

DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE PESCADO

Zavareze, E. R.; Moraes, K. S.; Salas-Mellado, M*.

Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil, Eng^o Alfredo Huch 475, Fax (55) (53)32338745, dqm@furg.br.

E-mail: mysame@yahoo.com

RESUMO

Com o objetivo de elaborar hidrolisados protéicos de pescado realizaram-se testes de reações de hidrólise com as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Novozyme utilizando como substrato polpa de cabrinha (*Prionotus punctatus*). em diferentes condições de reação: para enzima Alcalase utilizou-se uma proporção de enzima/substrato [S/T]:20% (p/v); pH 8; t^a: 60°C; tempo de 3h. Para a enzima Flavourzyme: [E/S]:10% (p/p); [S/T]:10% (p/v); pH 7; t^a:50°C; tempo de 2h. Para a enzima Novozyme [E/S]: 2,3% (p/p); [S/T]: 10% (p/v); pH8; t^a:40°C e tempo de 3h. Para a determinação do grau de hidrólise foram tomadas amostras de hidrolisados em diferentes tempos de reação que foram inativadas com solução de ácido tricloro acético (TCA) e determinadas as proteínas solúveis no filtrado pelo método de Folin-Lowry. Calculou-se o grau de hidrólise como a quantidade de proteína solubilizada em relação à proteína total inicial. Das enzimas testadas, a Novozyme apresentou o maior grau de hidrólise (14,3%).

1 INTRODUÇÃO

Os hidrolisados são proteínas quebradas química ou enzimaticamente produzindo peptídios de diferentes tamanhos. A hidrólise da proteína de pescado com enzimas proteolíticas selecionadas proporciona a possibilidade de controlar o grau de hidrólise da proteína do substrato. Usando proporções enzima-substrato e tempos de reação adequados permite-se a produção de hidrolisados com diferentes estruturas moleculares e diferentes propriedades funcionais que podem ser aplicados em vários produtos alimentícios.

A hidrólise enzimática por ser realizada em condições brandas e controladas, garante a manutenção da qualidade nutricional dos hidrolisados e um perfil peptídico definido e reproduzível, sendo o grau de hidrólise o parâmetro utilizado para comparar hidrolisados protéicos entre si.

Os hidrolisados enzimáticos são utilizados no tratamento clínico de pacientes com dificuldade em digerir e absorver proteínas, sendo preferidos em relação às misturas de aminoácidos livres (NEVES et al, 2004).

As proteínas musculares do pescado apresentam um elevado valor biológico, decorrente de uma alta sensibilidade à hidrólise e de uma composição balanceada em aminoácidos (KRISTINSSON e RASCO, 2000).

O objetivo deste trabalho é determinar o grau de hidrólise das enzimas proteolíticas para elaborar hidrolisados protéicos de pescado.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Método

2.1.1 Material

2.1.1.1 Matéria-prima

Para a obtenção de polpa e do hidrolisado protéico de pescado foi utilizada uma espécie de baixo valor comercial, a cabrinha (*Prionotus punctatus*), fornecida por indústrias de pescados do município de Rio Grande, RG.

2.1.1.2 Para obtenção do Hidrolisado

Para as reações enzimáticas foram utilizadas enzimas proteolíticas: Alcalase, Flavourzyme e Novozyme, da marca Novo. Para a elaboração de tampões e reagentes para determinação do grau de hidrólise foram utilizados produtos com qualidade P.A.

2.1.1.3 Aparelhos e equipamentos

Os aparelhos e equipamentos necessários para a obtenção da polpa, do hidrolisado enzimático e para as análises químicas foram os seguintes: liquidificador, banho ultratermostático, agitador de eixo-hélice, pHmetro, reatores de vidro, vidraria de laboratório, balança analítica, digestor, destilador Kjeldahl e espectrofotômetro.

2.1.2 Metodologia

2.1.2.1 Obtenção e caracterização da polpa de pescado

Primeiramente foi realizada a filetagem do pescado pela retirada de cabeça, vísceras, aletas e pele, logo após realizou-se a trituração dos filés através de um moedor de carne. A carne de pescado moída foi submetida a três lavagens com água destilada a uma temperatura de 7 °C com agitação manual durante 5 min; após cada ciclo de lavagem, a carne foi prensada com pano, obtendo assim a polpa úmida, que foi caracterizada pela composição proximal conforme a metodologia oficial da AOAC (1997).

2.1.2.2 Hidrólise enzimática da polpa de pescado

A polpa de pescado úmida foi homogeneizada com a solução tampão no pH da reação através de um liquidificador e submetida à reação enzimática nas condições de pH e temperatura conforme literatura específica e na concentração de enzima com relação ao substrato (E/S) conforme testes preliminares. A reação foi realizada em reator de vidro conectado a um banho ultratermostático para o controle da temperatura. No fim da reação enzimática esta foi interrompida com ácido tricloro acético (TCA 6,25%) para a determinação do grau de hidrólise.

2.1.2.3 Determinação do grau de hidrólise das enzimas proteolíticas

Para a determinação do grau de hidrólise das enzimas proteolíticas utilizou-se o método descrito por PEZOA e SALAS-MELLADO, 1979 e que consistiu em tomar uma alíquota de 6mL de hidrolisado que foi inativada com adição de 4 mL TCA 6,25%, deixada em repouso por 10 minutos, filtrada em papel filtro e determinadas as proteínas solúveis no filtrado mediante o método de Folin-Lowry. O grau de hidrólise das enzimas proteolíticas testadas foi realizado mediante a relação da quantidade de proteínas totais presentes no hidrolisado e a quantidade de proteínas solúveis determinada pelo método de Folin-Lowry e

expresso em porcentagem. Para o cálculo das proteínas solúveis foi necessário a elaboração de curvas que relacionassem a absorbância com a concentração utilizando a tirosina e albumina com substância padrão.

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Caracterização da polpa de cabrinha

A polpa lavada úmida apresentou a seguinte composição proximal: 89% de umidade, 9,1% de proteína, 0,3% de lipídio e 0,6% de cinzas.

2.2.2 Determinação do grau de hidrólise das enzimas proteolíticas

As figuras 1 e 2 mostram a quantidade de proteína hidrolisada expressa como tirosina e albumina versus tempo de hidrólise para as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Novozyme.

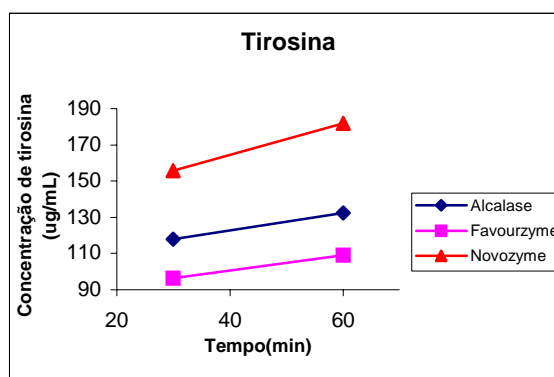


Figura 1: Concentração de tirosina x tempo de hidrólise para as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Novozyme

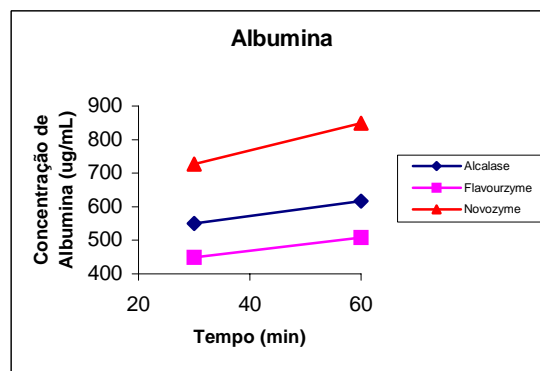


Figura 2: Concentração de albumina x tempo de hidrólise para as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Novozyme

Com base na análise das figuras 1 e 2 observou-se que a enzima Novozyme apresentou a maior quantidade de proteína expressa como tirosina ou albumina em todos os tempos de amostragem, o que indica que esta enzima apresentou maior atividade proteolítica quando comparada com a Alcalase que apresentou atividade intermediária quando se compara as três enzimas e que a enzima Flavourzyme apresentou a menor atividade nas condições deste estudo.

Na Tabela 1 está apresentado a quantidade de proteína hidrolisada (%) expressa em tirosina e albumina para as diferentes enzimas estudadas.

Tabela 1: Grau de hidrólise expresso como % de tirosina e albumina para as diferentes enzimas proteolíticas, utilizando como substrato à polpa úmida de cabrinha

Enzima	[E/S]	[S]/Tp	T (°C)	pH	t (min)	% prot. hidrolisada (tirosina)	% prot. hidrolisada (albumina)
Alcalase	10%	20%	60	8	180	2,37	11,1
Flavourzyme	10%	10%	50	7	120	2,11	9,8
Novozyme	2,3%	10%	40	8	180	3,07	14,3

Fonte: Laboratório de Tecnologia de Alimentos.

Onde: [E/S]: relação enzima/substrato (p/p);
[S]/Tp]: relação substrato/tampão (p/v) ;
T: temperatura (°C);
pH: pH da reação;
t: tempo de reação (min).

Observando os resultados apresentados na tabela 1, pode-se notar que a reação com a enzima Novozyme, apresentou maior grau de hidrólise (3,07% de proteína hidrolisada expressa em tirosina e 14,3% em albumina) mesmo com uma proporção menor de enzima/substrato (2,3%) comparada com a concentração utilizada das enzimas Alcalase e Flavourzyme (10%).

4 CONCLUSÃO

A enzima Novozyme apresentou o maior grau de hidrólise quando comparada com as enzimas Alcalase e Flavourzyme.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 16th edition, vol. 1-2, Arlington, 1997.
- PEZOA, V.; SALAS-MELLADO, M. M. **Obtenção de um concentrado de proteínas de peixe para alimentos, pelo método enzimático, utilizando as próprias enzimas do peixe**. FURG, Rio Grande, 1979.
- NEVES, R. A. M.; DE MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. **Caracterização de Hidrolisados Enzimáticos de peixe**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 24(1): 101-108, jan.-mar.2004.
- DAVID. T. PLUMMER; **An Introduction to Practical Biochemistry**. Second edition; 1978.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B.A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. **Crit. Reviews in Food Sci. Nutr.**, 40, 1, 2000.