

# EFEITO DE DIFERENTES ENZIMAS NO PROCESSAMENTO DE HIDROLISADO PROTÉICO DE PESCADO

**Kessiane Moraes, Sarita D'Avila dos Santos, Myriam Salas-Mellado\*,  
Carlos Prentice-Hernández\***

*Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pesquisas em Processamento de Produtos Marinhos (ProMar), Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande.*

*\*E-mail: dqmprent@furg.br*

## RESUMO

A modificação enzimática das proteínas usando preparados de enzimas proteolíticas selecionadas vem sendo amplamente utilizada na indústria de alimentos, pois resulta em produtos de alta funcionalidade e alto valor nutritivo. O presente trabalho visa avaliar quais variáveis do processo de hidrólise enzimática em pescado utilizando as enzimas Alcalase, produzida pelo *Bacillus licheniformis* e Flavourzyme, produzida pelo *Aspergillus oryzae* (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) possuem efeitos significativos no processo de obtenção. Para isto, optou-se pela utilização do planejamento experimental denominado *Screening Design* do tipo Plackett-Burman, com sete variáveis de entrada estudadas em dois níveis para cada enzima: temperatura (50 e 60°C), espécie do pescado (cabrinha e corvina), pH (8 e 9 para Alcalase e 6 e 7 para Flavourzyme), tempo (60 e 120 minutos), concentração de enzima (0,5 e 2,0% g/g), concentração do substrato (1:1 e 2:1 g/mL) e inativação enzimática (80 e 90°C/15min), estudando-se como resposta o grau de hidrólise (%GH) expresso em mg de tirosina e de albumina, com três pontos centrais para cada espécie de pescado estudada. Com 90% de confiança, utilizando o programa *Statistica 5.0*, para a Alcalase nem o tempo nem a concentração do substrato mostraram efeito significativo no processo, enquanto que para a Flavourzyme somente a temperatura não mostrou efeito significativo no processo. A cabrinha foi a espécie que aumentou o grau de hidrólise em ambas reações.

Palavras-chaves: hidrolisado enzimático, Alcalase, Flavourzyme, pescado.

## 1 Introdução

Vários estudos têm destacado o uso de pescado de baixo valor comercial como fonte para obtenção de produtos com alto valor agregado, destacando dentre eles a hidrólise protéica, um processo bastante estudado na década de 60 e que vem sendo retomado nos dias de hoje como alternativa para o processamento de resíduos ou de matéria-prima secundária, visando a obtenção de um produto com maior valor agregado e sem grandes custos adicionais à indústria.

A hidrólise de proteína de pescado com enzimas 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 encontrar aplicações em vários produtos alimentícios.

Os experimentos fatoriais  $2^k$  fracionados se aplicam, geralmente, nos estágios iniciais de uma experimentação, quando há um número muito grande de fatores a serem investigados, sendo portanto, desejável avaliar, de forma preliminar e com o mínimo de tempo e custo, os efeitos de todos estes fatores sobre a variável de resposta. Nestas situações, são poucos os fatores que

exercem efeitos significativos sobre a variável de resposta, sendo o objetivo principal do experimento a sua identificação. Os efeitos verdadeiros deverão ser analisados posteriormente de forma mais detalhada em outro estágio do estudo que está sendo realizado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar quais variáveis do processo de hidrólise enzimática em pescado utilizando as enzimas Alcalase e Flavourzyme, possuíam efeito significativo no processamento através da utilização de planejamento experimental.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **2.1.1 Material**

##### **2.1.1.1 Matéria-prima**

Duas espécies de pescado de baixo valor comercial: cabrinha (*Prionotus punctatus*) e corvina (*Micropogonias furnieri*); conforme disponibilidade das indústrias localizadas na cidade de Rio Grande/RS, Brasil.

##### **2.1.1.2 Enzimas**

Foram estudadas duas enzimas microbianas: Alcalase, Flavourzyme.

##### **2.1.1.3 Reagentes**

Tampão de McIlvaine (pH's 6, 7 e 8) e tampão Sørensen (pH 9).

#### **2.2 Metodologia**

A matéria-prima foi eviscerada e descabeçada, sendo depois submetida a filetagem. Os filés foram triturados para se obter uma polpa uniforme e homogênea. Para manter o pH estável durante as reações foi utilizada solução tampão, bem como para ajustar a concentração do substrato. Para início da operação de hidrólise, a enzima específica foi adicionada à polpa para cada reação. Ao final de cada reação de hidrólise foram retiradas alíquotas do hidrolisado para determinação do %GH final. Para avaliação dos resultados fez-se curva padrão para tirosina e albumina à absorvância de 750nm. O %GH foi medido segundo método descrito por Hoyle e Merrit (1994) e Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999).

Utilizou-se um planejamento experimental denominado *Screening Design* do tipo Plackett-Burman, com sete variáveis de entrada estudadas em dois níveis para cada enzima: temperatura (50 e 60°C), espécie do pescado (cabrinha, *Prionotus punctatus* e corvina, *Micropogon furnieri*), pH (8 e 9 para Alcalase e 6 e 7 para Flavourzyme), tempo (60 e 120 minutos), concentração de enzima (0,5 e 2,0% g/g), concentração do substrato (1:1 e 2:1 g/mL) e inativação enzimática (80 e 90°C/15min).

## **2. 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A matriz do planejamento, juntamente com as respostas obtidas em cada ensaio para as duas enzimas podem ser acompanhadas na Tabela 1. Pode-se constatar, com 90% de confiança utilizando o programa Statistica 5.0, que apenas a concentração da enzima não mostrou ter efeito significativo no processo com a enzima Alcalase. A temperatura foi à única variável que obteve efeito positivo, mostrando que a 60°C houve aumento no %GH, enquanto que as demais

variáveis mostraram efeito negativo sobre o %GH. Conclui-se, portanto, que a espécie que se mostrou mais adequada para a reação com Alcalase foi a cabrinha, sob um pH de 8 e com o substrato menos concentrado.

**Tabela 1** Matriz de Planejamento do tipo Plackett-Burman para enzima alcalase e Flavourzyme com respostas de %GH medidos em tirosina e albumina.

Ensaio	Níveis codificados							Respostas			
	Temp. (°C)	Espécie Pescado	pH	tempo (min)	[E] (%) (p/p)	[S] (p/v)	inativação (°C/15min)	%GH Alcalase		% GH Flavourzyme	
								Tirosina	Albumina	Tirosina	Albumina
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	7,94	33,44	5,21	23,94
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	7,78	34,73	4,91	22,51
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	8,00	33,73	5,93	27,62
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	6,66	29,41	4,55	19,55
5	1	1	-1	1	1	-1	1	5,57	23,62	6,00	27,95
6	1	1	1	-1	1	1	-1	5,28	23,06	5,89	25,91
7	-1	1	1	1	-1	1	1	3,75	15,90	5,24	22,84
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	5,22	22,28	7,57	35,79
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	7,02	31,08	5,51	24,05
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	6,85	30,34	6,33	27,90
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	5,77	25,35	3,74	15,85
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	7,23	31,65	6,32	22,74
13	0	0	0	0	0	0	0	7,06	31,14	6,25	27,35
14	0	0	0	0	0	0	0	6,81	30,00	6,26	27,44
15	0	0	0	0	0	0	0	7,21	31,87	6,22	27,24
16	0	0	0	0	0	0	0	6,51	28,68	5,98	26,18
17	0	0	0	0	0	0	0	7,28	32,25	5,96	26,08
18	0	0	0	0	0	0	0	6,81	30,07	6,27	27,54

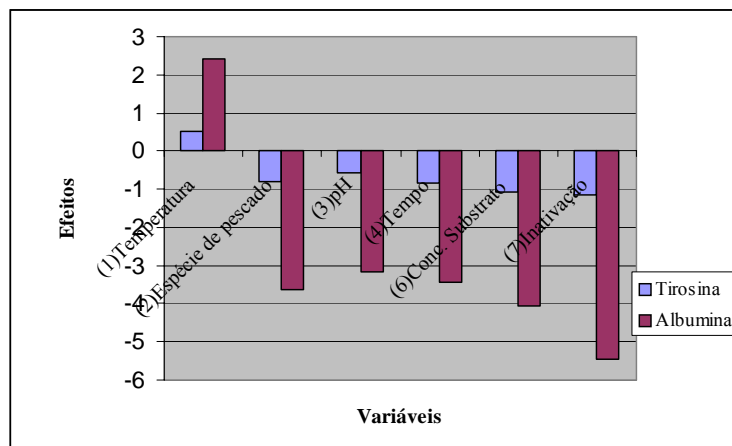
Para a Flavourzyme somente a temperatura não mostrou efeito significativo no processo o que significa que a reação pode ser realizada a temperaturas em torno de 50°C sem prejudicar o %GH final do hidrolisado. Enquanto que o pH, o tempo, a concentração da enzima e a temperatura de inativação da enzima apresentaram um efeito positivo na reação, demonstrando que o %GH aumentou com as variáveis nos níveis mais altos. Já a concentração do substrato obteve um efeito negativo, significando que o %GH é maior quando o mesmo está menos concentrado.

Comparando as duas enzimas pode-se constatar que as variáveis que influenciam no processo de hidrólise não são as mesmas. Mas a espécie de pescado e a concentração do substrato obtiveram efeitos iguais, apenas em intensidades diferentes como pode ser verificado nos gráficos 1 e 2. Também pode-se afirmar que a enzima Alcalase se mostrou mais termoresistente que a Flavourzyme, pois a mesma não foi inativada a uma temperatura de 80°C/15min, o que pode ser comprovado com seu efeito negativo maior que 5%.

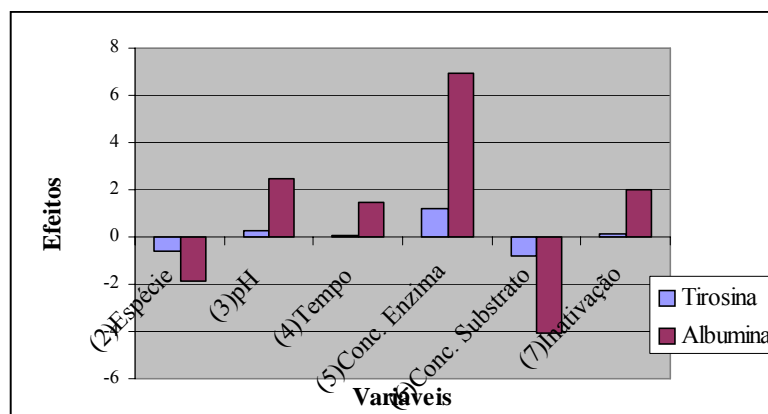
### 3 CONCLUSÃO

O comportamento das variáveis de maior importância no processamento de hidrolisado enzimático de pescado foi diferente para as enzimas avaliadas. No caso de Alcalase as variáveis que obtiveram maior efeito no processo foram temperatura, pH e concentração do substrato

enquanto que para Flavourzyme foram pH, concentração da enzima e concentração do substrato. A espécie que se mostrou mais apropriada ao processo foi a cabrinha.



**Gráfico 1** Comparação dos efeitos significativos a 90% de confiança para o Hidrolisado Enzimático de Pescado preparado com a enzima Alcalase. (R= 0,805537).



**Gráfico 2** Comparação dos efeitos significativos a 90% de confiança para o Hidrolisado Enzimático de Pescado preparado com a enzima Flavourzyme. (R= 0,907193).

#### 4 REFERÊNCIAS

HOYLE, N.; MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, p.76. 1994.

LICEAGA-GESUALDO, A. M., LI-CHAN E. C. Y.. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, 64(6): 1000-1004. 1999.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 43. 2000.