



CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E PROTEÔMICA DOS GRÃOS SECOS DE DESTILARIA COM SOLÚVEIS (DDGS) DE MILHO

Felipe Carlos Spneski Sperotto¹, Fernando João Bispo Brandão², Aline de Lima Leite³, Pedro de Magalhães Padilha⁴ & Marco Antonio Martin Biaggioni⁵

RESUMO: Com a busca por combustíveis de fontes renováveis aumentou-se o interesse pelo etanol. No Brasil, a possibilidade da produção de etanol a partir da cultura do milho, apresenta-se como uma alternativa promissora, principalmente no período da entressafra da cana-de-açúcar. Após a produção de etanol do milho, gera-se um coproduto conhecido como "distiller's dried grains with soluble (DDGS)" ou grãos secos de destilaria com solúveis, usado na alimentação animal como fonte de proteína. Este trabalho teve como objetivo caracterizar as proteínas e quantificar os minerais de interesse presentes no DDGS de milho, permitindo assim, um melhor emprego deste coproduto como fonte de energia na forma de alimentação animal. Para tanto, foram utilizadas técnicas analíticas de caracterização química e bioquímica. Os resultados indicam que o DDGS de milho apresenta em sua constituição mineral, altas concentrações de enxofre, cobre e cobalto indicando a necessidade de caracterizar o produto antes de disponibilizá-lo como ração. O uso da técnica proteômica possibilitou levantar 191 proteínas presentes no DDGS.

PALAVRAS-CHAVE: ZEA mays, Resíduos Agroindustriais, Proteômica, Nutrição Animal.

CHEMICAL AND PROTEOMICS CHARACTERIZATION OF CORN DISTILLER'S DRIED GRAINS WITH SOLUBLES (DDGS)

ABSTRACT: The search for fuels from renewable sources increases the interest in ethanol. In Brazil, the possibility of ethanol production from maize is a promising alternative, especially in the sugarcane off-season. After the corn ethanol production, a co-product known as "distiller's dried grains with soluble (DDGS)" is generated and used as a protein source in animal feed. This work aimed to characterize the proteins and quantify the minerals of interest present in the corn DDGS, thus allowing a better use of this coproduct as an energy source for animal feed. For that, a chemical and biochemical analytical techniques were used for characterization. The results indicate that the mineral corn DDGS presents in its constitution, high concentrations of sulfur, copper and cobalt indicating the need to characterize the product before making it available as animal feed. The use of the proteomic technique allowed raising 191 proteins present in DDGS.

KEYWORDS: ZEA mays, Agro-Industrial Wastes, Proteomics, Animal Nutrition.

1 INTRODUÇÃO

O DDGS (distiller's dried grains with solubles) ou grãos secos de destilaria com solúveis é um coproduto da produção do etanol obtido da fermentação do amido de grãos amiláceos. O DDGS de milho tem sido muito usado como fonte de alimentação animal nos Estados Unidos da América. A composição do DDGS e a quantidade de álcool produzido dependerão da composição inicial da matéria prima, neste caso mais importante, a concentração de amido dos grãos (DAVID, 2015).

O DDGS contém carboidratos abundantes como celulose e hemicelulose. (GOESER; HOFFMAN; COMBS, 2009), estas são avaliadas como de fácil digestibilidade

pelos animais (LAMSAL; PATHIRAPONG; RAKSHIT, 2012). O DDGS contém óleo (8-11%), proteínas (25-38%, sendo 50% de zeína), celulose (9-16%) e outros carboidratos (FERRARETTO; CRUMP; SHAVER, 2013).

As proteínas são interessantes para avaliação de segurança e qualidade dos alimentos, pois podem estar envolvidas ou resultarem na síntese de toxinas, antinutrientes ou alérgenos (VAN WIJK, 2001; DAVIES, 2009).

A zeína é uma das proteínas derivadas do endosperma dos grãos de milho (SHUKLA; CHERYAN, 2001). A concentração de zeína pode corresponder a 60% do total de proteínas do grão de milho, sendo geralmente a alfa-zeína presente em maior concentração. (DE OLIVEIRA et al., 2004). A alfa-zeína é uma proteína rica em aminoácidos hidrofóbicos (alanina, leucina e prolina), e a betazeína possui altos teores de aminoácidos

¹ ² ³ ⁴ ⁵ E-mails: felipesperotto@hotmail.com ;
fernandobb@gmail.com ; a.lima82@yahoo.com.br ;
padilha@ibb.unesp.br ; biaggioni@fca.unesp.br

sulfurados, a gama-zeína constitui-se de resíduos de prolina, e a delta-zeína contém em sua estrutura aminoácidos sulfurados além de prolina e leucina (DE OLIVEIRA et al., 2004).

As metodologias utilizadas na obtenção do proteoma buscam separar, identificar e quantificar as proteínas de toda a planta, grão ou de um tecido específico (ROSSIGNOL, 2006).

Em grãos é aplicada como uma ferramenta eficaz na avaliação das respostas a fatores bióticos e abióticos, incluindo alterações no genoma (mutação de inserção e regulação gênica) (ROSSIGNOL, 2006).

A composição de minerais do DDGS, por sua vez, auxilia na avaliação nutricional deste coproduto, onde, minerais como cálcio (Ca), fósforo (P), cobre (Cu),

enxofre (S), cobalto (Co) e selênio (Se), devem ser quantificados, pois, devido às suas funções metabólicas, quando não ingeridas ou ingeridas por excesso pelos animais, podem prejudicar o correto funcionamento do sistema digestivo (Tabela 1) (SILVA; NETTO; SCUSSEL, 2016).

A alimentação dos animais somente por plantas forrageiras não é capaz de atender as exigências em microminerais como cobre, cobalto e enxofre, mesmo com a devida correção de minerais do solo via adubação, é necessária uma suplementação com outras fontes para o balanceamento da dieta alimentar, para não comprometer o ganho de peso e desenvolvimento de carcaça dos animais (BORGES; PASCHOAL, 2011).

Tabela 1 - Valores sugeridos de minerais em rações para bovinos.

Macrominerais (%)	Valores Sugeridos (%)	
	Gado de Corte	Gado de Leite
Ca	0,17 - 1,53	0,53 - 0,67
S	0,08 - 0,15	0,20
P	0,17 - 0,59	0,32 - 0,44
Microminerais (mg kg ⁻¹)		
Cu	4,0 - 10,0	9,0 - 11,0
Co	0,07 - 0,11	0,11
Se	0,05 - 0,30	0,30

FONTE: Adaptado de (BORGES; PASCHOAL, 2011)(MENDONÇA et al., 2011).

Portanto estudos devem ser realizados para determinar o valor de minerais presentes na amostra e o perfil proteômico do DDGS, visto que a literatura é escassa de informações sobre as proteínas e o papel funcional destas, assim como uma possível relação das mesmas com a qualidade do DDGS. Apesar de vários métodos estarem disponíveis para a comparação qualitativa e quantitativa do proteoma dos mais diversos grãos, a literatura é escassa sobre o perfil proteômico do DDGS.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em parceria entre a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu e a University of Nebraska Lincoln nos Estados Unidos da América. As análises foram realizadas no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Botucatu/SP. A amostra de DDGS foi obtida a partir de uma fábrica de ração local da cidade de Lincoln/NE - EUA. Uma única amostra de DDGS foi utilizada para posterior análise da composição de proteínas e minerais deste coproduto do milho.

2.1 Análise de minerais do DDGS

Para a análise de minerais uma amostra única de DDGS foi analisada em seis repetições sendo elas em duplicata totalizando 12 leituras para cada mineral. Após a leitura

foram feitas as médias e o desvio padrão dos dados coletados.

2.1.1 Preparo das amostras

Foram pesadas cerca de 100 mg de cada uma das subamostras de DDGS em balança analítica em triplicata. Cada porção de 100 mg foi embalada em papel filtro e transferida para balões de Kjeldahl, nos quais foram adicionados, aproximadamente, 3 mL e 2 mL, respectivamente, de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio ambos (PA) (Merck). Uma amostra foi utilizada como controle. Os balões de Kjeldahl foram colocados em bloco digestor, o qual foi aquecido a uma temperatura de, aproximadamente, 110 °C. Os extratos ácidos foram transferidos quantitativamente para balões volumétricos, e o volume foi completado, com água deionizada, para 25 mL e homogeneizou-se o extrato ácido diluído (AOAC, 2007).

2.1.3 Determinações de Ca, Cu, Co e Se

As determinações de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) foram feitas utilizando-se soluções padrão Titrisol MERCK no preparo da curva analítica. As condições operacionais utilizadas foram as descritas no manual do fabricante do equipamento (COOKBOOK, SHIMADZU AA – 6800, 2000) (PEREIRA JUNIOR et al., 2009).

2.1.4 Determinação de P

A determinação de fósforo foi feita utilizando o método espectrofotométrico do ácido vanadomolibdofosfórico, "GENESYS" TM modelo 6. O comprimento de onda utilizado nas medidas de absorvância foi o de 420 nm (SILVA et al., 2016).

2.2 Análise proteômica

2.2.1 Estratégia de Shotgun

2.2.1.1 Extração das proteínas

Para extração das proteínas 1.5 mL de tampão de lise contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4 %, DTT 1 % e um coquetel de inibidores de proteases foram adicionados às amostras (200 mg). Essas foram em seguida submetidas a agitação em vórtex por 12 h a 4°C. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 8000 g por 10 min a 4°C (Eppendorf, R5409) e o sobrenadante coletado.

2.2.1.2 Análise por LC/MS

Para esta etapa, 50 µg de proteína foram transferidas para um microtubo e a estas foram adicionados 10 µL de bicarbonato de amônio 50 mM e 25 µL de surfactante RapiGest® 0,2% (Waters, Milliford, USA). Em seguida, as amostras foram reduzidas através da incubação a 40°C com DTT 100 mM por 40 min e posteriormente alquiladas pela adição de 300 mM de alquiladas com iodoacetamida IAA por 30 min em temperatura ambiente. Em sequência, as proteínas foram submetidas à digestão proteolítica com a adição de 150 ng de tripsina grade MS (Promega) a 37°C por 14 h. Ao fim das 14 h, 10 µL de TFA 5% foram acrescidos, seguida por incubação por mais 90 min a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 g durante 30 min. O sobrenadante contendo os peptídeos foi coletado e submetido à análise por UPLC-MS (KRÄMER-ALBERS et al., 2007). A análise dos peptídeos tripticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Para tanto, o sistema UPLC nanoACQUITY era equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 75 mm x 150 mm; 1,8 µm, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1 % ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de um gradiente linear de 7-85 % de fase móvel B durante 70 min com fluxo de 0,35 µL/min e a temperatura da coluna mantida a 45°C. O MS foi operado em modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 70 min.

Os dados obtidos foram processados através do software ProteinLynx GlobalServer (PLGS) versão 3.0 (Waters, Milliford, USA). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software. Os dados obtidos foram buscados no banco de

dados da espécie *ZEA mays* através do catálogo do UniProt (Universal Protein Resource).

2.3 Análise estatística

2.3.1 Análise de Minerais

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão baseado no experimento realizado em triplicado. Não havendo necessidade de análise estatística.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise de minerais

De acordo com a Tabela 2, a concentração média de enxofre encontrada para a amostra de DDGS foi de 0,19 mg kg⁻¹, valor este que está dentro do valor sugerido pela literatura para gado de corte, porém, abaixo para gado de leite. Esta concentração de Se para o DDGS de milho corrobora ROBINSON, P. H.; KARGES, K.; GIBSON, M. L (2008), que encontraram para o DDGS concentração de 0,28 mg.kg⁻¹, sugerindo a mesma analogia de valor sugerido pela literatura.

As concentrações de Cu e Co encontradas no DDGS de milho 75,05 e 14,86 (mg kg⁻¹) respectivamente estão acima dos valores máximos sugeridos pela literatura (Tabela 1) para gado de corte e leite, fator este que pode acarretar no desbalanço nutricional dos animais quando incorporado a uma ração sem o devido levantamento dos valores nutricionais da mesma.

São três os macrominerais de grande importância presentes no DDGS de milho: Ca, P e S. Eles afetam diretamente o desempenho dos animais quando ausentes. O cálcio, quase que na sua totalidade, aproximadamente 99%, está relacionado com funções do esqueleto animal. (SUTTLE, 2010).

De acordo com a Tabela 2, as concentrações encontradas de Ca (0,65%), S (16,66%) e P (0,24%) de uma mesma amostra de DDGS sugerem o balanço mineral positivo, uma vez que, as mesmas estão dentro dos valores sugeridos pela literatura conforme a Tabela 1. Estes valores corroboram com Silva et al. (2016), que encontraram concentrações próximas de Ca (0,75%) e P (0,32%). Kleinschmit et al. (2006), encontraram para o DDGS de milho concentrações de Ca entre 0,6 a 0,7% e de P entre 0,34 a 0,38%, valores estes próximos aos encontrados para estes minerais neste trabalho reforçando a importância de se quantificar os minerais presentes nas rações e suas possíveis variações dentro de uma mesma amostra.

Durante a produção de etanol, algumas usinas utilizam ácido sulfúrico para ajustar o pH das soluções, no entanto, a adição de ácido sulfúrico no processo de extração de etanol eleva a concentração de enxofre no DDGS (NUEZ ORTÍN; YU, 2009). Motivo este que pode explicar os altos níveis de S encontrados na

amostra de DDGS, que é derivado da produção de etanol de milho.

Tabela 2 - Composição de microminerais ($mg.kg^{-1}$) e macrominerais (%) do DDGS de milho

	Microminerais		
	Cobre	Cobalto	Selênio
Média ± D.P.	75,05 ± 6,17	14,86 ± 1,04	0,19 ± 0,01
	Macrominerais		
	Cálcio	Enxofre	Fósforo
Média ± D.P.	0,65 ± 0,08	16,66 ± 1,51	0,24 ± 0,02

Segundo os valores máximos sugeridos pela literatura para gado de corte (0,15%) e gado de leite (0,20), nota-se que a concentração de 16,66% de S encontrada para a amostra de DDGS de milho poderia provocar desbalanço de nutrientes nos animais se disponibilizada na sua forma puro sem mistura com outros ingredientes alimentares.

As diferentes concentrações de minerais afetam o valor e o uso final de DDGS como alimento para animais, estes parâmetros, estão relacionados não apenas a desordens nutricionais, mas também, ao excesso de minerais nos resíduos o que significa que o animal não está absorvendo o que lhe é oferecido, resultando também em desperdício de investimento (LIU; HAN, 2011). Por tanto, independentemente do destino ou emprego do DDGS, como ração ou coproduto para outros fins, faz-se necessário um levantamento da sua constituição para a melhor utilização do mesmo.

3.2 Análise de Proteínas

Para esta mesma amostra de DDGS foram realizadas análises proteômicas com o intuito de caracterizar quais tipos de proteínas estão presentes.

Foram encontradas 191 proteínas com diferentes funções (Tabela 3). Uma vez que, as proteínas encontradas no DDGS são derivadas dos grãos de milho utilizados para a produção de etanol, a busca por informações destas proteínas estão baseadas no banco de dados do milho (*Zea mays*), onde este apresenta 140.212 proteínas já encontradas para o milho, porém apenas 1.026 proteínas foram revisadas e bem caracterizadas.

A família das proteínas zein são proteínas semelhantes, classificadas com base na sua solubilidade e massas moleculares, sendo as principais proteínas de armazenamento do milho (45-50%) (ANDERSON; LAMSA, 2011). Essas proteínas são ricas em ácido glutâmico (21-26%), leucina (20%), prolina (10%), e alanina (10%). Além disso, sua insolubilidade na água limita sua utilização em produtos para alimentação humana, assim o foco principal desde meados do século

XX tem sido na sua utilização como polímero industrial (SHUKLA; CHERYAN, 2001).

As 191 proteínas encontradas podem ser usadas como possíveis biomarcadores para muitas propriedades do DDGS, indicando processos aos quais o mesmo foi submetido. Já a quantidade de uma proteína específica pode ser muito útil ao se analisar particularidades entre diferentes condições de processos.

Conforme a Tabela 3, existem 69 proteínas não caracterizadas, as quais não se sabe ao certo quais são suas funções, porém sabe-se que elas estão presentes no genoma do milho. Destas 191 proteínas encontradas, 121 proteínas já estão caracterizadas pela literatura quanto a suas funções no grão de milho, sendo que as mais encontradas estão ligadas ao grupo de proteínas zein; elongation factor 1-alpha; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; e histone H2A.

Belyea et al., (2004) avaliaram a variação na composição de proteínas do DDGS, onde não foram relacionadas as variações entre as proteínas do DDGS em relação a composição proteica do milho, provavelmente, a variação ocorreu durante o processamento ou técnicas de processamento. Isto implica que, a redução da variação na composição proteica do DDGS exigirá a modificação das estratégias de processamento, e não na escolha da matéria-prima. A concentração da proteína elongation factor 1-alpha está altamente correlacionada com o teor de lisina no endosperma do milho, devido a mutação opaque-2 que aumenta significativamente o teor de lisina no grão, através da redução da síntese de zein e aumento do acúmulo de proteínas que contém lisina (WANG et al., 2001).

Portanto, pode-se ter como parâmetro de qualidade de execução de processo de produção de etanol e qualidade de produto na forma de ração, uma forma analítica de processo, com o estudo das proteínas presentes em amostras DDGS de milho.

4 CONCLUSÕES

Para as condições deste trabalho conclui-se que:

A caracterização de minerais do DDGS mostrou que as concentrações de enxofre (S), cobre (Cu) e cobalto (Co) são maiores do que o indicado na formulação de ração animal;

Devido as variações nutricionais do coproduto (DDGS de milho), indica-se a caracterização mineral prévia da amostra antes da disponibilização para os animais.

O uso das técnicas proteômicas possibilitou levantar 191 diferentes proteínas do DDGS ligadas as funções metabólicas do grão de milho na planta, sendo 69 já caracterizadas na literatura e 121 não caracterizadas.

Mais estudos a cerca das funções que as proteínas exercem no DDGS precisam ser realizados.

5 REFERÊNCIAS

Anderson, T. J., and Lamsa, B. P. Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: a review. **Cereal. Chem.** 88, 159–173. doi: 10.1094/CCHEM-06-10-0091. 2011

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International.** 2007.

BORGES, L. E. M.; PASCHOAL, J. J. Influência dos micro-minerais (Cu, Mn, Se e Zn) no sistema imunológico dos bovinos. **Cadernos de Pós-graduação FAZU**, v.3, 2011.

OLIVEIRA, J. P.; CHAVES, L. C.; DUARTE, J. B.; BRASIL, E. M.; FERREIRA JÚNIOR, L. T.; RIBEIRO, K. O. Teor de proteína no grão em populações de milho de alta qualidade proteica e seus cruzamentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 45–51, 2004.

FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 533–550, 2013.

GOESER, J. P.; HOFFMAN, P. C.; COMBS, D. K. Modification of a rumen fluid priming technique for measuring in vitro neutral detergent fiber digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 8, p. 3842–8, 2009.

KLEINSCHMIT, D. H., D. J. CHINGOETHE, K. F. KALSCHUR, AND A. R. HIPPEN. Evaluation of various sources of corn dried distillers grains plus solubles for lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 12, p. 4784–4794, 2006.

E.M. Krämer Albers, N. Bretz, S. Tenzer, C.

Winterstein, W. Möbius, H. Berger, K. A. Nave, H. Schild, J. Trotter. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? **Proteomics Clin. Appl.** 1:1446–1461. doi:10.1002/prca.200700522. 2007

LAMSAL, B. P.; PATHIRAPONG, P.; RAKSHIT, S. Microbial growth and modification of corn distillers dried grains with solubles during fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 553–559, 2012.

LIU, K.; HAN, J. Changes in mineral concentrations and phosphorus profile during dry-grind processing of corn into ethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3110–3118, 2011.

MENDONÇA, A. F. Minerals: the Importance of Dietary Use of Ruminants. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2011.

PEREIRA JUNIOR, J. B.; FERNANDES, K. G.; MÜLLER, R. C. S.; NÓBREGA, J. A.; PALHETA, I. C. Determinação direta de ca, mg, mn e zn em amostras de leite de búfala da ilha de marajó por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2333-2335, 2009.

ROBINSON, P. H.; KARGES, K.; GIBSON, M. L. Nutritional evaluation of four co-product feedstuffs from the motor fuel ethanol distillation industry in the Midwestern USA. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, n. 3/4, p. 345–352, 2008.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: The industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001.

SILVA, J. R.; NETTO, D. P.; SCUSSEL, V. M. Grãos secos de destilaria com solúveis , aplicação em alimentos e segurança : Revisão. **Pubvet**, Londrina, v. 10, n. 3, p. 257–270, 2016.

SILVA, R. L. et al. Valor nutritivo de alimentos energéticos para a tilápia-do-nilo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 566–577, 2016.

WANG, X., WOO, Y., SOO KIM, C., LARKINS, B.A. Quantitative Trait Locus Mapping of Loci Influencing Elongation Factor 1 Content in Maize Endosperm. **Plant Physiol**, v. 125, n. , p. 1271-1282, 2001.