

FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DE ERVILHA E DO SORO DE LEITE: EFEITO EM SUAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E TECNO-FUNCIONAIS

Palavras-Chave: FOSFATO, PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE, PROTEÍNA DE ERVILHA

Autores:

Henrique de Carvalho Gardelli, FEA – UNICAMP
Álvaro Gustavo Ferreira da Silva, FEA – UNICAMP
Prof. Dr. Guilherme M. Tavares, FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO

As proteínas são macronutrientes fundamentais para a nutrição humana e para o processamento de alimentos, contribuindo para a textura, cor e sabor de produtos formulados (Loveday, 2019). No entanto, a origem (animal ou vegetal) e as condições de produção e pós-produção podem originar ingredientes proteicos com aspectos estruturais e tecno-funcionais insatisfatórios. Nesse contexto, a fosforilação é uma técnica de modificação que promove a incorporação de um grupo fosfato na estrutura proteica, potencialmente aumentando sua camada de hidratação e sua eletronegatividade. A modulação desses parâmetros pode ser útil para o aprimoramento das características estruturais e tecno-funcionais de proteínas. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi modificar as proteínas de isolado proteico do soro do leite (WPI) e isolado proteico de ervilha (PPI) por meio de fosforilação química seguindo dois métodos distintos: aquecimento por via úmida e por via seca.

METODOLOGIA

Fosforilação química

A fosforilação por aquecimento úmido foi realizada conforme Liu et al. (2019), com modificações. Resumidamente, dispersões a 2% de proteína e 4% de STP em pH 9 foram agitadas por 4 h a 60 °C sob agitação constante em banho termostático. As dispersões foram então resfriadas até temperatura ambiente, neutralizadas (pH 7) com HCl 1M, dialisadas (membrana de poro de 12 kDa) contra água ultrapura a 5 °C por 72h, liofilizadas e armazenadas a -80 °C. A fosforilação por aquecimento a seco foi realizada conforme Li et al. (2005), com modificações. Resumidamente, dispersões a 2% de proteína e 4% de STP em pH 9 foram agitadas por 1 h à temperatura ambiente, neutralizadas (pH 7), liofilizadas e incubadas a 85 °C/5 dias. Os pós obtidos foram ressuspensos em água destilada, e a solução resultante foi dialisada, liofilizada e armazenada a -80 °C. Adicionalmente, os tratamentos de fosforilação foram realizados também em amostras de proteínas previamente glicadas com maltose via reação de Maillard, conforme Li et al. (2005). O teor de proteína nas amostras finais foi determinado pelo método de Kjeldhal (AOAC, 2006; método 991.20) para fins de padronização nas análises posteriores, adotando os fatores de conversão de 6,38 e 6,25 para WPI e PPI, respectivamente.

Teor de Fósforo

O teor de fósforo nas amostras finais foi determinado em triplicata, seguindo o método colorimétrico utilizando molibdo vanadato amarelo (AOAC, 2006; método 986.24).

Hidrofobicidade superficial

A hidrofobicidade superficial foi avaliada conforme descrito por Karaca et al. (2011): 2 mL de dispersões proteicas (0,0025 a 0,01% m/v), preparadas em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7), foram misturadas com 10 µL de sonda fluorescente ANS 8 mM, agitadas por 10 s e deixadas em repouso ao abrigo

da luz por 15 min. A intensidade de fluorescência extrínseca foi então medida em comprimento de onda de excitação de 390 nm e emissão de 360 e 395 nm para PPI e WPI, respectivamente. Controles contendo apenas proteína + tampão, e ANS + tampão também foram realizados. As análises foram realizadas em triplicata.

Grupos sulfidrila livres totais

O conteúdo de grupos -SH livres totais foi determinado conforme descrito por Cheng et al. (2022), com adaptações. Foram misturados 0,1 mL de dispersão proteica (10 mg/mL de proteína), 0,4 mL de tampão Tris-Glicina (86 mM Tris, 90 mM glicina, 4 mM EDTA, 8 mM ureia, pH 8) e 5 µL de reagente de Ellman (2 mM DTNB, 50 mM de acetato de sódio), seguido de incubação por 20 min e centrifugação (5000 x g, 10 min, 25 °C). Uma alíquota de 300 µL do sobrenadante foi retirada e a absorbância determinada a 412 nm em leitor de microplaca. A análise foi realizada em triplicata.

Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O perfil de proteínas foi avaliado sob condições redutoras (utilizado β-mercaptoetanol), conforme método de Laemmli (1970). Brevemente, 0,5 mL de dispersão proteica (20 mg/mL) foram misturados com tampão de amostra na proporção 1:2 (amostra:tampão) e aplicados em gel de poliacrilamida 14%. A separação foi realizada em um sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) a 120 V. Os géis foram corados em corante Coomassie Brilliant Blue e o marcador utilizado foi o Precision Plus Protein (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), que contém bandas de 10 a 250 kDa.

Propriedades emulsificantes

A atividade emulsificante foi determinada conforme Ghribi et al. (2015). Foram misturados 0,5 mL de óleo de soja em 4,5 mL de dispersão proteica (0,5 % de proteína na mistura final), seguido de agitação em UltraTurrax (9000 rpm por 4 min). Uma alíquota de 50 µL da emulsão foi retirada imediatamente após a agitação, diluída em 7,5 mL de tampão fosfato 10 mM contendo 0,1% de SDS, agitada em vórtex por 10 s e a absorbância determinada em 500 nm. A análise foi feita em triplicata. Adicionalmente, alíquotas da fração creme separada após 10 min foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incorporação de fósforo às proteínas foi mais intensa nas amostras de PPI. Além disso, o método que mais incorporou fósforo às proteínas, tanto nas proteínas do WPI como nas proteínas do PPI, foi a fosforilação por via úmida. A glicação com maltose via reação de Maillard prejudicou a incorporação de fósforo às proteínas (Figura 1).

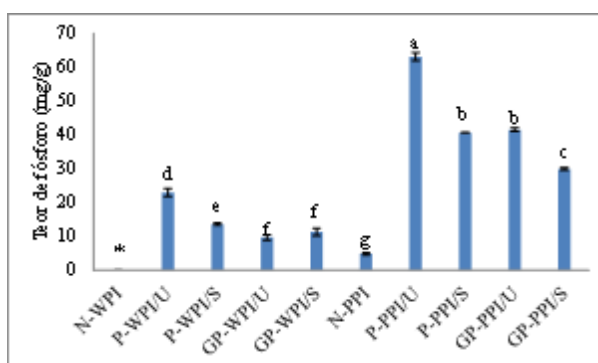


Figura 1. Teor de Fósforo nas amostras de WPI e PPI.

Os dados de hidrofobicidade superficial estão apresentados na Figura 2. Globalmente, um claro aumento da hidrofobicidade com o aumento do teor de fósforo incorporado às amostras de WPI pôde ser observado. Provavelmente, o aumento na repulsão eletrostática promovido pelo fosfato incorporado atuou expondo um maior número de grupos hidrofóbicos anteriormente escondidos no interior da estrutura proteica (Han et al., 2024). A fosforilação não promoveu alteração significativa no índice de hidrofobicidade das amostras de PPI. Adicionalmente, observa-se uma redução da hidrofobicidade nas amostras glicadas, provavelmente devido à incorporação de grupos hidrofílicos durante a reação.

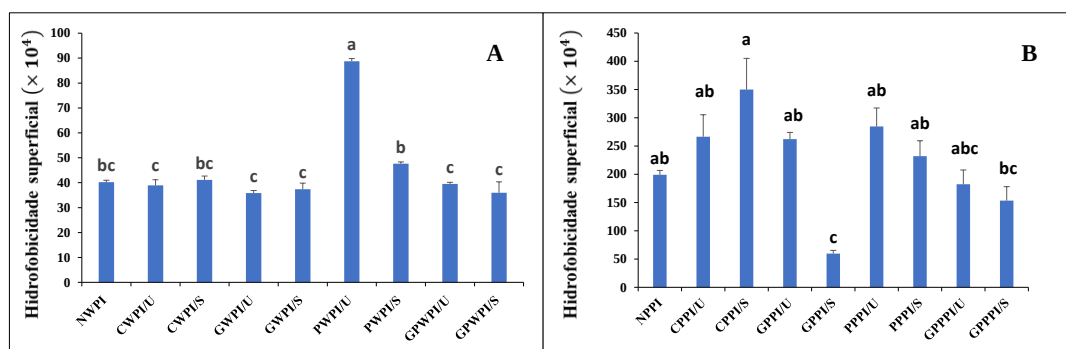


Figura 2. Hidrofobicidade superficial das amostras de WPI (A) e PPI (B)

O teor de grupos sulfidril livres estão apresentados na Figura 3. Para as amostras de WPI (Figura 3A), fica evidente a baixa disponibilidade de grupos sulfidril em amostras tratadas por via úmida em relação às tratadas por via seca. Isso ocorre devido à reatividade dos grupos sulfidril livres, que é muito mais intensa em meio líquido e promove maior formação de agregados estabilizados por ligações dissulfeto, o que explica a baixa disponibilidade de grupos sulfidril livres. Nas amostras de PPI (Figura 3B) esse comportamento foi menos óbvio, mas foi possível observar que o tratamento térmico diminuiu a concentração de grupos $-SH$ livres. Além disso, as amostras com fósforo apresentaram maior concentração de grupos sulfidril livres em comparação àquelas apenas glicadas.

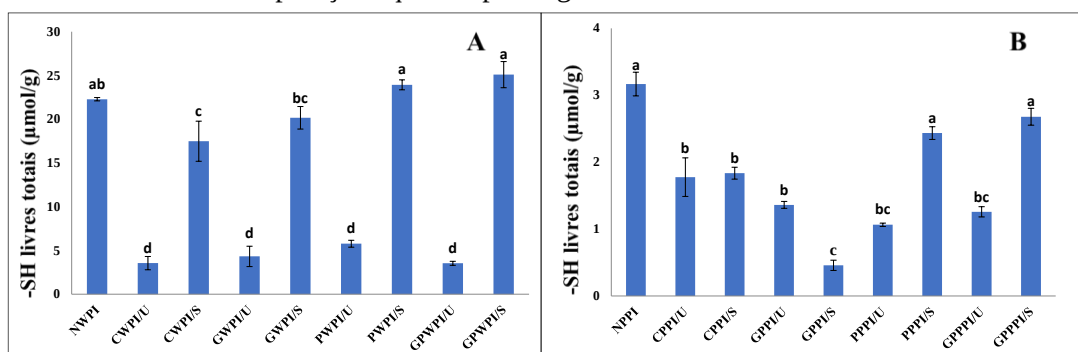


Figura 3. Teor de grupos sulfidril livres em amostras de WPI (A) e PPI (B)

O perfil das proteínas obtido por SDS-PAGE está apresentado na Figura 4. Foi possível observar um claro aumento na massa molecular das proteínas de WPI com a glicação, resultado da formação de pequenos agregados proteína-maltose durante a reação de Maillard. Para as amostras de PPI, a glicação promoveu uma diminuição substancial de bandas referentes às proteínas de massa molecular < 20 kDa. Esse resultado pode estar associado a incorporação dessas proteínas a outros agregados, sem o envolvimento de ligações dissulfeto, formando agregados grandes o suficiente para não entrarem nos géis, como reportado por Zha et al. (2019). Por outro lado, a fosforilação não promoveu nenhuma alteração perceptível nos perfis observados.

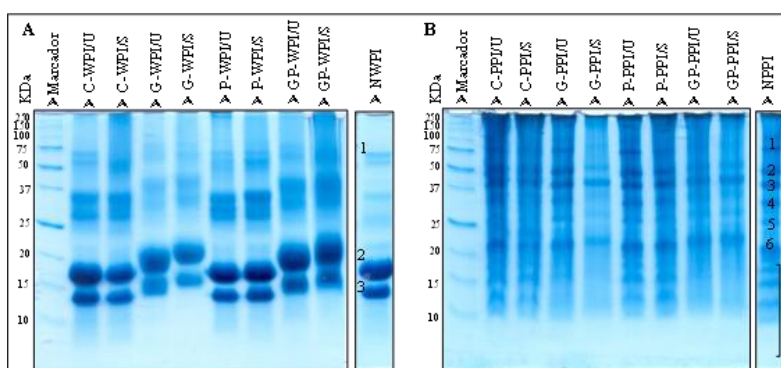


Figura 4. Perfil das proteínas de WPI (A) e PPI (B) obtidas por SDS-PAGE. Em A, 1 =albumina sérica bovina, 2 = betalactoglobulina, 3 = alfa lactoglobulina. Em B, 1 = subunidade convicilina (~ 70 kDa); 2 = subunidade vicilina (~ 50 kDa); 3 = legumina α (~ 38 a 40 kDa); 4 = subunidade vicilina (~ 32 - 35 kDa); 5 = legumina β (~ 25 kDa); 6 = subunidade vicilina (~ 20 - 22 kDa);] = albuminas e/ou peptídeos (< 20 kDa).

A atividade emulsificante (EAI) está apresentada na Figura 5. Em um panorama geral, para WPI, os tratamentos aumentaram o EAI, com destaque para a fosforilação por via seca. Já para a PPI, o efeito dos tratamentos foi pouco relevante.

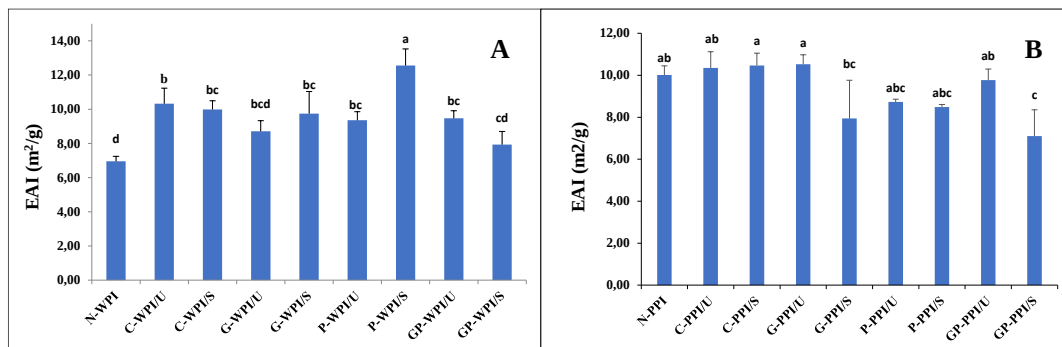


Figura 5. Índice de atividade emulsificante (EAI) de amostras das WPI (A) e PPI (B)

As frações creme coletadas das emulsões após 10 min do seu preparo foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 6). O perfil eletroforético obtido mostra que os efeitos de glicação na β -lactoglobulina e na α -lactoalbumina (Figura 6A) prejudicaram a participação dessas proteínas na estabilização das emulsões, o que é aferido pela menor intensidade das bandas. Para a PPI (Figura 6B), o efeito da glicação foi pouco evidente na corrida de eletroforese, e não houve diferença aparente entre os tratamentos e a proteína nativa na fração creme das emulsões.

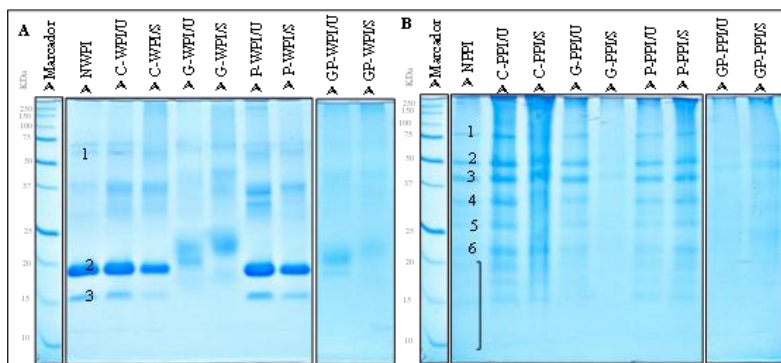


Figura 6. Perfil das proteínas de WPI (A) e PPI (B) obtidas por SDS-PAGE. Em A, 1 =albumina sérica bovina, 2 = β -lactoglobulina, 3 = α -lactoalbumina. Em B, 1 = subunidade convicilina (~70 kDa); 2 = subunidade vicilina (~50 kDa); 3 = legumina α (~38 a 40 kDa); 4 = subunidade vicilina (~32-35 kDa); 5 = legumina β (~25kDa); 6 = subunidade vicilina (~ 20-22 kDa);] = albuminas e/ou peptídeos menores (<20 kDa).

CONCLUSÕES

Neste estudo, foi possível observar que os diferentes métodos de modificação química influenciaram de maneira distinta as propriedades estruturais e funcionais das proteínas do WPI e do PPI. A fosforilação por via úmida foi o método que promoveu maior incorporação de fósforo, especialmente nas amostras de PPI. A fosforilação por via úmida também promoveu o aumento da hidrofobicidade e formação de ligações dissulfeto no WPI, o que pode impactar negativamente a tecno-funcionalidade de sistemas coloidais. Por outro lado, a fosforilação por via seca, ainda que com menor grau de incorporação de fósforo, contribuiu para a melhora da atividade emulsificante das proteínas do WPI. Além disso, a glicação com maltose induzida via reação de Maillard não elevou o grau de fosforilação em ambas as proteínas e limitou a atuação da β -lactoglobulina e α -lactoalbumina do WPI na estabilização de emulsões. Esses resultados indicam que a escolha do tipo de modificação química é determinante para direcionar as funcionalidades tecnológicas das proteínas.

REFERÊNCIAS

AOAC. (2006). Official Methods of Analysis of AOAC International (18th ed.). Association of Official Analytical Chemists.

CHENG, Jingjing et al. Structural characteristics of pea protein isolate (PPI) modified by high-pressure homogenization and its relation to the packaging properties of PPI edible film. *Food Chemistry*, v. 388, p. 132974, 15 set. 2022.

COSTA-SANTOS, Augusto César et al. Characterization and estimation of the bioaccessibility of essential elements in organic milk by INFOGEST protocol. *Food Chemistry*, v. 433, p. 137327, 1 fev. 2024.

HAN, Lu et al. Changes in the structure and functional properties of soybean isolate protein: Effects of different modification methods. *Food Chemistry*, v. 432, p. 137214, 30 jan. 2024.

KARACA, A. C.; LOW, N.; NICKERSON, M. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, v. 44, n. 9, p. 2742–2750, nov. 2011.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.15, p. 685-689, 1970.

LI, C. P. et al. Improvement of Functional Properties of Whey Protein Isolate Through Glycation and Phosphorylation by Dry Heating. *Journal of Dairy Science*, v. 88, n. 12, p. 4137–4145, dez. 2005.

LIU, Y. et al. Functional properties and structural characteristics of phosphorylated pea protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 55, n. 5, p. 2002–2010, 30 maio 2019.

LOVEDAY, Simon. Food Proteins: Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 10, jul. 2019.

MOKNI GHRIBI, Abir et al. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food Chemistry*, v. 187, p. 322–330, 15 nov. 2015.

SANTIAGO, L. A.; FADEL, O. M.; TAVARES, G. M. How does the thermal-aggregation behavior of black cricket protein isolate affect its foaming and gelling properties? *Food Hydrocolloids*, v. 110, p. 106169, jan. 2021.

ZHA F, YANG Z, RAO J, CHEN B. Gum Arabic-Mediated Synthesis of Glyco-pea Protein Hydrolysate via Maillard Reaction Improves Solubility, Flavor Profile, and Functionality of Plant Protein. *J Agric Food Chem*. 1 dez. 2021.