

Novo Método de Extração de Zeína utilizando Agente Redutor Não Tóxico
Rita de Cássia Oliveira Sant' Ana¹, Maria Cristina Dias Paes², Natália Alves Barbosa³,
Christiano Vieira Pires⁴, Maria Goreti de Almeida Oliveira⁵

^{1,5}Dep. De Bioquímica e Biologia, UFV, Viçosa, MG, ritasant_ana@yahoo.com.br;

²Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, mcdpaes@cnpms.embrapa.br;

³Departamento Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras – UFLA, nataliaalvesb@yahoo.com.br; ⁴Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus de Sete Lagoas, christiano@ufsj.edu.br

RESUMO – Zeínas são proteínas de reserva do grão de milho, solúvel em solução alcoólica que representam mais de 50% das proteínas totais do grão. Sua extração comercial é feita a partir do glúten de milho, um subproduto do processamento da moagem via úmida utilizada na fabricação do amido de milho. Quatro tipos de zeínas, •, •, • e •, já foram identificadas, sendo essas distintas na sequência de aminoácidos, solubilidade, ponto isoelétrico e composição polipeptídica. Solução aquosa de álcool é utilizada para extrair •-zeína diretamente de grãos moídos de milho ao passo que a extração das demais frações requer a presença de agente redutor na solução. Isso limita o uso direto de filmes e coberturas de zeínas nos alimentos. Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um novo procedimento para isolamento de zeína a partir de grãos moídos de milho utilizando um agente redutor não tóxico. Quatro métodos diferentes de isolamento foram testados, três já publicados na literatura e um novo método com o agente redutor não tóxico. A caracterização das frações de proteína extraídas foi realizada por meio de eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O perfil eletroforético das prolaminas do milho revelou a presença de quatro frações de zeína nos materiais extraídos na presença de agente redutor, sem nenhuma diferença de padrão eletroforético entre os isolados obtidos com agente redutor não tóxico e o tóxico. Sendo assim, a substituição de um agente redutor tóxico na extração de zeínas pode ser uma alternativa para estender o uso de zeína diretamente na produção de biofilmes para a finalidade de uso alimentar e revestimento de medicamentos de uso oral.

Palavras-chave: Milho, zeína, extração, agente redutor não tóxico

Introdução

As prolaminas, proteínas ricas nos aminoácidos prolina e glutamina, são as principais proteínas de armazenamento da maioria das sementes dos cereais (SHEWRY *et al.*, 1999). No milho as prolaminas são denominadas zeínas e correspondem a cerca de 70% das proteínas do endosperma do milho convencional (BICUDO *et al.*, 2006; SCRAMIN *et al.*, 2007), podendo ser definidas como proteínas de reserva (WANG e PÁDUA, 2005).

Três grupos estruturalmente distintos, nomeados de •, • e •-zeína, foram classificados de acordo com uma nomenclatura amplamente aceita (ESEN, 1986). Um quarto grupo compreendendo duas proteínas, a •-zeína de 10 kDa (KIRIHARA *et al.*, 1988) e a •-zeína de 18 kDa (WOO *et al.*, 2001) foi depois adicionado à família das

prolaminas do milho. Tais proteínas zeína diferem entre si pela sequência de aminoácidos, características de solubilidade, ponto isoelétrico e composição polipeptídica (ESEN, 1986; SHEWRY e TATHAM, 1990).

As α -zeínas são caracterizadas por duas bandas 19KDa e 22KDa, na eletroforese em gel contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE); sendo similares em sequência e solubilidade, diferindo apenas no tamanho. Tais proteínas, que constituem de 75 a 85% das zeínas totais, são ricas em resíduos de aminoácidos apolares e são, portanto, insolúveis em água e solúveis em soluções aquosas de etanol a 70% (BICUDO et al, 2006; FORATO, 2000). Por sua vez, β -zeína corresponde às bandas de 14 e 16 kDa, representam de 10 a 15% da fração total e são solúveis em álcool hidratado após uso de agentes redutores. Já a γ -zeína apresenta banda em 28 kDa na eletroforese, representa de 5 a 10% das zeínas totais e, para solubilização dessa proteína, tanto em álcool 70% como em água, é necessário o uso de agentes redutores para rompimento das ligações dissulfeto. Por fim, a δ -zeína equivale à banda de 10 kDa e representa somente traços da fração total de zeínas; assim como as zeínas α , β , são extraídas somente com redução das ligações de dissulfeto (BICUDO et al, 2006; SHEWRY et al, 1990), sendo usado tradicionalmente o beta mercaptoetanol (ESEN, 1986).

Zeína é uma das proteínas mais hidrofóbicas de cereais, apresentando hidrofobicidade média de 1,365 J/mol. A alta proporção de resíduos de aminoácidos não polar é o responsável pela hidrofobicidade da zeína. A ordem de hidrofobicidade das frações de zeína é maior para α e β -zeínas do que γ zeína, a qual é apresenta maior hidrofobicidade que δ -zeína (HOLDING e LARKINS, 2009).

Esse grupo de proteínas foi isolado pela primeira vez por Gorham (1821) em milho integral usando solução aquosa de etanol e a primeira patente para o método comercial de extração de zeína foi concedida a Osborne (1891). Desde então, diferentes procedimentos utilizando diferentes solventes para extrair as proteínas dos cereais são relatados na literatura, nos quais fatores como concentração e tipo de solvente, temperatura e tempo da extração variam com o intuito de aumentar a eficiência do processo. O método usado para isolar as proteínas tem efeitos importantes nas suas propriedades (AGBOOLA e MILLS, 2005).

A extração da zeína pode ser feita a partir de todos os co-produtos do milho, mas a zeína comercial é normalmente produzida a partir do glúten de milho. A maioria das extrações da prolamina do milho tem sido baseada em extração por solução aquosa de etanol, mas muitos outros solventes podem solubilizar a zeína. Sistemas de extração

de zeína tem sido otimizados para diferentes produtos e co-produtos do milho devido às diferenças nas concentrações de proteína e as condições de processamento (ANDERSON e LAMSAL, 2011).

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um novo procedimento de isolamento de zeína com o uso de agente redutor não tóxico, comparando-o aos já reportados na literatura.

Material e Métodos

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Qualidade de Grãos do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da Embrapa, situado em Sete Lagoas – MG e no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa - MG.

Para a análise dos métodos de extração de zeínas, foi utilizada amostra moída de grãos do cultivar de milho BRS1060. A moagem foi realizada em moinho ciclone utilizando peneira de 0,5mm. Após a moagem, a amostra foi mantida em freezer até a realização das análises.

Foram testados quatro métodos diferentes para o isolamento da zeína, sendo três já reportados na literatura (FORATO et al, 2008; HAMAKER et al, 1995; LANDRY et al, 2000) e um novo método, que substitui o agente redutor convencional beta-mercaptoetanol, por um outro agente redutor não tóxico.

A caracterização das frações de proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Para a identificação das proteínas presentes nas amostras, foram utilizados padrões de peso molecular da Fermentas Life Sciences (Unstained Protein Molecular Weight Marker) contendo sete proteínas com pesos moleculares de 14.4 a 116.0kDa.. Os géis foram fotodocumentados e as imagens obtidas foram analisadas.

Resultados e Discussão

Os perfis proteicos obtidos após extração das zeínas podem ser observados na Figura 1, que representa a foto do gel com as devidas marcações quanto ao peso molecular das bandas proteicas do padrão utilizado e as bandas correspondentes a cada subunidade da zeína. A imagem do gel permitiu observar que a solução de etanol 70% adicionado do agente redutor não tóxico (Novo Método) permitiu extrair as quatro

frações de zeínas presentes no milho, sendo •-zeína (PM = 19 e 22 kDa), •-zeína (PM = 14 kDa), •-zeína (PM = 27 kDa) e •-zeína (PM = 10 kDa) (ESEN, 1986). Esse padrão eletroforético não diferiu daqueles das zeínas extraídas com os demais métodos utilizando o agente redutor beta mercaptoetanol.

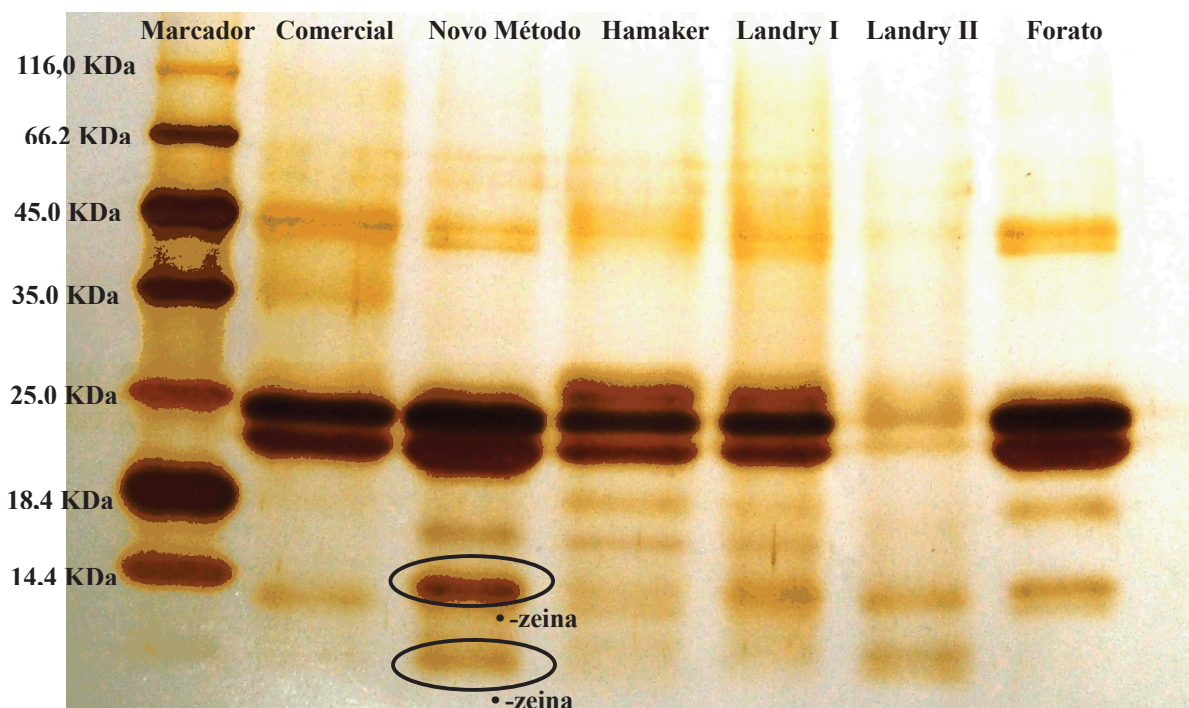


Figura 1: Mini gel (SDS/PAGE) de zeínas extraídas por diferentes métodos. Gel de empilhamento 6% e gel de separação 15% acrilamida - bis acrilamida. Corrida inicial a 20mA (atingir o gel de separação) e depois a 30mA, mantendo a voltagem constante no valor máximo. Volume aplicado/fosso = 5 μ L. Padrão de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences) = 10 μ L. Coloração com prata.

Conclusão

A substituição do agente redutor beta mercaptoetanol por outro agente redutor não tóxico na extração de prolaminas de milho pode ser uma alternativa para utilização da zeína diretamente na produção de coberturas e biofilmes com finalidade de revestimento de alimentos.

APOIO FINANCEIRO: FAPEMIG e CNPq.

Literatura Citada

- AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. **Journal of Cereal Science**, v. 41, p. 283-290, 2005.
- ANDERSON, T. J., and LAMSAL, B. P.. Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications: A Review. **Cereal Chemistry**, 88(2), 159-173, 2011.
- BICUDO, R. C. et al. Análise de zeínas • do milho por LC-ESI-Q/TOF. **Comunicado técnico 77 - EMBRAPA**. São Carlos, SP. Nov., 2006.
- ESEN, A.. Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. **Plant Physiology**. 80:623-627, 1986.
- FORATO, L. A. **Estudo das estruturas das zeínas por RMN, FTIR e MFA**. 2000. Tese (Doutorado) Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos.
- GORHAM, J. Analysis of Indian corn. **Quarterly Journal of Science, Literature and the Arts**. 2:206-208, 1821.
- HAMAKER, B. R., MOHAMED, A. A., HABBEN, J. E., HUANG, C. P., and LARKINS, B. A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**. 72:583-588, 1995.
- HOLDING, D.R., LARKINS, B.A. Zein storage proteins. In: Kriz, A.L., Larkins, B.A. (Eds.), **Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement**, vol. 63. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 269e286, 2009.
- KIRIHARA, J.A., PETRI, J.B. & MESSING, J. Isolation and sequence of a gene encoding a methionine-rich 10-kDa zein protein from maize. **Gene**, **71**, 359-370, 1988.
- LANDRY, J., DELHAYE, S., and DAMERVAL, C. Comparative efficiencies of isopropyl and tert-butyl alcohols for extracting zeins from maize endosperm. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50:4131-4134, 2002.
- OSBORNE, T. **Process of extracting zein**. US patent 456,773, 1891.
- SCRAMIN, J. A. et al. **Caracterização da ação protetora de filmes à base de zeínas e ácido oleico aplicados em maçãs in natura**. São Carlos, SP: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. (Circular Técnica 37).
- SHEWRY PR. The synthesis, processing and deposition of gluten proteins in the developing wheat grain. **Cereal Foods World** 44, 587–589, 1999.
- SHEWRY, P.R.; MILES, M.J.; TATHAM, A.S. The prolamin storage proteins of Wheat and related cereals. **Biochemistry Journal**. v.267, p.1-12, 1990.
- WANG, Q.; PADUA, G.W. Properties of Zein films coated with drying oils. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.3444-3448, 2005.

WOO, Y.-M., HU, D.W.-N., LARKINS, B.A. & JUNG, R. Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. **Plant Cell**, 13, 2297-2317, 2001.