

## Área: Ciência de Alimentos

# ESTUDO DA DIGESTIBILIDADE DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE *Spirulina* sp. LEB-18

Aline Massia Pereira, Cristiane Reinaldo Lisboa, Jorge Alberto Vieira Costa\*

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

\*E-mail: [jorgealbertovc@terra.com.br](mailto:jorgealbertovc@terra.com.br)

**RESUMO** – Este trabalho teve como objetivo obter hidrolisados proteicos de origem microalgal com elevada digestibilidade. Os hidrolisados da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 foram obtidos através da ação da protease microbiana Protamax 580L. Realizou-se dois ensaios de hidrólise com os parâmetros concentração de substrato e tempo de reação distintos. Foi determinada a digestibilidade das proteínas da biomassa intacta e de seus hidrolisados. A digestibilidade da biomassa de *Spirulina* não hidrolisada apresentou-se igual a 73,63%, enquanto que a do hidrolisado de menor grau de hidrólise foi 90,91% e do hidrolisado de maior grau de hidrólise foi de aproximadamente 100%. Concluiu-se que a hidrólise enzimática das proteínas da biomassa aumentou a digestibilidade destas. A hidrólise proteica é capaz de diminuir o tamanho das moléculas de proteína, facilitando então seu processo de digestão. Logo, quanto maior o grau de hidrólise das proteínas, melhor o processo de digestão destas, o que as torna proteínas de maior valor nutricional para aplicação em alimentos.

**Palavras-chave:** Hidrólise Enzimática; Microalgas; Proteínas.

## 1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse no estudo de micro-organismos como microalgas, alguns fungos e bactérias deve-se à possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, na saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentícia, química e farmacêutica, dentre outras (RICHMOND, 2004).

A *Spirulina* é uma cianobactéria que tem despertado interesse de muitos pesquisadores devido ao seu elevado poder nutricional (SARADA et al., 1999). Possui biomassa rica em proteínas (50 a 70%), apresentando um grande potencial para a extração de biocompostos com alto valor agregado (MORAIS et al., 2009). De modo a melhorar a digestibilidade das proteínas, a hidrólise enzimática vem sendo citada em diversas pesquisas.

A modificação enzimática das proteínas apresenta vantagens quanto à hidrólise realizada por ácidos e álcalis (FONKWE E SINGH, 2005). É amplamente utilizada na indústria alimentícia para clivar ligações peptídicas específicas (TARDIOLLI, 2003).

O objetivo do trabalho foi hidrolisar a biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 e determinar a digestibilidade in vitro das proteínas da biomassa intacta e de seus hidrolisados.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Biomassa

A biomassa *Spirulina* sp. LEB-18 utilizada foi isolada da Lagoa Mangueira (MORAIS et al., 2008) e produzida na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica, localizada as margens da Lagoa Mangueira (33° 30' 13''S e 53° 08' 59'' W) na cidade de Santa Vitória do Palmar, Brasil. A biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 foi moída em moinho de bolas (Modelo Q298, QUIMIS), peneirada e caracterizada quanto a composição centesimal conforme a metodologia descrita pela AOAC (2005).

### 2.2. Enzima

Foi utilizada Protemax 580L de *Bacillus licheniformis* (Prozyn, São Paulo – SP). A atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µg de tirosina por minuto, dentro das condições usadas no estudo, segundo o método descrito por Ma et al. (2007).

### 2.3. Obtenção dos Hidrolisados Proteicos

As reações de hidrólise foram conduzidas em tampão bicarbonato carbonato de sódio pH 9,5 com volume total de 100 mL. Os erlenmeyers foram dispostos em “shaker” (Certomat BS-1) com agitação de 180 rpm e temperatura constante de 55 °C, temperatura ótima de atividade da enzima.

Duas reações de hidrólise foram realizadas com a enzima Protemax 580L em concentração fixa de 5 U.mL<sup>-1</sup>. A concentração de substrato e o tempo de reação foram distintos e determinados de acordo com estudos anteriores realizados que obtiveram menor e maior grau de hidrólise. O ensaio H1 foi realizado utilizando-se 8,8% de proteína da biomassa microalgal deixando-se reagir por 150 min. No ensaio H2, a concentração de proteína utilizada foi 4% e o tempo de reação empregado foi 200 min.

Ao término da reação, a enzima foi inativada termicamente a 85°C por 10 min. Após, os hidrolisados foram congelados por 24 horas a -70°C e liofilizados durante 48 horas.

### 2.4. Determinação do Grau de Hidrólise

Alíquotas de 1 mL de hidrolisado foram inativadas pela adição de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25 % e deixadas em repouso por 10 min. Posteriormente foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. Determinou-se o teor de proteínas

solúveis no filtrado utilizando o método de Folin-Lowry, expresso em mg de albumina. O grau de hidrólise foi estimado segundo o método descrito por Hoyle & Merrit (1994) com modificações, sendo expresso como a porcentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado segundo a Equação 1:

$$\%GH = \frac{(PS_{tf} - PS_{t0}) \times 100}{P_t} \quad (1)$$

onde o branco, PS t0, correspondeu à quantidade de proteína solúvel em TCA 6,25 % antes da adição da enzima; PS<sub>tf</sub> foi a quantidade de proteína solúvel em determinado tempo após a adição da enzima e P<sub>t</sub> foi a quantidade de proteína total na amostra determinada por micro Kjeldahl (N x 6,25).

## 2.5. Digestibilidade

A digestibilidade *in vitro* das proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 e de seus hidrolisados do ensaio de maior e menor grau de hidrólise foram determinados, em duplicata, conforme Akesson & Stahmann (1964). Esses ensaios foram analisados de modo a verificar a relação do grau de hidrólise com a digestibilidade. Cerca de 1g de amostra foi hidrolisada com 10 mL de uma solução de pepsina em pH ácido a 37°C por 3 horas sob agitação. Em seguida centrifugou-se a 5000 rpm por 15 min e filtrou-se as soluções, armazenado-se o sobrenadante sob refrigeração. Foi adicionado ao precipitado 10 mL de uma solução de pancreatina em pH neutro, deixando-se reagir por 24 h a 37°C em agitação contínua. Para interrupção da reação, utilizou-se de 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 30%. Completou-se o volume com TCA 5% e centrifugou-se e filtrando-se as soluções. A quantificação de proteína solúvel foi determinada pelo método de Folin-Lowry tomando-se 0,5 mL da solução hidrolisada pela pepsina e 0,5mL da solução hidrolisada pela pancreatina. A tirosina foi empregada como padrão de referência.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de composição centesimal para a biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 apresentaram teores iguais a 11,9 % de umidade, 51,6 % de proteínas, 7,8 % de cinzas e 7,0 % de lipídeos e os carboidratos, determinados por diferença, apresentaram-se igual a 21,4. A quantidade de proteína determinada apresentou-se coerente com a literatura. Este resultado foi utilizado para os cálculos da quantidade de biomassa utilizada nos experimentos.

A Tabela 1 apresenta os resultados de grau de hidrólise assim como os resultados de digestibilidade de cada ensaio.

Tabela 1. Grau de hidrólise e digestibilidade das proteínas de *Spirulina* sp. LEB-18

Ensaio	Grau de Hidrólise (%)**	Digestibilidade (%)**
H1	26,97 ± 0,37	90,91 ± 0,91
H2	62,85 ± 0,82	99,35 ± 0,64
NH*	-	73,63 ± 0,96

\*NH = biomassa não hidrolisada

\*\*media e desvio padrão

O menor grau de hidrólise atingido foi 26,9% e o maior grau de hidrólise foi 62,8%. Pode-se observar pela Tab. 2 que a hidrólise aumentou o grau de hidrólise das proteínas da biomassa estudada. Ambos hidrolisados apresentaram maior digestibilidade quando comparados com a digestibilidade da biomassa intacta. Além disso, o ensaio com maior grau de hidrólise apresentou maior digestibilidade em relação ao ensaio que apresentou menor grau de hidrólise, atingindo-se aproximadamente 100% de digestibilidade quando o grau de hidrólise foi 62,8%. Segundo Kristinsson & Rasco (2000) o tamanho da proteína hidrolisada é o fator chave na determinação das propriedades funcionais dos hidrolisados. Pode-se afirmar que a hidrólise enzimática de produtos proteicos é capaz de diminuir o tamanho das moléculas de proteína, facilitando então seu processo de digestão.

Maiores valores de digestibilidade de hidrolisados proteicos em relação a digestibilidade de seus substratos originais também foram encontradas por Maciel (2005) para penas de frango hidrolisadas com bactérias queratinolíticas. Negrão et al., (2005) estudou a digestibilidade de carne de frango mecanicamente separada não hidrolisada, já Rossi (2007) obteve os hidrolisados dessa matéria prima e encontrou maiores valores de digestibilidade em relação aos resultados de digestibilidade encontrados por Negrão et al., (2005).

## 4 CONCLUSÃO

O valor nutricional de uma proteína depende da sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, ausência de toxicidade e de fatores antinutricionais. Logo, o aumento da digestibilidade das proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18, de 73,63% da biomassa não hidrolisada para aproximadamente 100% através da hidrólise enzimática, aumenta o valor nutricional das proteínas para aplicação em alimentos.

## 5 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com auxílio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e da Rede Nanofotobiotec/CAPES.

## 6 REFERÊNCIAS

- AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **The Journal of Nutrition**, v. 83, n. 3, p. 257-261, 1964.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists international. 17.ed. Washington, D.C, 2005.
- FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 605-616. 1996.
- HOYLE, N.; MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, p. 76-79, 1994.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 43-81, 2000.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A.L. Farr and R. J. Randall. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **Journal Biology Chemistry**, v. 93, p. 265-275, 1951.
- MA, C., NI, X., CHI, Z., MA, L., GAO, L. Purification and Characterization of an alkaline protease from the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans* for Bioactive Peptide Production from Different Sources. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 343-351, 2007.
- MACIEL, J. L. Produção de hidrolisados proteicos de penas de frango utilizando bactérias queratinolíticas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2005. 55 p.
- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60 – 64, 2009.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and cultivation of a new strain of *Arthrospira* from Mangueira Lagoon in Southern Brazil. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 63, p. 144-150, 2008.
- NEGRÃO, C. C.; MIZUBUTTI, Y.; MORITA, M. C.; COLLI, C.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. **Food Chemistry**, London, v. 90, p.579-583, 2005.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford, London: **Blackwell Science**, 2004. 566 p.
- ROSSI, D. M. Utilização de carne mecanicamente separada de frango para produção de um hidrolisado protéico a partir de enzimas microbianas. Dissertação (Programa de Pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2007. 103p.
- SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: Influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin, **Process Biochemistry**, v. 34, p. 795 -801, 1999.

TARDIOLI, P. W. Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidases e alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos – SP, 2003. 173 p.