2. Reuso (atividade relativa)

Metodologia descrita no capítulo 1, item 2.5.

O reuso dos derivados foram realizados usando soro de queijo como substrato. A relação derivado:soro foi de 1:2 (2,5g de derivado + 5mL de soro de queijo) que foi mantida sob agitação em banho-maria (45°C; 140 rpm) por 24 horas. Após o final de cada ciclo o soro de queijo foi filtrado e um novo substrato adicionado. Foram realizados 5 ciclos de reuso e a atividade relativa foi determinada ao final de cada ciclo de reuso através da precipitação das proteínas do soro de queijo com ácido tricloroacético 10% por pelo menos 1 hora sob refrigeração (McDonald e Chen, 1965). Foram realizadas leituras do sobrenadante ($\lambda=280$ nm), onde 1 unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima imobilizada necessária para liberar 1 μ mol de tirosina por minuto nas condições de ensaio.

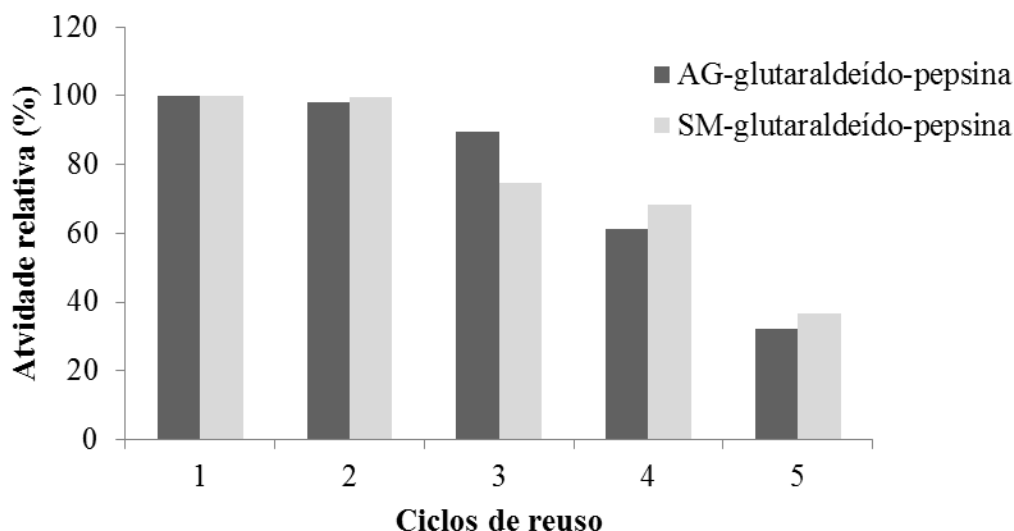
Figura 1. Grau de hidrólise dos ciclos de reuso dos derivados AG-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina.



Os graus de hidrólise do soro de queijo nos 5 ciclos de reuso foram superiores para o derivado AG-glutaraldeído-pepsina com relação ao derivado SM-glutaraldeído-pepsina. Uma hipótese para esse comportamento está provavelmente relacionada a geometria e porosidade dos suportes usados para imobilização, onde na agarose houve uma melhor interação enzima-substrato, já que conforme item 3.2.1. do capítulo 2, ambos derivados apresentaram rendimentos de imobilização e atividades recuperadas muito semelhantes. No ensaio com o

derivado AG-glutaraldeído-pepsina o grau de hidrólise para cada ciclo variou de 6,79% a 1,36%, sendo que no ciclo 5 não houve hidrólise. Para o ensaio com o derivado SM-glutaraldeído-pepsina, obtivemos o mesmo perfil para o grau de hidrólise, entretanto com valores inferiores que variaram de 4,09% a 0,50%.

Figura 2. Atividade relativa dos derivados AG-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina após 5 ciclos de reuso



A atividade relativa dos derivados AG-glutaraldeído-pepsina e SM-glutaraldeído-pepsina foram reduzidas a 32,31% e 36,48%, respectivamente após 5 ciclos de reuso. Até o terceiro ciclo de reuso os derivados mantiveram 89,51% (AG-glutaraldeído-pepsina) e 74,79% (SM-glutaraldeído-pepsina), sendo ainda viável do ponto de vista econômico. Entretanto a imobilização da pepsina nos suportes AG e SM-glutaraldeído não promoveram uma boa estabilização, pois trata-se de uma imobilização covalente unipontual que pelos resultados obtidos não foi capaz de rigidificar efetivamente a estrutura terciária desse enzima. No intuito de viabilizar o uso dessa importante protease em reatores enzimáticos conforme proposto nesse trabalho, vamos dar continuidade em nossa pesquisa, onde começamos a realizar experimentos de modificação química de sua estrutura visando inserir grupos que possibilitem uma maior estabilidade a valores de pH acima de 6,0, onde a imobilização covalente se dá de modo mais efetivo. Esperamos com esses resultados e experimentos futuros encontrar vias de imobilizar a pepsina covalentemente, para promover uma maior estabilidade sem perda significativa de suas propriedades catalíticas.

Capítulo 3

TRANSPORTE E ABSORÇÃO DE PEPTÍDEOS DE LACTOSORO
BOVINO E BUBALINO POR DIALISABILIDADE E CULTURA
DE CÉLULAS Caco-2

RESUMO

Diferentes hidrolisados parciais dos soros de queijo bovino e bubalino foram obtidos através de um reator de leito empacotado com as proteases pepsina e tripsina imobilizadas covalentemente em pó de sabugo de milho ativado. A relação derivado enzimático/volume útil foi de 1:2 e o processo foi conduzido a 45°C com uma vazão de 10,1mL/h. Para a hidrólise os soros de queijo bovino e bubalino foram dialisados e tratados com caulim para a redução dos teores de lactose e gordura, respectivamente. Os hidrolisados foram fracionados por cromatografia de filtração em gel (Sephadex G25) para obtenção de *pools* de peptídeos <5kDa. O transporte e a absorção de cada um dos *pools* de peptídeos foram avaliados pelos métodos *in vitro* da simulação da digestão gastrointestinal/dialisabilidade e por monocamada de células Caco-2. O perfil qualitativo do produto final de cada etapa experimental foi analisado por RP-HPLC. Os soros de queijo bovino e bubalino tratados apresentaram uma concentração de proteínas de 7,2 mg/mL e 9,8 mg/mL, respectivamente e a hidrólise parcial foi conseguida com sucesso para todas as condições testadas. Os perfis de hidrólise qualitativos totais foram semelhantes para os hidrolisados interespecies, entretanto perfis diferentes foram obtidos de acordo com a especificidade catalítica de cada derivado enzimático empregado. Na dialisabilidade os perfis cromatográficos indicaram que os diferentes pools de peptídeos foram efetivamente modificados após a digestão simulada havendo a difusão de poucas frações peptídicas para o interior da membrana de diálise. Na simulação do transporte e absorção pela monocamada de células Caco-2 não houve absorção de frações de peptídeos para o lado basal da monocamada para nenhum dos *pools* de peptídeos testados. Esses resultados sugerem que a ingestão oral de peptídeos que possam ter alguma atividade bioativa é ainda um grande desafio, já que a manutenção de sua estrutura é crucial para desempenhar efetivamente o binômio estrutura/função.

ABSTRACT

Bovine and buffalo cheese whey were hydrolyzed using pepsin and trypsin covalently immobilized on activated corncob powder, through the aid of a packed bed reactor leading to the obtention of partial hydrolysates. The relationship derivative/useful volume was 1:2 and the process was conducted at 45 °C with a flow 10.1mL/h. Prior the hydrolysis buffalo and bovine cheese whey were dialyzed and treated with kaolin to reduce lactose and fat, respectively. The hydrolysates were fractionated by gel filtration chromatography (Sephadex G25) to obtain <5kDa peptide pools. The transport and absorption of each peptide pool were

evaluated by in vitro methods gastrointestinal digestion/dialysability simulation and Caco-2 cell monolayer. The qualitative profile of the end products of each experimental phase was analyzed by RP-HPLC. The bovine and buffalo cheese whey had a protein concentration of 7.2 mg/mL and 9.8 mg/mL, respectively, and partial hydrolysis was successfully achieved for all conditions tested. The qualitative hydrolysis profiles were similar for interspecies hydrolysates, however different profiles were obtained by the catalytic specificity of each derivative employed. The chromatographic profiles of dialysability experiments indicated that peptides pools were effectively modified after simulated digestion, showing the diffusion of a few peptide fractions into the interior of the dialysis membrane. In the simulation of the transport and absorption through the Caco-2 cell monolayer there was no absorption of peptide fractions to the basal side of the monolayer to any of the tested peptides pools. These results suggest that the oral intake of peptides with some bioactive activity is still a major challenge, since maintaining its structure is crucial to effectively play the dual structure/function role.

1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo é o subproduto remanescente da produção de queijos pela precipitação ácida ou enzimática das caseínas do leite (Smithers et al., 2008; Kosseva et al., 2009; Morais et al., 2015). Representa aproximadamente 85-90% do volume total do leite, onde se concentram cerca de 55% do total de nutrientes, com destaque para lactose, proteínas e minerais (Sinha et al., 2007; Brandelli et al., 2015; Yadav et al., 2015). A produção atual mundial de soro de queijo é estimada em cerca de $180-190 \times 10^6$ ton./ano, com uma taxa de crescimento de 2% ao ano e desse montante, apenas 50% é aproveitado e processado para diferentes fins (Baldasso et al., 2011; Yadav et al., 2015). Esta condição de sub aproveitamento, elevada carga orgânica e alto volume de produção, mantém essa matéria-prima na categoria dos efluentes industriais com elevado potencial poluidor, ou seja, apresenta alta demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO) de $27-60 \text{ g.L}^{-1}$ e $50-102 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente (Prazeres et al., 2012; Yadav et al., 2015).

O desenvolvimento da ciência moderna e abordagens técnicas inovadoras têm colaborado para uma maior compreensão em nível molecular das características químicas, biológicas e nutricionais do soro de queijo principalmente no que diz respeito às proteínas e peptídeos gerados (Smithers et al., 2008). As proteínas do soro de queijo representam 20% do total de proteínas do leite e são consideradas de alto valor biológico, pois apresentam em sua

composição todos os aminoácidos essenciais, especialmente os sulfurados e de cadeia ramificada (Baldasso et al., 2011; Morais et al., 2015; Mota et al., 2006; Yalçın, 2006). Também apresentam excelentes propriedades tecnológicas como capacidade emulsificante, gelificante, formação de espuma, etc (Kananen et al., 2000; Mota et al., 2006; Smithers et al., 2008) e são classificadas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) para aplicação nos setores alimentício e farmacêutico (Yadav et al., 2015). Atualmente é a principal fonte de peptídeos bioativos com atividades reconhecidas, dentre elas podemos citar atividade anti-hipertensiva, antioxidante, imunomoduladora, antimicrobiana, antitrombótica, opióide, antiviral (Korhonen, 2009; Carvalho et al., 2013; Ng et al., 2015; O’Keeffe e FitzGerald, 2014).

No contexto de produtos de alto valor agregado e bioatividade, as proteínas e peptídeos terapêuticos ganharam um mercado significativo nas últimas décadas tanto no campo farmacêutico, como no alimentício (Segura-Campos et al., 2011; Choonara et al., 2014). Estudos recentes abordam a relação estrutura/funcionalidade e como processos em variadas condições poderiam interferir em tal relação. Nesse contexto a hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo tem sido muito explorada, sendo considerado o processo mais promissor para manipulação das propriedades tecnológicas e produção de peptídeos bioativos e a possibilidade de unir funcionalidades biológicas e tecnológicas a partir de uma única matéria-prima é de grande interesse para a indústria (Mellinger-Silva et al., 2015), onde cada produto gerado pode agregar um valor comercial de 3 a 40 vezes em relação ao soro de queijo integral em pó (Baldasso et al., 2011; Yadav et al., 2015).

Em virtude desse mercado crescente e rentável, um processo industrial atrativo é aquele que consegue associar economia, alta qualidade e rendimento e dentre os fatores que limitam o uso generalizado das proteínas do soro de queijo é justamente a falta de uma tecnologia viável a nível industrial que atenda todos esses requisitos (Smithers et al., 2008).

O elevado custo das enzimas em processos industriais impulsionaram o estudo e desenvolvimento de novas tecnologias com o objetivo de diminuir os gastos associados ao emprego desses biocatalizadores. Uma das áreas mais exploradas é a de imobilização de enzimas que pode gerar economia devido à possibilidade de reuso do biocatalizador (estabilidade e insolubilização), fácil controle da reação e recuperação do produto e automação de processo (reatores enzimáticos) com a possibilidade do desenvolvimento de sistemas contínuos (Fernandes, 2010; Zhang e Xing, 2011; Cao, 2011), entretanto essa é ainda

uma ampla área de estudos, já que não existe um método de imobilização ideal para todas as enzimas industriais (Guisán, 2006). Entretanto as formas de obtenção de proteínas e peptídeos, não são os únicos entraves para o uso desses ingredientes de modo generalizado.

Quando se estuda o impacto de um composto bioativo na saúde humana, a sua bioacessibilidade, biodisponibilidade e bioatividade devem ocorrer e se manter durante sua passagem pelo trato gastrointestinal até seu local de ação (Balimane e Chong 2005; Carbonell-Capella et al., 2014). Com o aumento do mercado e procura por proteínas e peptídeos terapêuticos, estudos prévios de transporte e absorção desses compostos são necessários. Estudos *in vitro* são importantes ferramentas para predizer os mecanismo e barreiras para absorção e integridade desses compostos frente à influência do arsenal enzimático a que são expostos durante a sua digestão (Antunes et al., 2013; Segura-Campos et al., 2011). Entre os métodos *in vitro*, a cultura de células Caco-2 é um dos métodos mais usados e aceitos para triagem de estudos de solubilidade, permeabilidade e estabilidade metabólica de diferentes compostos de interesse nutricional e terapêutico (Balimane e Chong, 2005; Föger et al., 2008; Ferruza et al., 2012; Courraud et al., 2013).

A linhagem de células Caco-2 (adenocarcinoma de cólon) quando cultivadas em condições padrões são capazes de se diferenciarem espontaneamente em enterócitos, as principais células de absorção do intestino (Langerholc et al., 2011; Natoli et al., 2012; Kauffman et al., 2013; Antunes et al., 2013). Para mimetizar o epitélio gastrointestinal, as células Caco-2 são cultivadas no sistema *Transwell*[®]. O sistema inclui um *insert* composto por uma membrana semipermeável sobre a qual as células são cultivadas (Gamboa e Leong, 2013). A diferenciação das células Caco-2 nos *inserts* leva a formação de uma monocamada acoplada por junções bloqueadoras que divide o sistema em dois compartimentos, um apical (que corresponde ao lúmen) e um basolateral (sistema vascular intestinal) (Press e Di Grandi, 2008; Ferruza et al., 2012). A confluência é atingida entre os dias 15 e 25 após a semeadura e é acompanhado pela medição da resistência elétrica transepitelial (TEER), cujos valores experimentais apropriados devem estar entre 260-450 *ohms* (Ω), garantindo assim a integridade da monocamada (Srinivasan et al., 2015).

Existe também o método baseado na dialisabilidade de um elemento através de uma membrana semipermeável de porosidade controlada. Normalmente este método *in vitro* é dividido em duas fases, a primeira envolve a digestão com a enzima pepsina que simula a fase gástrica e a segunda fase (intestinal) compreende a digestão com pancreatina e sais biliares

em condições controladas de pH e temperatura (Luten et al., 1996; Bueno et al., 2012). A proporção do elemento que se difunde pela membrana após um período de equilíbrio é usada para estimar a proporção do elemento que estará provavelmente disponível para a absorção (Luten et al., 1996; Goulart et al., 2014). Esse método simula grosseiramente a difusão passiva de compostos através da mucosa intestinal (Roig et al., 1999).

Na prática quaisquer métodos *in vitro* vai inevitavelmente falhar em precisão em comparação a estudos *in vivo* devido à complexidade inerente ao processo, entretanto, durante os últimos anos cientistas tem usado uma série de modelos de digestão *in vitro* para obtenção de “*insights*” quanto a alterações químico-estruturais que possam ocorrer no elemento de estudo (Hur et al., 2011) e possibilitar um rastreio preliminar para identificar a liberação do composto de interesse ou obtenção de resultados promissores para estudos mais aprofundados em sequência (Van Campen e Glahn 1999). Os parâmetros mais comuns avaliados na simulação da digestão *in vitro* são: digestibilidade/degradação > bioacessibilidade > estabilidade > mudanças estruturais (Hur et al., 2011).

Diante do exposto o objetivo foi hidrolisar as proteínas do soro de queijo bovino e bubalino em reator enzimático de leite empacotado e avaliar o transporte e absorção de peptídeos através da dialisabilidade e cultura de células Caco-2.

2. MATERIAL E MÉTODOS.

2.1. Material

Soro de queijo bovino e bubalino produzido através de coagulação enzimática. Proteases pepsina e tripsina imobilizadas em suporte alternativo pó de sabugo de milho ativado (Laboratório de Enzimologia-FCFar). Pepsina, pancreatina, sais biliares e membrana semipermeável foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). As células Caco-2 (ATCC® HTB-37™) foram obtidas do Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ nº0059). Sephadex G25 foi adquirida da Amersham Biosciences (Uppala, Sweden). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções de trabalho foram preparadas no momento do uso ou utilizadas sob adequadas condições de armazenamento.

2.2. Métodos

2.2.1. Obtenção do soro de queijo bovino e bubalino

Os soros de queijo bovino e bubalino foram obtidos a partir do leite integral pasteurizado com a adição da enzima renina de *Aspergillus niger* (Estrela®). Para cada litro de leite foi utilizada

a proporção de 0,6% v/v de renina e CaCl_2 (0,5 mol/L, 0,5%). A mistura foi mantida em banho-maria sem agitação durante uma hora a 35°C. Decorrido o tempo de coagulação, os sólidos foram separados através de filtração simples com gaze (Custódio et al. 2005). O soro produzido foi dialisado por 24 horas em membrana celulósica Trip-Fort (Hoechst) em constante agitação contra água destilada sob refrigeração para a remoção de lactose. No intervalo de 24 h foram realizadas três trocas de água (McPhie, 1971). Após a diálise, foi adicionado ao soro, caulim, na proporção de 0,6 g/30 mL de soro para adsorção da gordura. O soro foi centrifugado a 4°C, para separação do caulim. O soro dialisado, desengordurado e centrifugado foi armazenado em frascos identificados, e congelados até o momento dos ensaios.

2.2.2. Dosagem de proteínas e lactose no soro de queijo bovino e bubalino deslactosado e desengordurado.

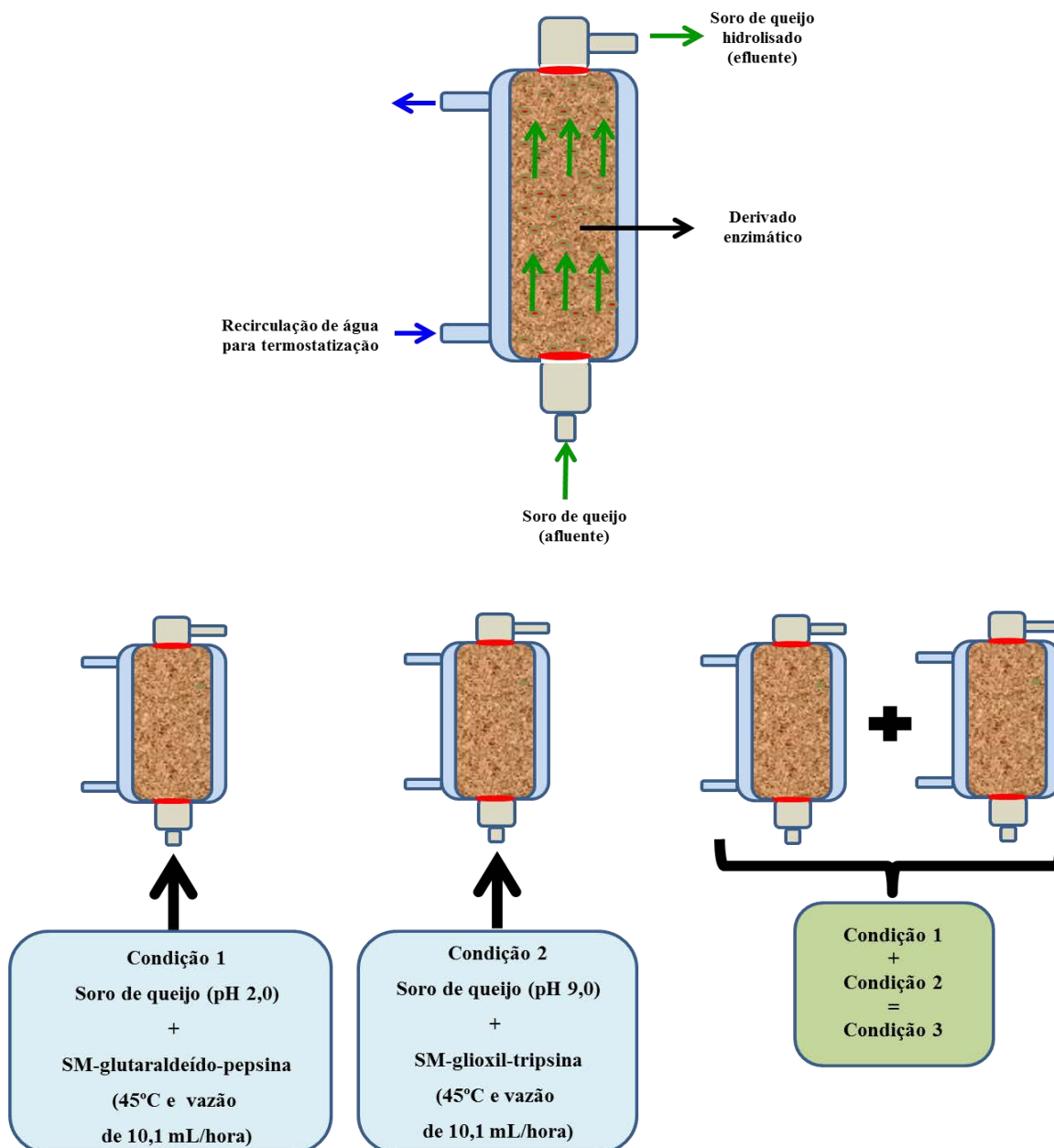
A dosagem de proteína foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) e a proteína soroalbumina bovina (BSA) foi utilizada para obtenção da curva analítica de proteínas [$0,0208 (\mu\text{g prot. mL}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]. Para dosagem de lactose foi utilizado à determinação de açúcares redutores pelo método de Miller (1959) usando lactose como padrão ($0,247 \mu\text{mols.mL}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.2.3. Hidrólise parcial dos soros de queijo bovino e bubalino em reator encamisado de leito empacotado com SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina.

Para a hidrólise dos soros de queijo bovino e bubalino foi utilizado um reator de leito empacotado e encamisado de escala laboratorial com volume total de 0,5 L e volume útil de 0,25 L. A razão derivado enzimático/volume útil foi de 1:2. O fluxo do substrato através do leito foi ascendente, constante no sentido axial e longitudinal (fluxo pistão). A vazão foi de 10,1 mL/hora e o soro foi acidificado (pH 2,0) com HCl 0,1M ou alcalinizado (pH 9,0) com NaOH 0,1M dependendo da protease imobilizada utilizada. A hidrólise transcorreu a 45°C até a obtenção de 1L de hidrolisado para cada condição pré-estabelecida. As condições foram idênticas para o soro bovino e bubalino e realizadas separadamente. A Figura 1 mostra o sistema de hidrólise proposto.

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

Figura 1: Esquema simplificado das diferentes condições de hidrólise dos soros de queijo bovino e bubalino em reator de leito empacotado com SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina.



Fonte: Próprio autor.

2.2.4. Fracionamento dos hidrolisados por cromatografia de filtração em gel

Os soros de queijo bovino e bubalino hidrolisados em reator de leito empacotado foram fracionados utilizando uma coluna de filtração em gel Sephadex G25 (Ø 1,5 x 30 cm, Amersham Biosciences, Uppala, Sweden) previamente lavada com tampão fosfato de sódio 1mM pH 7,0. A eluição foi conduzida em temperatura ambiente utilizando tampão fosfato de

sódio 10mM pH 7,5 com a adição de 2 mL dos diferentes hidrolisados concentrados 10 vezes em concentrador de frações miVac DUO concentrador (GeneVac). O fluxo foi de 0,2 mL/min. e frações de 2,0 mL foram coletadas em coletor de frações GradiFrac (Pharmacia Biotech) acoplado a bomba peristáltica Pump P-1 (Pharmacia Biotech). As frações foram analisadas em espectrofotômetro Ultrospec 3100 pro UV/Visible (Amersham Biosciences) em $\lambda=214\text{nm}$. Antes do início das aplicações das amostras a coluna foi calibrada com uma solução de hemoglobina 2% para determinar o volume do *void* que é o volume no qual são eluídas proteínas totalmente excluídas dos poros do gel ou resina. O *void* obtido foi de 24 mL, ou seja, volume correspondente a fração de número 12. As frações ($< 5\text{kDa}$) de cada hidrolisado obtido foram posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e utilizadas para o estudo de transporte e absorção de peptídeos por dialisabilidade e cultura de células Caco-2.

2.2.5. Análise dos diferentes hidrolisados proteicos e frações por RP-HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP_HPLC), em escala analítica, foi efetuada em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi do tipo ultrapura. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 Nucleosil (250 x 4,6 mm), $\Phi = 5\mu\text{m}$, 300Å de porosidade, com gradiente linear de 5-95% (solvente A: água contendo 0,045% de TFA e solvente B: acetonitrila contendo 0,036% de TFA em 30 minutos), com fluxo de 1,0 mL/minuto e detecção em 220 nm.

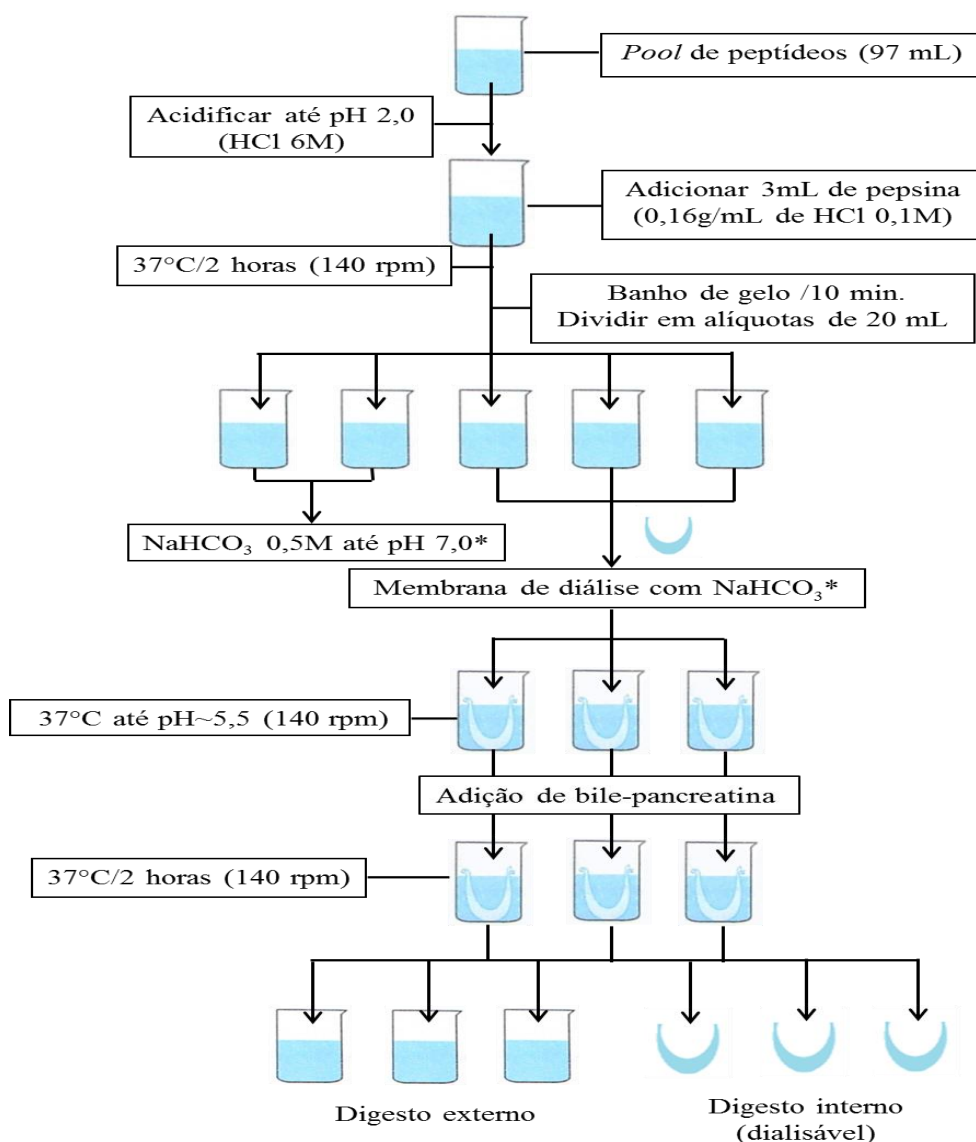
2.2.6. Simulação da digestão gastrointestinal e dialisabilidade

A simulação da digestão gastrointestinal e determinação da fração dialisável foram realizadas de acordo com o método de Miller et al. (1981) modificado por Luten et al. (1996). Métodos *in vitro* como a dialisabilidade têm sido muito importantes quando se busca prever a bioacessibilidade de muitos compostos de interesse farmacêutico e alimentício e visa uma triagem simples e rápida, sendo um método bastante utilizado antes de estudos *in vivo* que normalmente empregam técnicas caras e de difícil execução (Argyri et al., 2011).

Em linhas gerais, 97 mL de amostra acidificada com HCl 6N (pH 2,0) foi submetida à digestão gástrica com 3mL pepsina (0,16g/mL de HCl 0,1M). A mistura foi mantida em banho-maria a 37°C/2 horas e logo em seguida foi levada a banho de gelo por 10 minutos para minimizar a ação da pepsina. O digerido gástrico foi dividido em 5 alíquotas de 20 mL cada. Duas alíquotas foram utilizadas para determinação da acidez titulável com NaHCO_3

0,5M até pH 7,5 para saber o volume de NaHCO_3 0,5M necessário para simular o pH intestinal. As três alíquotas restantes foram submetidas à digestão intestinal. Para digestão intestinal membranas com poros que permitem a diálise de moléculas $< 12,4$ kDa (Sigma-Aldrich) devidamente preenchidas com NaHCO_3 0,5 M foram acomodadas em béqueres de 250 mL com 20 mL do digerido gástrico, de modo que houvesse o máximo de contato entre a membrana e o digerido. Os béqueres foram mantidos em banho-maria a 37°C até que o meio externo apresentasse pH 5,0, respeitando um tempo de espera de no máximo 90 minutos. Com o pH ajustado, foi adicionado em cada um dos três béqueres 5 mL de solução bile-pancreática (20mg de pancreatina + 125mg de extrato biliar em 5mL de NaHCO_3 0,1 M) e mantidos em banho-maria com agitação (140 rpm) a 37°C /2 horas (Figura 2). Após a digestão, o digerido externo e interno das membranas de diálise foram recolhidos em frascos apropriados e armazenados adequadamente até o momento das análises. Amostras foram analisadas por RP-HPLC.

Figura 2: Fluxograma simplificado da dialisabilidade.



*volume de NaHCO₃ 0,5M necessários para aumentar o pH de 2,0 a 7,0.

Fonte: Próprio autor

2.2.7. Transporte e absorção de peptídeos por monocamada de células Caco-2

As células de adenocarcinoma de cólon (Caco-2 - ATCC® HTB-37™) foram obtidas do Rio de Janeiro *Cell Bank* (BCRJ nº0059) e conservadas em -80°C até o início dos procedimentos experimentais. Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Células e Mutagênese do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP – Araraquara, Brasil.

2.2.7.1. Cultura de células.

Para simular o transporte e absorção de peptídeos a linhagem de células Caco-2 foram usadas como modelo de barreira intestinal (monocamada) seguindo metodologia descrita por Hubatsch et al. (2007).

As células foram descongeladas em temperatura ambiente e alíquotas de 1 mL foram adicionadas em 5 mL de meio de crescimento [Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco/BRL, Carlsbad, CA, USA)] pH 7,4, suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, Gibco/BRL), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ penicilina e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ estreptomicina (Gibco/BRL). Após homogeneização a suspensão celular foi transferida para garrafas de cultura de células (75 cm^2) e incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de ar umidificado e 5% de CO₂. A cultura de células Caco-2 foram monitoradas a cada dois dias em microscópio de luz invertida, com o intuito de se verificar o crescimento celular e aspectos morfológicos, além de possíveis contaminações. Durante o período de incubação o meio de cultura foi substituído a cada dois dias. Ao atingir o estágio de confluência (elevada densidade celular) o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas 5 mL de tampão PBS (Phosphate Buffered Saline - Sigma). Após a lavagem foram adicionados as garrafas 5 mL de uma solução de tripsina-EDTA (0,25%; m/v) deixando em repouso por 2 minutos. Após esse tempo as garrafas foram agitadas vigorosamente para desprendimento das células aderidas (monocamada) nas paredes das garrafas. Uma vez removidas foi adicionado ao frasco cerca de 5 mL de meio de cultura DMEN para minimizar a ação da tripsina. A suspensão de células foi transferida para tubo de centrífuga (falcon) e centrifugados a 212 g /5 minutos. Os *pellets* foram ressuspensos em 5 mL de meio DMEM e as células foram posteriormente usadas nos ensaios de citotoxicidade e transporte e absorção dos peptídeos.

2.2.7.2. Citotoxicidade in vitro

As células obtidas no item 2.2.7.1. foram contadas em Câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para $7,5 \times 10^4$ células/mL de DMEM. Em seguida, 200 μL da suspensão de células ($1,5 \times 10^4$ células / poço) foram adicionadas em uma microplaca de 96 poços e incubadas a 37 ° C numa atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir que as células se fixassem ao fundo de cada poço. O meio de cultura foi aspirado e os poços foram lavados com 100 μL de tampão PBS por 3 vezes. As frações de peptídeos a serem testadas foram diluídas em diferentes concentrações (1mg a 0,008 mg/mL) em meio DMEM. O controle positivo foi realizado com uma solução de DMSO 0,5% e o controle negativo com meio de cultura DMEM. As amostras e os controles (100 μL) foram aplicados sobre as células,

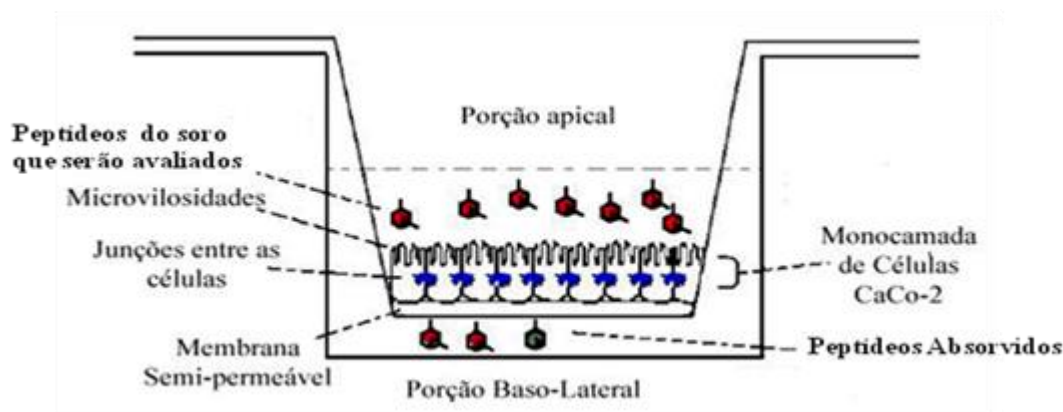
seguido de incubação por 24 horas. No dia seguinte as substâncias foram desprezadas e os poços foram novamente lavados com PBS. A citotoxicidade dos compostos foram determinadas pela adição de 50 µL de corante resazurina (SIGMA) e leituras foram feitas após incubação de 3 horas. A resazurina (azul) é efetivamente reduzida nas mitocôndrias, o que a torna útil para estudar a atividade metabólica mitocondrial. A redução dá origem à resorufina, cuja cor-de-rosa apresenta fluorescência e indica a viabilidade celular. A cor azul persistente de resazurina é um sinal de morte celular (Ahmed et al., 1994). A leitura foi realizada em leitor de microplacas Sinergia H1 (BioTek®) usando filtros de excitação e emissão com comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata. A viabilidade celular foi calculada pela percentagem (%) de redução da resazurina usando a seguinte equação:

Redução de resazurina (%) = [(Valor experimental - valor do controle negativo) / (100% do valor do controle positivo - valor do controle negativo)] × 100.

2.2.7.3. Transporte (permeabilidade) das frações peptídicas pela monocamada de células Caco-2.

O transporte das frações peptídicas através das monocamadas de células Caco-2 foi realizado usando placas “*Transwell Col 12 well culture plates®*” (Corning Corporation) compostas por inserts (Transwell Col Inserts®). Para estudos de retenção e transporte, as células foram semeadas nos *inserts* (apical) em densidade de 5×10^4 células. Conforme descrito por Perales et al. (2005), os *inserts* foram encaixados nos poços e o lado apical foi denominado de “compartimento doador” e o basal “compartimento aceptor”. As células foram mantidas em meio DMEM conforme já descrito no item 2.2.7.1. Após a formação da monocamada celular (20-25 dias e ~80% de confluência). As superfícies apical e basolateral foram cuidadosamente lavadas (3 vezes) com tampão Hank's buffer 1x (Gibco) contendo 200 mM HEPES salts (Sigma) com pH ajustado para 7,4. Um volume de 1500µL do tampão foi adicionado à porção basal e 500µL já contendo os as frações (1mg/mL) foram adicionados à porção apical (monocamada de células Caco-2). Os *inserts* foram incubados a 37°C, 5% de CO₂ e com umidade relativa de 90% por 3 horas. Após este período as amostras do lado apical e basal foram devidamente identificadas e transferidas para *eppendorfs* estéreis. As amostras foram adequadamente armazenadas até o momento da análise por RP-HPLC. Abaixo segue um esquema do ensaio in vitro de transporte e absorção de peptídeos através do cultivo de células Caco-2 (Figura 3):

Figura 3. Modelo de transporte e absorção de peptídeos através de monocamada de células Caco-2.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Dosagem de proteínas e lactose no soro de queijo bovino e bubalino tratados.

Na Tabela 1 estão representados os resultados obtidos para concentração de proteínas e lactose para o soro de queijo bovino e bubalino.

Tabela 1: Dosagem de proteínas dos soros de queijo bovino e bubalino tratados (deslactosado e desengordurado).

Amostra	Proteínas (g/L)	Lactose (g/L)
Soro de queijo bovino tratado	7,2±0,13	1,42 ±0,09
Soro de queijo bovino (Romám et al., 2011).	5,4	-
Soro de queijo bubalino tratado	9,8±0,11	1,23±0,14
Soro de queijo bubalino (Lira et al., 2009).	11,9	-

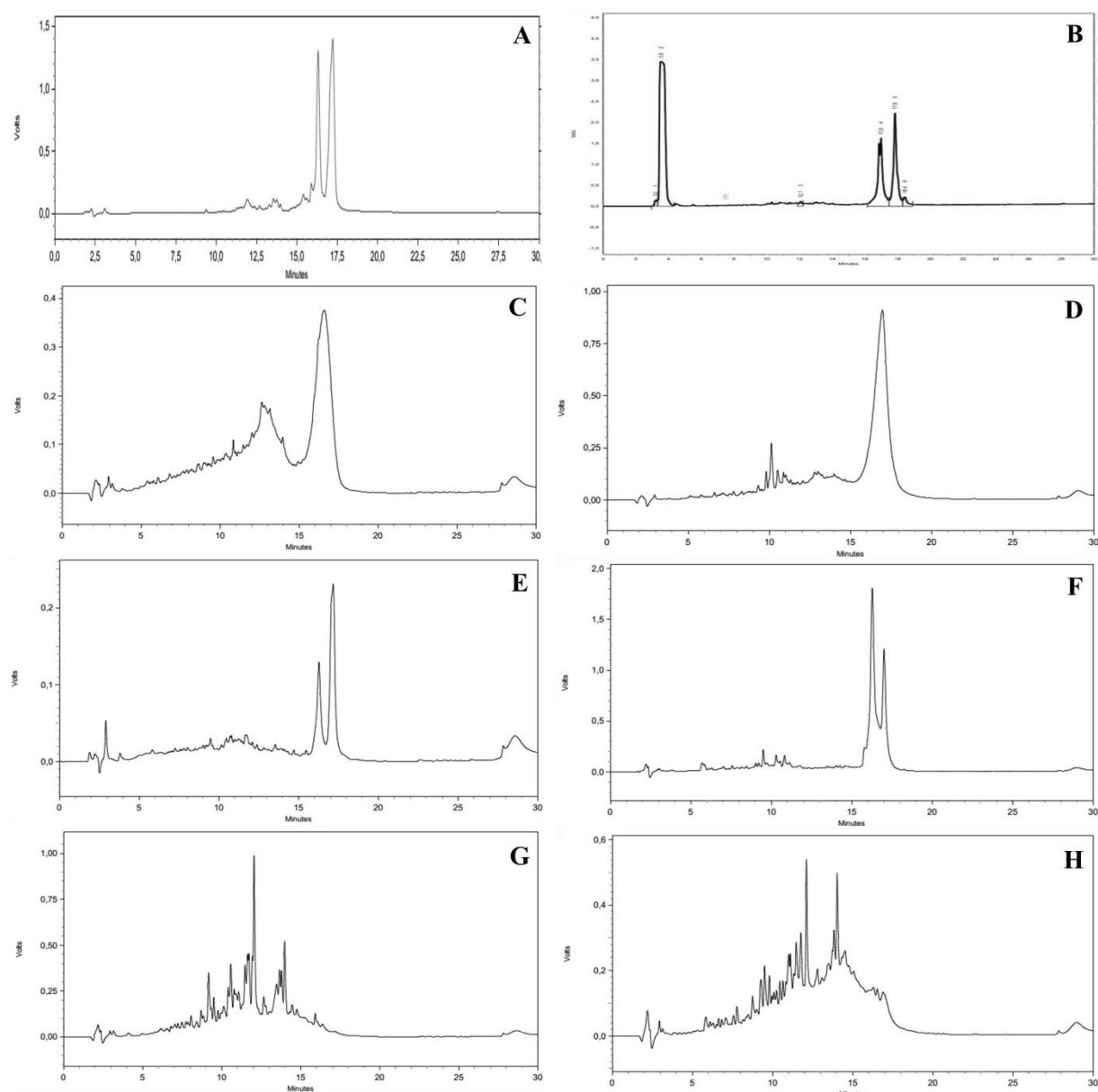
Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que a concentração de proteínas para o soro de queijo bovino preparado em nosso laboratório foi maior que a concentração encontrada em trabalho realizado por Romám et al. (2011). Já para o soro de queijo bubalino a concentração de proteínas foi um pouco menor com relação ao encontrado por Lira et al. (2009). Cabe ressaltar que, além dos métodos analíticos e tratamentos utilizados, as diferenças de concentração destes compostos estão relacionadas a diferentes espécies de mamíferos, fatores genéticos e ambientais conforme já descrito pela literatura.

3.2. Análise do perfil de hidrólise por RP-HPLC dos diferentes hidrolisados obtidos em reator de leito empacotado.

Os perfis qualitativos de hidrólise dos soros de queijo bovino e bubalino obtidos com os derivados estabilizados SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina em reator de leito empacotado estão representados na Figura 4.

Com a análise comparativa dos perfis de hidrólise obtidos para o soro bovino (Figura 4 C, E e G) e soro bubalino (Figura 4 D, F e H) foi possível verificar perfis semelhantes entre os hidrolisados interespecies, entretanto perfis diferentes foram obtidos de acordo com a especificidade catalítica de cada derivado enzimático empregado, uma vez que a pepsina é uma endopeptidase que cliva o lado carboxil terminal de resíduos hidrofóbicos com “preferência” para os aromáticos e a tripsina, outra endopeptidase, que cliva o carboxil terminal dos resíduos de arginina e lisina (Garcia et al. 2011). No caso das condições G e H, observou-se um aumento no número de picos entre os tempos de retenção 5-15 minutos devido uma hidrólise mais efetiva promovida por ambos derivados com relação às demais condições. Os perfis de hidrólise dos soros de queijo de ambas as espécies e para as diferentes condições testadas mostram que o uso das proteases pepsina e tripsina imobilizadas em pó de sabugo de milho promoveram a hidrólise das proteínas em um reator de leito empacotado quando comparamos os perfis dos hidrolisados com o perfil dos soros não hidrolisados (Figura 4 A e B).

Figura 4: Perfis qualitativos de hidrólise dos soros de queijo bovino e bubalino obtidos em reator de leite empacotado com os derivados SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina. Soro de queijo bovino e bubalino não hidrolisados (A e B); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina (C e D); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glioxil-tripsina (E e F); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (G e H).

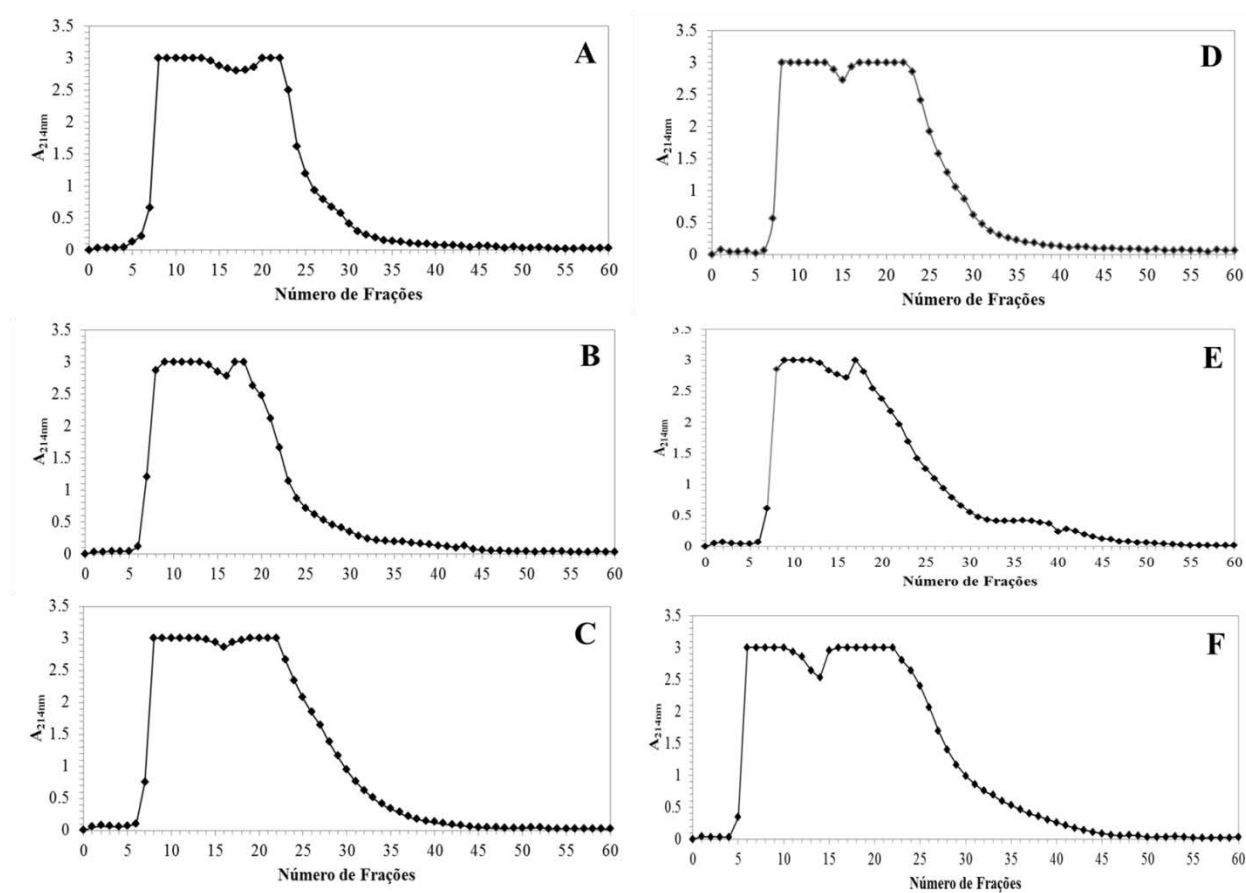


3.3. Fracionamento dos diferentes hidrolisados por cromatografia de filtração em gel (Sephadex G25) e análise por RP-HPLC.

Os diferentes hidrolisados obtidos foram posteriormente fracionados em cromatografia de filtração em gel em uma coluna Sephadex G25 (Figura 5). O objetivo dessa etapa foi separar

um *pool* de peptídeos de massas moleculares <5kDa que foram utilizados nos ensaios de transporte e absorção por dialisabilidade e cultura de células Caco-2 (itens 3.4 e 3.5).

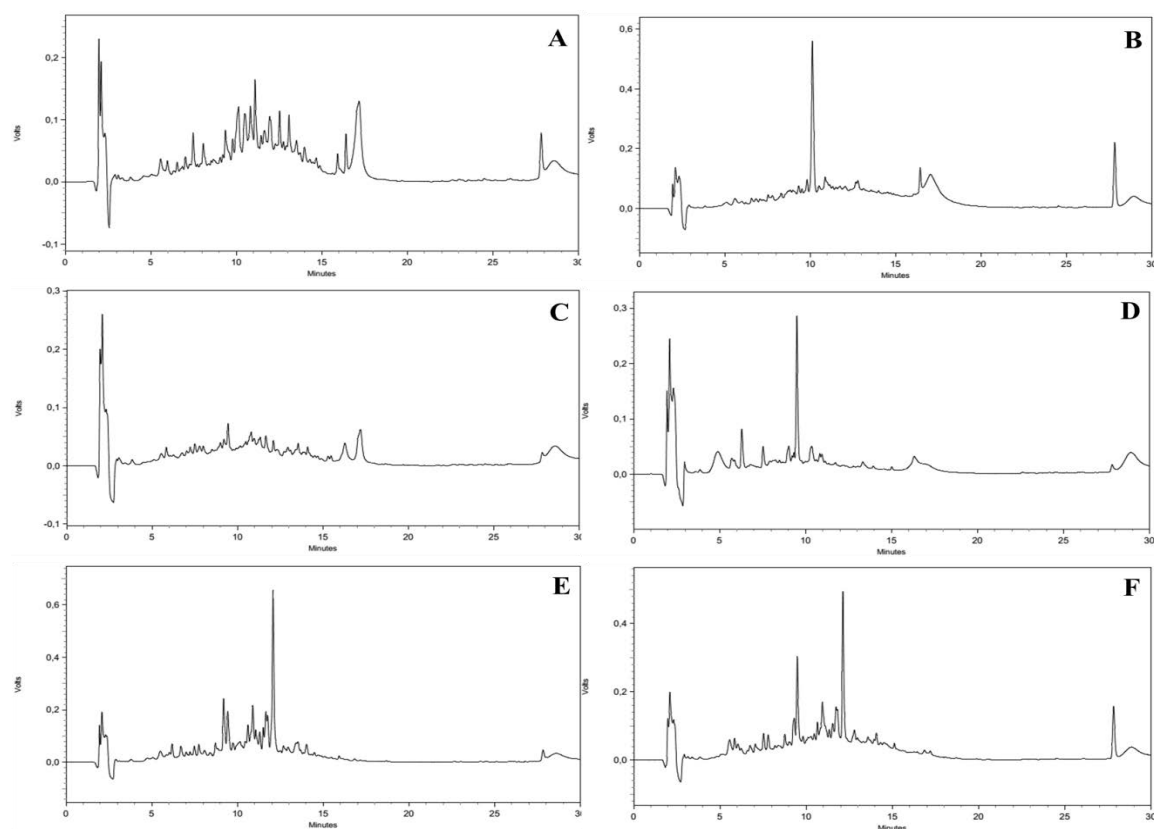
Figura 5: Perfil cromatográfico dos diferentes hidrolisados obtidos por filtração em gel (Sephadex G25): soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina (A e D); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glioxil-tripsina (B e E); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (C e F).



A coluna Sephadex G25 possui um intervalo de fracionamento para proteínas globulares ou frações proteicas de massas moleculares entre 1kDa-5kDa. Proteínas e peptídeos maiores que 5kDa são facilmente separados, pois são os primeiros a eluírem. O intuito dessa separação foi devido à associação baixa massa molecular *versus* bioatividade, já relatada na literatura, pois aumenta-se a probabilidade de os peptídeos menores não sofrerem digestão no trato gastrointestinal, como também de sua permeabilidade pela parede intestinal através dos enterócitos (O’Keefe e FitzGerald, 2014). Existem na literatura vários estudos que abordam o potencial bioativo de peptídeos derivados do soro de queijo. Entre as

bioatividades as mais estudadas são atividade anti-hipertensiva, antimicrobiana, anti-carcinogênica e antioxidante, etc (O'keeffe e FitzGerald, 2014; Leeb et al. 2015; Brandelli et al. 2015; Mellinger-Silva et al. 2015; Smithers et al. 2008). Além disso, a hidrólise enzimática é também capaz de reduzir a alergenicidade relacionada à β -lactoglobulina, como também atribuir propriedades tecnológicas como capacidade emulsificante, gelatinizante, formação e estabilização de espumas, (Mellinger-Silva et al. 2015; Brandelli et al. 2015; Smithers et al. 2008; Mota et al. 2006) gerando produtos de alto valor agregado e reduzindo seu impacto ambiental devido a sua elevada carga orgânica que está diretamente relacionada às altas concentrações de lactose e proteínas (Smithers et al. 2008, Brandelli et al. 2015; Prazeres et al. 2012; Smithers, 2015). Os *pools* de peptídeos também foram analisados por RP-HPLC (Figura 6). Ao contrário dos perfis qualitativos obtidos para os hidrolisados totais, houve diferenças interespecies e com relação à especificidade de cada derivado enzimático utilizado com exceção dos perfis obtidos nas condições E e F.

Figura 6: Perfil cromatográfico (RP-HPLC) dos diferentes *pools* de peptídeos <5kDa obtidos em Sephadex G25: soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina (A e B); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glioxil-tripsina (C e D); soro de queijo bovino e bubalino hidrolisados com SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (E e F).



3.4. Dialisabilidade dos diferentes pools de peptídeos

A dialisabilidade *in vitro* envolve um processo de digestão em duas etapas que simulam a fase gástrica (pepsina, pH 2,0) e a intestinal (pancreatina + sais biliares, pH 7,0) e a fração dialisável de um composto através de uma membrana semipermeável de porosidade controlada e pré-determinada (Sandberg, 2005). Essa técnica foi usada nesse estudo para prever o efeito da digestão simulada sobre os diferentes *pools* de peptídeos fracionados por Sephadex G25 (Figura 7: A, B e C (bovino) e Figura 8: I, II e III (bubalino)) e sua diálise por uma membrana com corte < 12 kDa (Sigma Aldrich). Como podemos observar pelos cromatogramas A, A_{Dex} e A_{Din}; B, B_{Dex} e B_{Din}; C, C_{Dex} e C_{Din} (Figura 7) e I, I_{Dex} e I_{Din}; II, II_{Dex} e II_{Din}; III, III_{Dex} e III_{Din} (Figura 8), houve alterações nos perfis qualitativos dos digestos externos (Dex) e digestos internos (Din) com relação às amostras testadas sugerindo um efeito hidrolítico pela ação das proteases usadas na digestão simulada.

Figura 7. Simulação da digestão gastrointestinal e dialisabilidade dos diferentes pools de peptídeos (Sephadex G25) do soro de queijo bovino: pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina (A, A_{Dex} e A_{Din}); pool de peptídeos SM-glioxil-tripsina (B, B_{Dex} e B_{Din}); pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (C, C_{Dex} e C_{Din}). O perfil foi determinado por RP-HPLC.

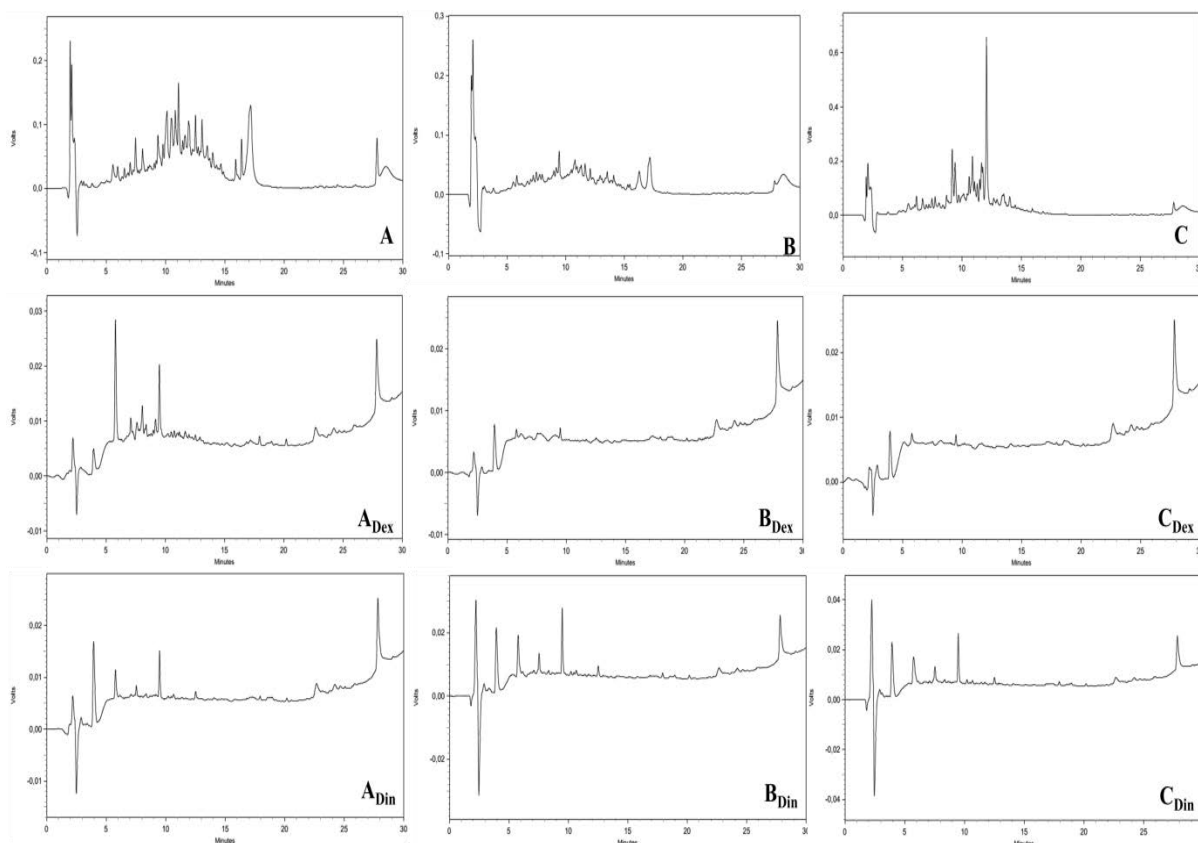
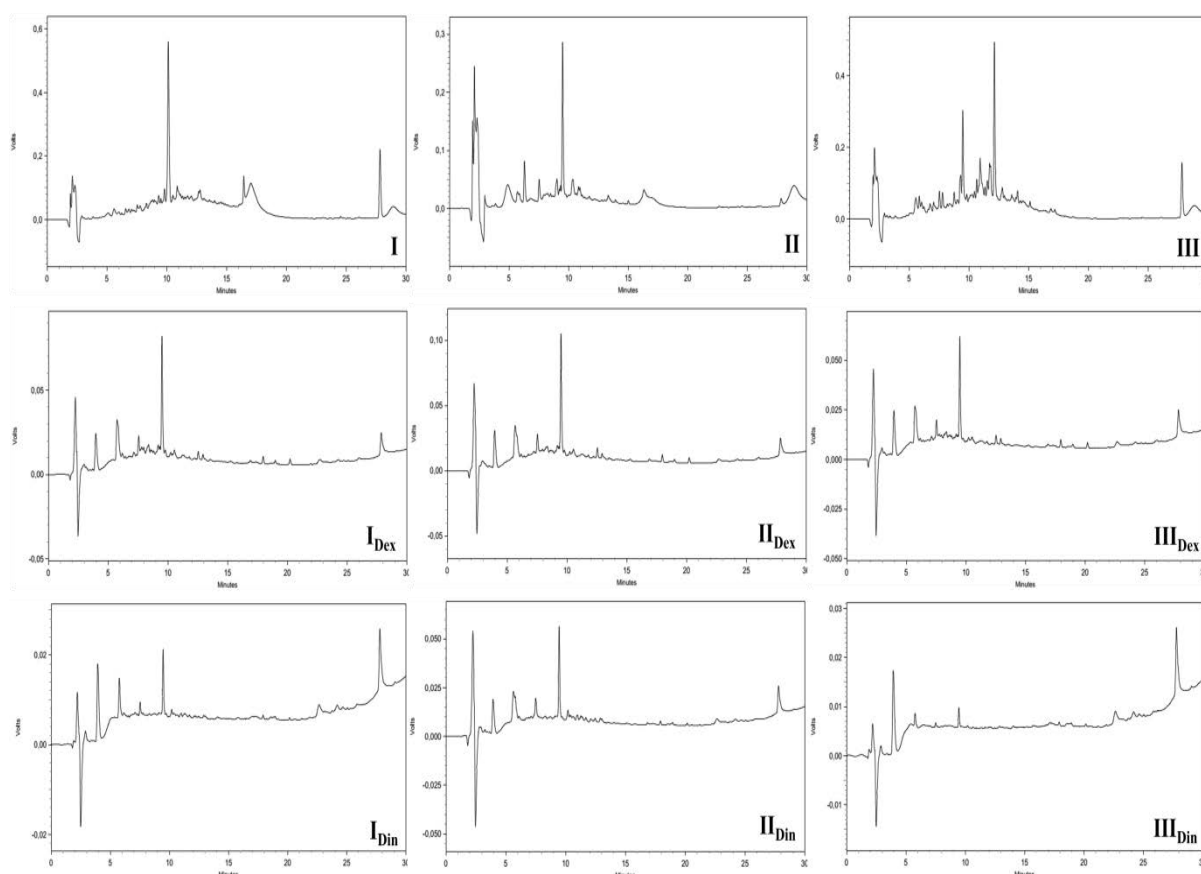


Figura 8. Simulação da digestão gastrointestinal e dialisabilidade dos diferentes pools de peptídeos (Sephadex G25) do soro de queijo bubalino: pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina (I, I_{Dex} e I_{Din}); pool de peptídeos SM-glioxil-tripsina (II, II_{Dex} e II_{Din}); pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (III, III_{Dex} e III_{Din}). O perfil foi determinado por RP-HPLC.



Conforme relatado na literatura (Yun et al. 2013; Antunes et al. 2013), um dos entraves para a ingestão oral de um ou mais peptídeos que possuam propriedades bioativas é a manutenção de sua integridade estrutural ao entrar em contato com o arsenal enzimático inerente ao trato gastrointestinal, como também a sua bioacessibilidade para transporte e absorção pelas células absorptivas da parede intestinal o que implica diretamente sobre a sua biodisponibilidade. Os experimentos de simulação da digestão gastrointestinal e dialisabilidade dos *pools* de peptídeos (Sephadex G25), mostraram uma redução dos picos pela hidrólise durante a digestão *in vitro*, entretanto quando se compara os perfis cromatográficos externos e internos de cada fração, foi possível verificar perfis semelhantes com a detecção de poucos picos (porção dialisável) no Din. A hidrólise efetiva dos peptídeos pode não ser uma desvantagem, já que o produto de hidrólise pode culminar na liberação de

aminoácidos essenciais que são fundamentais em diversas rotas metabólicas. Já se sabe que as proteínas do soro de queijo são de alto valor biológico, pois são constituídas por concentrações significativas de aminoácidos essenciais, aminoácidos de cadeia ramificada e aminoácidos sulfurados (Met e Cys) (Moraes et al. 2015). Esses últimos são precursores na síntese de glutathione (Kabil et al. 2014) um importante tiol não proteico que atua no combate ao estresse oxidativo (Lu et al. 2013). Já os aminoácidos de cadeia ramificada (Leu, Ile e Val) são associados a efeitos positivos sobre a regulação do peso corporal, síntese de proteínas musculares e regulação da glicemia (Layman e Walker, 2006; Lynch e Adams, 2014) e na saúde e qualidade de vida de pacientes com cirrose hepática (Kawaguchi et al., 2011).

3.5. Transporte e absorção dos diferentes pools de peptídeos através da monocamada de células Caco-2.

Proteínas e peptídeos terapêuticos vêm ganhando notoriedade e importância no cenário científico, pois cada vez mais essas moléculas estão sendo utilizadas no tratamento de uma variedade de doenças (Choonara et al., 2014). Na tabela 2 estão discriminados alguns exemplos de peptídeos que são utilizados comercialmente.

Tabela 2: Produtos lácteos comerciais com alegações de saúde ou de função com base em peptídeos biotivos.

Nome Comercial	Fonte	Função	Fabricante
Biozate	Fragmentos de β -lactoglobulina	Redução da pressão sanguínea	Davisco (USA)
BioPure-GMP	κ -caseína f(106-169)	Prevenção de cárie dental; influência na coagulação sanguínea; proteção contra viroses e bactérias.	Davisco (USA)
Vivinal Alpha	Derivado do soro de queijo	Tratamento contra HIV e disfunções do sono	Borculo Domo Ingredients (Holanda)
Capis	Val-Pro-Pro (β -caseína); Ile-Pro-Pro (κ -caseína)	Redução da pressão arterial	Capis (Japão)
Evolus	Derivados da β e κ -caseína	Redução da pressão arterial	Valio Ou (Finlândia)

Fonte: Korhonen, 2009; Choi et al. 2012 (modificado).

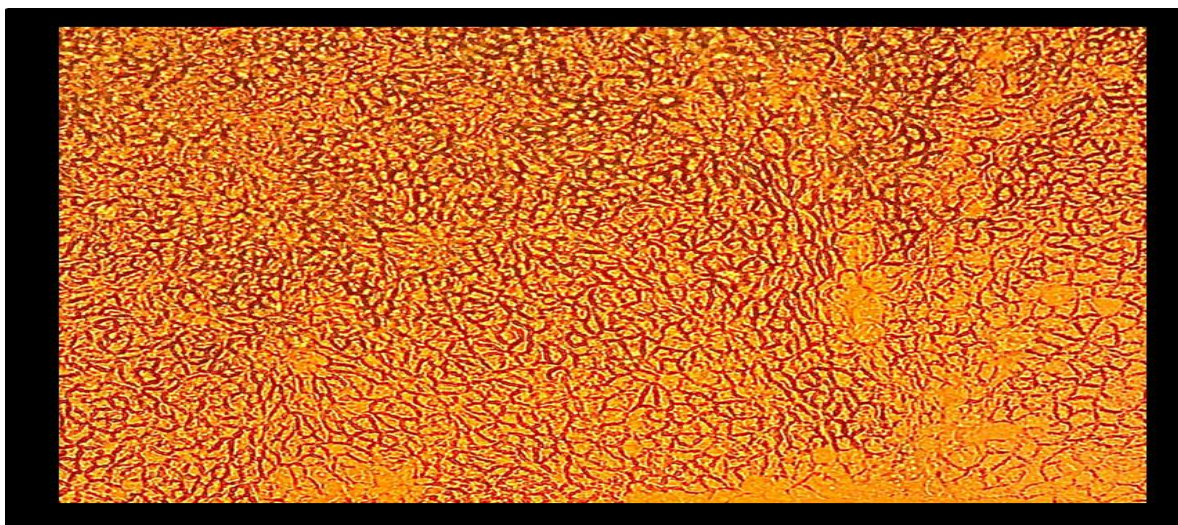
Convencionalmente, as proteínas e peptídeos terapêuticos são administrados por via intravenosa, subcutânea ou intramuscular, pois a sua administração via oral pode resultar em degradação no trato gastrointestinal e consequentemente perda de sua função (Choonara et al., 2014; Schiffter et al., 2011). Por sua vez, a administração via oral possui inúmeras vantagens com relação às demais vias, entre elas, podemos citar a conveniência e o cumprimento do tratamento que implica na eficácia terapêutica da “droga”. As formulações orais também são menos onerosas quanto a sua produção, porque não necessitam produção em extremas condições de esterilidade (Yun et al., 2013), há também a redução do risco de infecções ou

dor associada e não requer administração por profissionais treinados (Srinivasan et al., 2015). Entretanto essa forma de liberação de proteínas e peptídeos é de longe a via mais popular de transporte, o que a torna uma ampla área de pesquisa (Choonara et al., 2014).

Estudos *in vitro* são importantes ferramentas para predição do transporte e potenciais efeitos de um peptídeo, no entanto, eles não podem substituir estudos clínicos *in vivo* (Segura-Campos et al., 2011). Para o desenvolvimento de vias eficazes para o transporte de drogas e estimar sua absorção oral estudos *in vivo* e *in vitro* são extremamente necessários. Dos modelos *in vitro*, a cultura de células Caco-2 está entre os mais usados e bem aceitos como modelo primário de triagem de absorção (Föger et al., 2008; Kauffman et al., 2013).

Para complementar os resultados, além da simulação do transporte de peptídeos por dialisabilidade, usamos também o modelo *in vitro* de cultura de células. As células Caco-2 foram utilizadas para avaliarmos a permeabilidade de cada *pool* de peptídeos <5kDa obtidos por cromatografia de filtração em gel (Sephadex G25). Após 21 dias de cultivo nos *inserts* Transwell® (Figura 9), período no qual normalmente as células adquirem no mínimo 80% de confluência, realizamos a medição da resistência elétrica transepitelial (Millicell ERS®) e encontramos valores que variaram de 370 a 450 ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)⁻¹ (Figura 9), onde a monocamada não apresenta buracos ou formação de aglutinações ao atingir a confluência (Srinivasan et al., 2015; Gamboa e Leong, 2013; Press e Di Grandi, 2008) e diferenciam-se espontaneamente em estrutura/função para enterócitos maduros (Antunes et al., 2013) que são as células responsáveis pela maior parte da absorção de nutrientes e drogas através das vias de transporte paracelular, transcelular ou mediada por transportadores (Balimane e Chong, 2005; Kauffman et al., 2013).

Figura 9: Microscopia da monocamada de células Caco-2 em inserts Transwell®: Foto tirada com microscópio Olympus (400X) após 21 dias de incubação.



As frações peptídicas (1mg/mL) foram diluídas no tampão de transporte e aplicadas na porção apical da monocamada e após 3 horas, a fração apical e basal de cada *pool* de peptídeos foram então coletadas e analisadas por RP-HPLC. Os perfis cromatográficos qualitativos estão representados nas Figuras 10 e 11.

Figura 10: Simulação do transporte e absorção (permeabilidade) em monocamada de células Caco-2, dos diferentes pools de peptídeos (Sephadex G25) do soro de queijo bovino: pool de peptídeos (A, A_{apical} e A_{basal}); pool de peptídeos SM-glioxil-tripsina (B, B_{apical}, B_{basal}); SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (C, C_{apical}, C_{basal}). O perfil foi determinado por RP-HPLC.

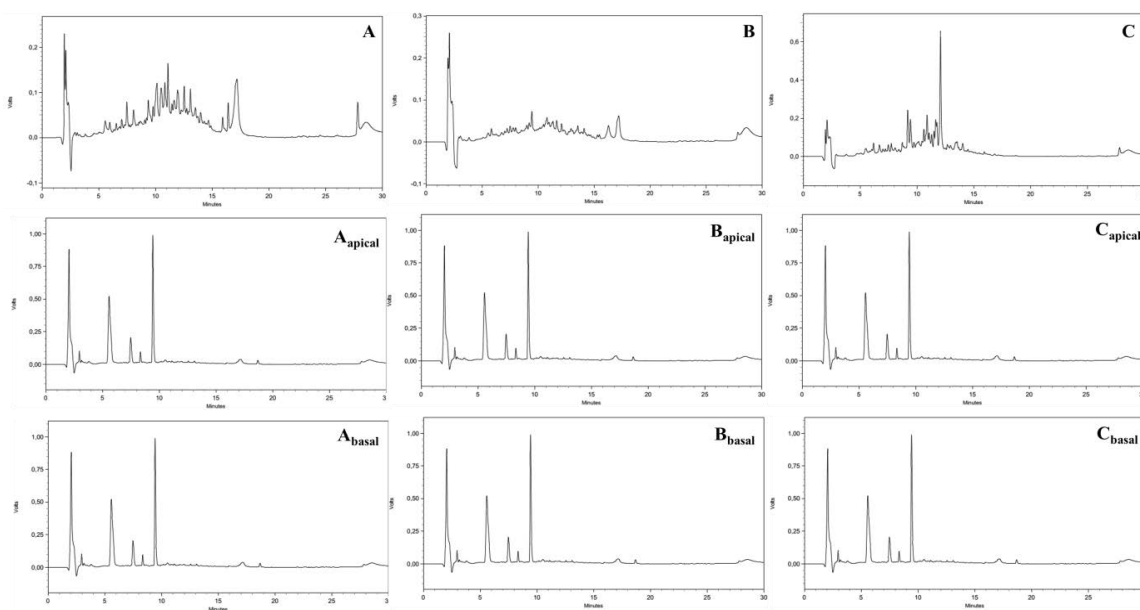
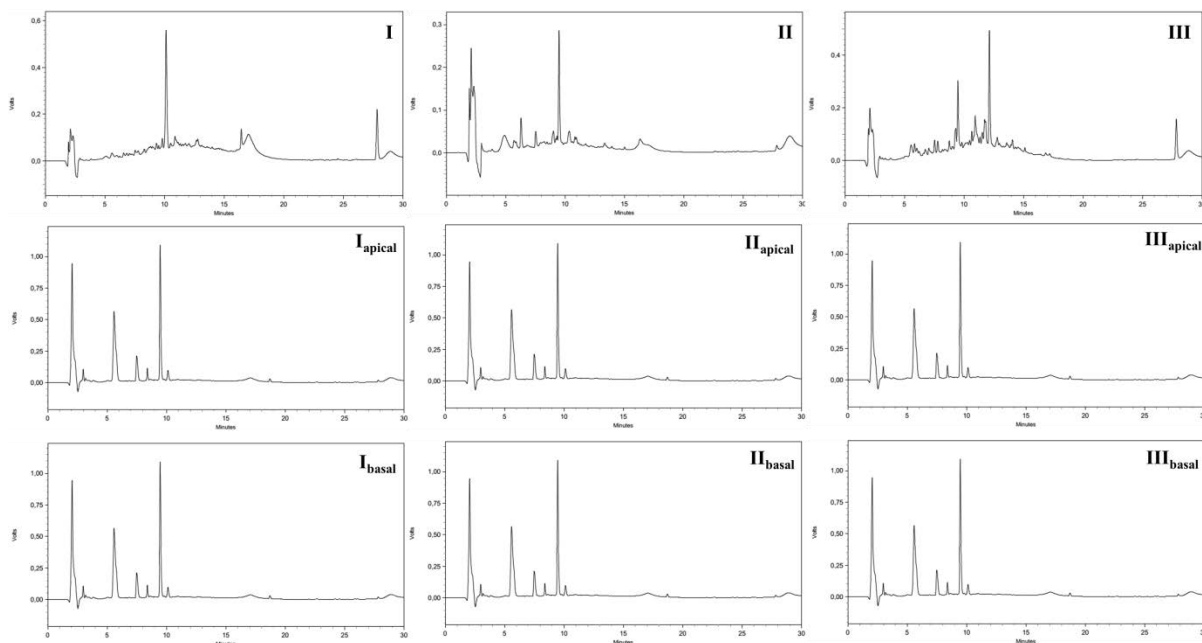
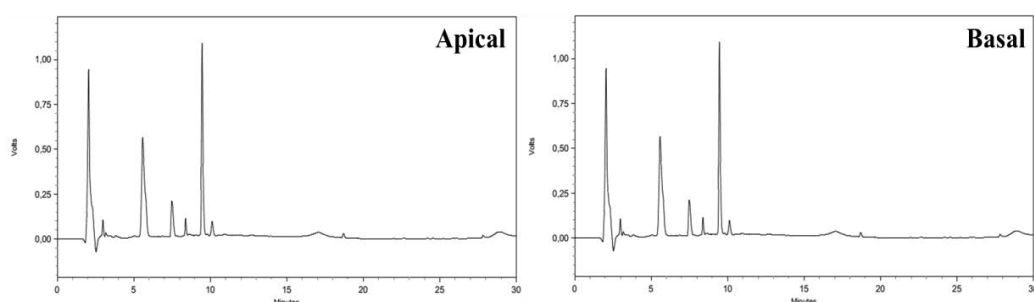


Figura 11: Simulação do transporte e absorção (permeabilidade) em monocamada de células Caco-2, dos diferentes pools de peptídeos (Sephadex G25) do soro de queijo bubalino: pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina (I, I_{apical} e I_{basal}); pool de peptídeos SM-glioxil-tripsina (II, II_{apical} , II_{basal}); pool de peptídeos SM-glutaraldeído-pepsina e SM-glioxil-tripsina (III, III_{apical} , III_{basal}). O perfil foi determinado por RP-HPLC.



Como podemos observar, para todas as frações obtidas de hidrolisados de ambas as espécies (bovina e bubalina) e diferentes condições de hidrólise, não houveram diferenças entre os perfis qualitativos, ou seja, todos os cromatogramas (apical ou basal) apresentaram o mesmo perfil. Devido à semelhança bastante acentuada entre as amostras, analisamos também o tampão de transporte (Figura 12) e verificamos que os picos obtidos são referentes ao tampão e não as amostras avaliadas e essa condição nos fez refletir e buscar possíveis explicações em literatura pertinente.

Figura 12: Análise do tampão de transporte do ensaio de transporte e absorção (permeabilidade) através de monocamada de células Caco-2. O perfil foi determinado por RP-HPLC.



As células Caco-2 ao se diferenciarem formam uma monocamada de células unidas entre si por junções bloqueadoras que podem representar uma barreira física que é capaz de restringir seletivamente a permeação de moléculas maiores pelo transporte paracelular (Segura-Campos et al., 2011) sugerindo que os peptídeos obtidos no presente estudo apresentam massas molares que os impossibilitam de permear pelas junções entre os enterócitos. Outra possibilidade é a ineficiência do transporte via transcelular com auxílio dos transportadores específicos PepT1. Peptídeos e outras moléculas para serem transportados via transcelular são dependentes dos níveis de expressão do PepT1, que por sua vez, é dependente da origem e do número de passagens das células Caco-2 (Behrens et al., 2004). Por último, as células Caco-2 são capazes também de excretar as enzimas presentes na borda em escova da parede intestinal como hidrolases, peptidases de membrana (Press e Di Grandi, 2008; Tanabe, 2012) que podem ter hidrolisado os peptídeos e transportado para o lado basal aminoácidos livres, que por sua vez são facilmente permeados por esse modelo celular, conforme já demonstrado em um trabalho recente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (Goulart et al., 2014).

Com os resultados obtidos observamos que o transporte e absorção de peptídeos com objetivos nutricionais e principalmente terapêuticos é sem dúvida um grande desafio, devido a características inerentes a essas moléculas como elevada massa molar, hidrofilicidade e propensão à degradação por proteases digestivas (Choonara et al., 2014; Gamboa e Leong, 2013; Estudante et al., 2013; Antunes et al., 2013; Yun et al., 2013; Bakhru et al., 2013). No entanto, a relação dessas moléculas com diferentes e importantes funções biológicas faz delas alvos de muitos e contínuos estudos que visam encontrar mecanismos que aumentem sua permeabilidade pela mucosa intestinal. Atualmente o uso de tecnologias farmacêuticas vem sendo utilizadas para minimizar os efeitos fisiológicos negativos sobre a absorção de proteínas e peptídeos, entre elas podemos citar: co-administração de inibidores de proteases, modificação da natureza físico-química da molécula, uso de nanopartículas e lipossomos com transportadores e utilização de potenciadores de permeação, mas mesmo com essas ferramentas alternativas, ainda não existe uma forma de administração via oral que garanta o sucesso da permeação, onde a molécula possa atingir o alvo molecular e desempenhar sua função (Choonara et al., 2014; Segura-Campos et al., 2011; Antunes et al., 2013).

Obs: Todos os *pools* de peptídeos testados não apresentaram citotoxicidade, o que já era esperado, pois o soro de queijo é considerado um produto *GRAS* (*Generally Recognized As*

Safe – Genericamente reconhecido como seguro). A citotoxicidade foi apenas para verificar se o derivado enzimático poderia estar liberando algum resíduo químico utilizado na ativação do pó de sabugo de milho, mesmo após lavagem exaustiva.

4. CONCLUSÃO

A obtenção de hidrolisados parciais do soro de queijo bovino e bubalino utilizando reator de leite empacotado com as proteases pepsina e tripsina imobilizadas em pó de sabugo de milho ativado foi desempenhado com sucesso. O *pool* de peptídeos (<5kDa) obtidos para cada condição de hidrólise foram fortemente influenciados quando submetidos simulação gastrointestinal e dialisabilidade, mostrando perfis cromatográficos qualitativos diferentes com relação ao perfil de cada *pool* obtido por cromatografia de filtração em gel. Com os resultados obtidos através da simulação da absorção em monocamadas de células Caco-2, podemos verificar que a ingestão oral de peptídeos é um grande desafio para a ciência moderna que deve buscar encontrar mecanismos que mantenham essas moléculas viáveis até alcançarem seu alvo biológico sem sofrerem nenhum tipo de influência a nível físico, químico e biológico. Os parâmetros aqui abordados com auxílio dos experimentos *in vitro* nos deram informações valiosas que nos ajudarão a direcionar e aprimorar novos estudos, aprofundando o nível de análise e associando outras técnicas que nos auxiliem a maximizar a absorção dessas moléculas de forma a desempenharem com sucesso sua função nutricional e/ou de saúde.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal Immunological Methods**, v.170, p. 211–224, 1994.

ANTUNES, F.; ANDRADE, F.; FERREIRA, D.; NIELSEN, H.M.; SARMENTO, B. Models to Predict Intestinal Absorption of Therapeutic Peptides and Proteins. **Current Drug Metabolism**, v.14, p.4-20, 2013.

ARGYRI, K.; THEOPHANIDI, E.; KAPNA, A.; STAIKIDOU, C.; POUNIS, G.; KOMAITIS, M.; GEORGIOU, C.; KAPSOKEFALOU, M. Iron or zinc dialyzability obtained from a modified in vitro digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals. **Food Chemistry**, v.127, p. 716 – 721, 2011.

BALDASSO, C.; BARROS, T.C.; TESSARO, I.C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v.278, p.381–386, 2011.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug Discovery Today**, v.10, p.335-343, 2005.

BAKHURU, S.H.; FURTADO, S.; MORELLO, A.P.; MATHIOWITZ, E. Oral delivery of proteins by biodegradable nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p. 811–821, 2013.

BEHRENS, I.; KAMM, W.; DANTZIG, A.H.; KISSEL, T. Variation of Peptide Transporter (PepT1 and HPT1) Expression in Caco-2 Cells as a Function of Cell Origin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.93, p. 1743-1754, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v.73, p.149–161, 2015.

BUENO, L.; CUNHA, S.F.C.; MARCHINI, J.S.; OLIVEIRA, J.E.D. Iron Dialyzability in a Multiple Nutrient Formulation and Effect of the Addition of Separate Nutrients. **Basic Sciences of Medicine**, v. 1, p. 19-22, 2012.

CAO, L. Immobilized Enzymes. In: MOO-YOUNG, M. (Ed). **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Academic Press, 2011. v.2, chap.34, p.461-476.

CARBONELL-CAPELLA, J.M.; BUNIEWSKA, M.; BARBA, F.J.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p. 155-171, 2014.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A.R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v.445–446, p.385–396, 2013.

CHOONARA, B.F.; CHOONARA, Y.E.; KUMAR, P.; BIJUKUMAR, D.; du TOIT, L.C.; PILLAY, V. A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules. **Biotechnology Advances**, v.32, p.1269–1282, 2014.

COURRAUD, J.; BERGER, J.; CRISTOL, J.P.; AVALLONE, S. Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion. **Food Chemistry**, v.136, p. 871–877, 2013.

CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A.J.; MARQUES, D.P.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C.; MONTI, R. Hydrolysis of cheese whey proteins with trypsin, Chymotrypsin and carboxypeptidase A. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.16, p.105-109, 2005.

ESTUDANTE, M.; MORAIS, J.G.; SOVERAL, G.; BENET, L.Z. Intestinal drug transporters: An overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p.1340–1356, 2013.

FERNANDES, P. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. **Enzyme Research**, v.2010, p.1-19, 2010.

FERRUZA, S.; ROSSI, C.; SCARINO, M.L.; SAMBUY, Y. A protocol for in situ enzyme assays to assess the differentiation of human intestinal Caco-2 cells. **Toxicology in Vitro**, v.26, p.1247–1251, 2012.

FÖGER, F.; KOPF, A.; LORETZ, B.; ALBRECHT, K.; BERNKOP-SCHNÜRCH. Correlation of in vitro and in vivo models for the oral absorption of peptide drugs. **Amino Acids**, v. 35, p.233–241, 2008.

GAMBOA, J.M.; LEONG, K.W. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 800–810, 2013.

GARCIA, H.S.; LÓPEZ-HERNANDEZ, A.; HILL, C.G. Enzyme Technology – Dairy Industry Applications. In: In: MOO-YOUNG, M. (Ed). **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Academic Press, 2011. v.4, chap.47, p.567-574.

GOULART, A.J.; BASSAN, J.C.; BARBOSA, O.A.; MARQUES, D.P.; SILVEIRA, C.B.; SANTOS, A.F.; GARRIDO, S.S.; RESENDE, F.A.; CONTIERO, J.; MONTI, R. Transport of amino acids from milk whey by Caco-2 cell monolayer after hydrolytic action of gastrointestinal enzymes. **Food Research International**, v.63, p.62–70, 2014.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E.G.E.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature Protocols**, v.22, p.111–2119, 2007.

HUR, S.J.; LIM, B.O.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v.125, p.1–12, 2011.

KABIL, O.; VITVITSKY, V.; BANERJEE, R. Sulfur as a signaling nutrient through hydrogen sulfide. **Annual Review of Nutrition**, v.34, p.171-205, 2014.

KANANEN, A.; SAVOLAINEN, J.; MÄKINEN, J.; PERTTILÄ, U.; MYLLYKOSKI, L.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. **International Dairy Journal**, v.10, p. 691-697, 2000.

KAUFFMAN, A.L.; GYURDIEVA, A.V.; MABUS, J.R.; FERGUSON, C.; YAN, Z.; HORNBY, P.J. Alternative functional in vitro models of human intestinal epithelia. **Frontiers in Pharmacology**, v.4, p. 1-18, 2013.

KAWAGUCHI, T.; IZUMI, N.; CHARLTON, M.R.; SATA, M. Branched-Chain Amino Acids as Pharmacological Nutrients in Chronic Liver Disease. **Hepatology**, p. 1063-1070, 2011.

- KORHONEN, H.J. Health-promoting proteins and peptides in colostrum and whey. In: MINE, Y.; LI-CHAN, E.; JIANG, B. (Ed). **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**. Iowa:Wiley-Blackwell, 2010.v.1, chap.11, p.151-168.
- KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods** I, p.177-187, 2009.
- KOSSEVA, M.R.; PANESAR, P.S.; KAUR, G.; KENNEDY, J.F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.45, p.437–447, 2009.
- LANGERHOLC, T.; MARAGKOUidakis, P.A.; WOLLGAST, J.; GRADISNIK, L.; CENCIC, A. Novel and established intestinal cell line models-An indispensable tool in food science and nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. S11-S20, 2011.
- LAYMAN, D.K.; WALKER, D.A. Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. **Journal of Nutrition**, v.136, p.319S-323S, 2006.
- LEEB, E.; GÖTZ, A.; LETZEL, T.; CHEISON, S.C.; KULOZIK, U. Influence of denaturation and aggregation of b-lactoglobulin on its tryptic hydrolysis and the release of functional peptides. **Food Chemistry**, v.187, p.545–554, 2015.
- LIRA, H. L.; SILVA, M.C.D.; VASCONCELOS, M.R.S.; LIRA, E.L.; LOPEZ, A.M.Q. Microfiltração do soro de queijo de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2009.
- LU, S.C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, p.3143–3153, 2013.
- LUTEN, J.; CREWS, H.; FLYNN, A.; VAN DAEL, P.; KASTENMAYER, P.; HURRELL, R.; DEELSTRA, H.; SHEN, L.H.; FAIRWEATHER-TAIT, S.; HICKSON, K.; FARRÉ, R.; SCHLEMMER, U.; FROHLICH, W. Interlaboratory Trial on the Determination of the In Vitro Iron Dialysability from Food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.72, p. 415-424, 1996.
- LYNCH, C.J.; ADAMS, S.H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. **Nature Reviews**, v.10, p.723-736, 2014.
- McPHIE, P. **Methods in Enzymology**, v.16, p. 23-32, 1971.
- MELLINGER-SILVA, C.; ROSA, L.O.L.; STEPHAN, M.P.; BRÍGIDA, A.I.S.; CABRAL, L.M.C.; SILVA, G.O.; GUARIDO, K.L.; GOMES, D.M.; SILVA-SANTOS, J.E. Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate. **International Dairy Journal**, v.48, p.73-79, 2015.
- MILLER, D.D.; SCHRICKER, B.R.; RASMUSSEN, R.R.; VAN CAMPEN, D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.34, p. 2248-2256, 1981.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C.; SILVA, M.R.; SILVA, V. D.M.; BATISTA, M.A.; SIMÕES e SILVA, A.C.; SILVEIRA, J.N. Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate: effect of enzyme type and enzyme: substrate ratio on peptide profile. **Journal Food Science and Technology**, v.52, p.201–210, 2015.

MOTA, M.V.T.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O; OLIVEIRA, M.B.P.; ROCHA, C.; TEIXEIRA, J.A.; TORRES, D.; GONÇALVES, M.P. Trypsin hydrolysis of whey protein concentrates: Characterization using multivariate data analysis. **Food Chemistry**, v.94, p. 278–286, 2006.

NATOLI, M.; LEONI, B.D.; D'AGNANO, I.; ZUCCO, F.; FELSANI, A. Good Caco-2 cell culture practices. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p.1243–1246, 2012.

NG, T.B.; CHEUNG, R.C.F.; WONG, J.H.; WANG, Y.; IP, D.T.M.; WAN, D.C.C.; XIA, J. Antiviral activities of whey proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, p.6997–7008, 2015.

O'KEEFFE, M.B.; FITZGERALD, R.J. Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells. **International Dairy Journal**, v.36, p.128-135, 2014.

PRAZERES, A.R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v.110, p.48-68, 2012.

PRESS, B.; Di GRANDI, D. Permeability for Intestinal Absorption: Caco-2 Assay and Related Issues. **Current Drug Metabolism**, v.9, p.893-900, 2008.

ROIG, M.J.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; LAGARDA, M.J. Calcium dialysability as an estimation of bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas. **Food Chemistry**, v. 64, p. 403-409, 1999.

ROMÁN, A.; WANG, J.; CSANÁDI, J.; HODÚR, C.; VATAI, G. Experimental investigation of the sweet whey concentration by nanofiltration. **Food Bioprocess Technology**, v.4, p. 702 – 709, 2011.

SANDBERG, A.S. Methods and Options for in vitro Dialyzability; Benefits and Limitations. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.75, p. 395–404, 2005.

SCHIFFTER, H.A. The delivery of drugs—peptides and proteins. In: MOO-YOUNG, M. (Ed). **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Academic Press, 2011. v.5, chap.46, p.581-602.

SEGURA-CAMPOS, M.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D.; HERNANDEZ-ESCALANTE, V.M. Bioavailability of Bioactive Peptides. **Food Reviews International**, v.27, p. 213-226, 2011.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v.101, p.1484–1491, 2007.

SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins-From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, v.18, p. 695– 704, 2008.

SMITHERS, G.W. Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 2-14, 2015.

SRINIVASAN, B.; KOLLI, A.R.; ESCH, M.B.; ABACI, H.E.; SHULER, M.L.; HICKMAN, J.J. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. **Journal of Laboratory Automation**, v.20, p.107–126, 2015.

TANABE, S. Short Peptide Modules for Enhancing Intestinal Barrier Function. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, p. 776-781, 2012.

VAN-CAMPEN, D.R.; GLAHN, R.P. Micronutrient bioavailability techniques:Accuracy, problems and limitations. **Field Crops Research**, v.60, p.93-113, 1999.

YADAV, J.S.S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, SURAMPALLI, R.Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides, **Biotechnology Advances**, 2015. IN PRESS.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>

YALÇIN, A.S. Emerging Therapeutic Potential of Whey Proteins and Peptides. **Current Pharmaceutical Design**, v.12, p.1637-1643, 2006.

YUN, Y.; CHO, Y.W.; PARK, K. Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p.822–832, 2013.

ZHANG, C.; XING, X.H. Enzyme Bioreactors. In: MOO-YOUNG, M. (Ed). **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Academic Press, 2011. v.2, chap.23, p.319-329.