

São Carlos, SP / Janeiro 2025

Recomendações para extração de zeínas a partir do resíduo da produção do amido de milho

Bruna Carolina Dorm¹, Lucimara Aparecida Forato²¹Bióloga, Dra., Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP²Pesquisadora, Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP

Introdução

As zeínas são as proteínas de reserva do milho e correspondem a aproximadamente 50% das proteínas totais do endosperma deste cereal. Essas proteínas são ricas em prolina e glutamina sendo insolúveis em água. As zeínas totais, extraídas com álcool e agente redutor de ligações de dissulfeto, apresentam seis frações com massas relativas distintas no gel de eletroforese contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE). As mais abundantes são as zeínas α , que representam de 75 a 85% da zeínas totais e apresentam bandas em 19 e 22 kDa na SDS/PAGE. As zeínas β apresentam bandas em 14 e 16 kDa e representam de 10 a 15% das zeínas totais. As zeínas γ apresentam banda em 28 kDa representando de 5 a 10% das zeínas totais, e as zeínas δ que apresentam banda em 10 kDa são dificilmente observadas por representar traços das zeínas totais. As zeínas α podem ser extraídas com soluções de etanol 70%, no entanto para se extrair as frações β , γ , e δ é necessária a utilização de agentes redutores de ligações de dissulfeto (Larkins et al., 1984; Forato et al., 2003).

Como as zeínas têm baixo teor ou não apresentam aminoácidos essenciais como lisina e triptofano, elas têm sua utilização limitada no que diz respeito a aplicações nutricionais. No entanto, devido ao seu carácter hidrofóbico e capacidade de formação filmogênica, as zeínas têm sido estudadas para aplicações em coberturas de alimentos e medicamentos, revestimento de papel entre outros (Forato et al., 2000; Scramin et al., 2011; Hamdani et al., 2023).

A extração das zeínas pode ser feita a partir dos grãos de milho, no entanto, apenas 10% de sua massa seca é composta por proteínas totais, sendo que as zeínas correspondem a 50% desse conteúdo. Além disso, para se realizar a extração das zeínas, a partir dos grãos de milho, é necessário primeiramente realizar a remoção das albuminas e globulinas em solução salina e, somente então, pode ser feita a extração das zeínas geralmente utilizando-se etanol 70%.

Alternativamente, uma fonte abundante de zeínas é o glúten de milho (GM). O GM é um subproduto produzido na moagem úmida processo de obtenção do amido de milho e contém de 60 a 70% de zeínas (Forato et al., 2003; Anderson, Lamsal, 2011).

Assim, neste comunicado técnico é descrita a metodologia de extração das zeínas a partir do glúten de milho, bem como sua caracterização por SDS/PAGE e análise pela espectroscopia no infravermelho.

Materiais e Métodos

Extração das zeínas do GM (ZGM)

O GM foi fornecido pela empresa Ingredion (Mogi Guaçu-SP). A extração das zeínas a partir do GM foi feita de acordo com uma modificação da metodologia já dominada pelo grupo (Forato et al., 2003; Scramin et al., 2011). Inicialmente os lipídeos do GM foram extraídos com clorofórmio, sob em agitação mecânica em uma capela de exaustão por 1 h. Após a agitação, a solução foi filtrada a vácuo e a

massa residual foi coletada, repetindo-se o processo de agitação em clorofórmio por mais duas vezes. Em seguida, a massa residual foi agitada durante 6 h em solução de bissulfito de sódio 100 mmol/L. A mistura foi filtrada, e a massa residual, lavada com água destilada. A massa residual foi agitada em solução aquosa de etanol a 70% (m/m), na proporção de um volume de amostra para 5 volumes de solução para a solubilização das zeínas. O etanol foi evaporado por evaporação rotativa, e as proteínas, precipitadas e liofilizadas.

Eletrforese (SDS/PAGE)

Utilizou-se gel de poliacrilamida a 15%, as ZGM (5 mg/mL) foram dissolvidas em etanol 70%. Aplicou-se 3 μ L das amostras em cada poço e o gel foi corado com Comassie Blue. O padrão de massa molecular utilizado foi o BenchMark Protein Ladder Cat. N^o. 10747-012 da marca Invitrogen.

FTIR

Tanto o GM quanto as ZGM foram analisados pela espectroscopia na região do infravermelho (espectrômetro modelo Vertex 70 – Bruker) para verificar-se a eficácia da remoção do amido no processo de extração (Forato et. al, 2003), e, para o cálculo das estruturas secundárias (ES) das ZGM. As amostras foram preparadas sob forma de pastilhas de KBr (1mg de proteína e 100mg de KBr). Foram utilizados 16 scans e 4 cm^{-1} de resolução. O cálculo das ES foi feito por meio de um software de reconhecimento de padrões desenvolvido pelo grupo (Forato et al., 1998). Para isto a linha de base dos espectros foi corrigida entre 2100 a 900 cm^{-1} , normalizados de 1200 a 800 cm^{-1} , e a região de 1800 a 1600 cm^{-1} (amida I) foi multiplicada por uma matriz de calibração. O resultado foi dado como % de α -hélice, % de folhas β , % de voltas e % de outras estruturas.

Resultados

Análise das zeínas por SDS-PAGE

Na Figura 1 é apresentada a SDS/PAGE utilizada na caracterização das ZGM. No poço 1 foram aplicadas as amostras padrão com 35, 25 e 14 kDa. No poço 2 foram aplicadas as zeínas obtidas do GM. Observa-se no gel bandas típicas de zeínas α em 19 e 22 kDa, bem como banda de menor intensidade em 14 kDa devido às zeínas β presentes no GM.

Na Figura 2 são apresentados os espectros de para CGM (preto) e ZGM (vermelho). Em ambos os espectros são observadas bandas típicas de proteínas: Amida A (estiramento N-H) de 3100 a 3300 cm^{-1} ; Amida I em 1650 cm^{-1} , que é devido a 80% do estiramento de C=O com menores contribuições de estiramento C-N e N-H no plano; Amida II em 1550 cm^{-1} (estiramento C-N e

dobramento N-H) (Lavialle et al., 1982). No espectro do GM também é observada a presença de sinais de 1115 a 1020 cm^{-1} os quais são atribuídos aos polissacarídeos (Forato et al., 2003) os quais estão ausentes no espectro das ZGM indicando que a metodologia de extração dos polissacarídeos com solução de bissulfito de sódio foi bem sucedida.

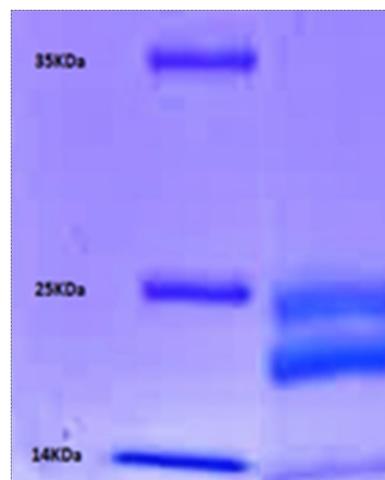


Figura 1. SDS-PAGE das ZGM. No poço 1 foram aplicadas amostras de proteínas padrão, no poço 2 as ZGM.

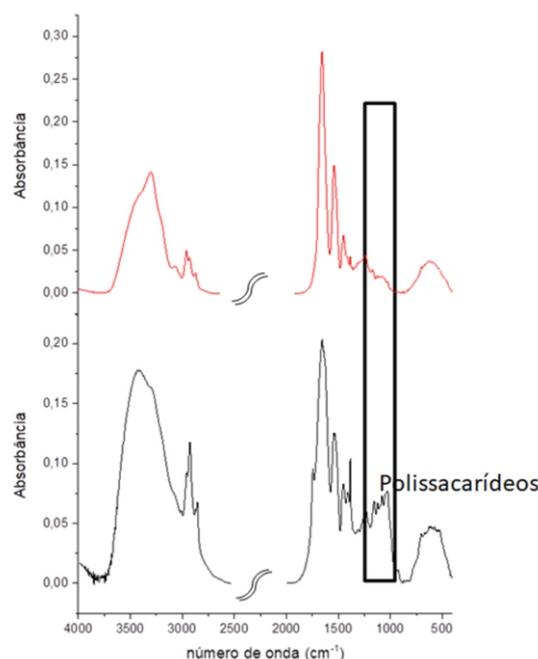


Figura 2. Espectros de FTIR para as amostras de GM (preto) e ZGM (vermelho)

Análise das estruturas secundárias (ES) das zeínas por FTIR.

Também foram calculadas as ES das ZGM usando um método de reconhecimento de padrões já publicado (Forato et al., 1998). Este método utiliza a região amida I (1800-1600 cm^{-1}) do espectro FTIR e é baseado na decomposição de valores

singulares. O método possui uma matriz de calibração que correlaciona uma matriz FTIR de proteínas contendo ES já determinadas com raios X. Esta matriz de correlação é multiplicada pelo espectro FTIR (região amida I) da proteína que será analisada. Aqui para as ZGM obteve-se 37% de α -hélice; 34% de folhas β ; 33% de voltas e 11% de outras estruturas. Este resultado está de acordo com o resultado da SDS/PAGE (Figura 1), onde além das frações de α zeínas que são principalmente helicoidais temos a presença de β zeína que tem predominância de estruturas de folha β . Como as bandas mais intensas são devidas à fração das α zeínas, a proporção helicoidal é maior que as da folha β (Forato et. al., 2003).

Conclusão

A partir dos espectros de FTIR concluiu-se que a utilização da solução de bissulfito de sódio foi eficaz para a remoção dos polissacarídeos presentes no GM e permitindo a extração das zeínas sem a presença destes componentes.

Referências

- ANDERSON, T.J., LAMSAL, B.P. Zein extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and modifications for various applications: A Review. **Cereal Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 159-173, 2011.
- FORATO, L. A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, v. 259, n.1, p. 136-141, 1998.
- FORATO, L. A.; COLNAGO, L.A.; GARRATT, R. C.; LOPES, M. A. Identification of free fatty acids in maize protein bodies and purified alpha zeins by ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 106-114, 2000.
- FORATO, L. A.; BICUDO, T. C.; COLNAGO, L. A. Conformation of the alpha zeins in solid state by Fourier Transform IR. **Biopolymers**, v. 72, p. 421-426, 2003.
- HAMDANI, S.S., SHAMILA, S., LI, ZHAO, ROLLAND, E., MOHIUDDIN, M., RABNAWAZ, M. Barrier and mechanical properties of biodegradable paper bilayer-coated with plasticized starch and zein. **Journal Applied Polymers Science**, v. 140, e53440, 2023.
- LARKINS, B.A., PEDERSEN, K., MARKS, M.D., WILSON, D.R. The zein proteins of maize endosperm. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 9, n.7, p. 306-308, 1984.
- LAVIALLE, F., ADAMS, R. G. AND LEVIN, I. W. Infrared spectroscopic study of the secondary structure of melittin in water, 2-chloroethanol and phospholipid bilayer dispersions. **Biochemistry**, v. 21, p. 2305–2312, 1982.
- SCRAMIN, J.A., DE BRITTO, D., FORATO, L.A., BERNARDES FILHO, R., COLNAGO, L.A., ASSIS, O.B.G. Characterisation of zein–oleic acid films and applications in fruit Coating. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 2145–2152, 2011.

Embrapa Instrumentação

Embrapa Instrumentação
Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 São Carlos, SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
www.embrapa.br/instrumentacao
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Daniel Souza Corrêa*

Membros: *Elaine Cristina Paris, Maria Alice Martins, Cristiane Sanchez Farinas, Cinthia Cabral da Costa, Carlos Renato Marmo, Paulo Renato Orlandi Lasso, Maria do Socorro Gonçalves Souza Monzane*

Comunicado Técnico 126

ISSN 1517-4786
Janeiro, 2025

Projeto gráfico: *Leandro Sousa Fazio*

Diagramação: *Valentim Monzane*

Publicação digital: PDF



Ministério da
Agricultura e Pecuária

Todos os direitos reservados à Embrapa.