



CAPACIDADE HIDRÓLITICA DE ALCALASE VERSUS NOVO PRO D NA HIDRÓLISE DE CMS DE TILÁPIA

A.B. Antunes¹, N.M. Atanasio², A.I.S. Brígida³, F.S. Gomes³, C.M. Silva³, M.P. Stephan³

- 1- Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição. CEP 20559-900 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 2334-0722 – e-mail: (antunes.abnutri@gmail.com)
- 2- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. CEP 20260-100 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 3293-6000 – e-mail: (nathaaliarmartins@hotmail.com)
- 3- Embrapa Agroindústria de Alimentos. CEP 23020-470 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 3622-9600 – Fax: 55 (21) 3622-9713 – e-mail: (ana.iraiddy@embrapa.br; flavia.gomes@embrapa.br; caroline.mellinger@embrapa.br; marilia.stephan@embrapa.br)

RESUMO – A hidrólise enzimática parcial das proteínas de carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia pode incrementar suas propriedades funcionais agregando valor e tornando esta uma boa alternativa para o aproveitamento destes resíduos agroindustriais. Assim, duas enzimas foram investigadas quanto ao seu potencial catalítico de hidrólise em CMS de tilápia, Alcalase[®] e Novo Pro-D[®]. Durante 5 horas de reação o grau de hidrólise foi acompanhado e, em tempos pré-definidos, frações do meio reacional foram coletadas. As amostras foram analisadas quanto sua atividade antioxidante, capacidade emulsificante, teor de aminoácidos aromáticos livres e perfil proteico. Embora Novo Pro D[®] tenha apresentado maior grau de hidrólise (55%) frente à Alcalase[®] (42%), esta última apresentou maior atividade antioxidante (600 µmol TEAC/g de proteína). Em termos de capacidade emulsificante, ambas as enzimas promoveram uma redução desta propriedade em seus hidrolisados.

ABSTRACT – The partial enzymatic hydrolysis of mechanically separated meat (MDM) of tilapia can improve their functional properties adding value and making this a good alternative to utilization of this agro-industrial waste. Therefore, two enzymes were investigated for their catalytic potential for tilapia MDM hydrolysis, Alcalase[®] and Novo Pro-D[®]. Degree of hydrolysis was monitored during 5 hours of reaction and, at predefined times, the reaction medium fractions were collected. The samples were analyzed for their antioxidant activity, emulsifying capacity, free aromatic amino acid content and protein profile. Although Novo Pro D[®] had a greater degree of hydrolysis (55%) compared to Alcalase[®] (42%), the latter showed higher antioxidant activity (600 µmol TEAC/g of protein). In terms of emulsifying capacity, both enzymes promoted a reduction of this property.

PALAVRAS-CHAVE: coproduto; hidrolisado proteico; capacidade antioxidante; proteases.

KEYWORDS: co-product; protein hydrolysate; antioxidant capacity; proteases.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os peixes mais criados do mundo, a tilápia se destaca sendo um dos produtos aquícolas mais importantes do século 21. No Brasil, a produção de tilápia em 2012 foi de 210.000 toneladas, sendo hoje a principal espécie cultivada em território nacional, especialmente na região Nordeste, Sudeste e Sul, onde representam aproximadamente 83 a 88% da produção total de peixe destas regiões (MPA, 2012). E apesar da maior produção no Brasil representar o comércio de peixe



vivo, tem-se observado um aumento crescente na comercialização do pescado beneficiado. O comércio do pescado beneficiado abrange a venda do peixe inteiro eviscerado, a produção de filé, bem como produtos processados. A filetagem mecânica de tilápia gera de 60 a 70%, em peso, de subprodutos e resíduos, o que reflete um baixo rendimento de filé (Chen et al., 2007). Tradicionalmente, parte desses subprodutos é aproveitada na obtenção de silagem e fertilizantes, contudo, no mercado internacional o lucro é baixo, sendo em torno de 50 centavos de dólar por tonelada, o que tem estimulado a busca pelo desenvolvimento de aplicações que gerem produtos de maior valor agregado (He et al., 2013).

Por esses resíduos apresentarem um alto teor de proteína, uma das alternativas é o uso destes para obtenção de hidrolisados proteicos. Este produto de valor agregado atualmente possui aplicação nos alimentos como flavorizante de sopas e análogos mariscos, enquanto é empregado nas rações principalmente como substituto do leite no desmame de bezerros e leitões e como elemento atrativo em rações para peixes (Furlan et al., 2002). Contudo, a modificação enzimática de proteínas utilizando enzimas proteolíticas vem sendo uma alternativa promissora na obtenção de hidrolisados proteicos funcionais. Estas funcionalidades podem ser tecnológicas, como capacidade espumante, capacidade emulsificante, solubilidade, capacidade crioprotetora, ou biológicas, como atividade antioxidante, atividade anti-hipertensiva, atividade opioide. A hidrólise enzimática das proteínas é um processo complexo devido às muitas ligações peptídicas e sua acessibilidade específica para reações enzimáticas. A especificidade das enzimas, junto com pH e temperatura de reação, são os principais fatores que afeta o perfil dos peptídeos no produto final. Desta forma, a especificidade da protease e as condições de reação são fundamentais para obtenção dos peptídeos de interesse (He et al., 2013). No presente estudo, avaliou-se a capacidade hidrolítica de duas enzimas comerciais (Alcalase[®] e Novo Pro D[®]) para obtenção de hidrolisado de CMS de tilápia com atividade antioxidante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

As enzimas Alcalase[®] e Novo Pro D[®] foram gentilmente cedidas pela Novozymes. A carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia foi produzida pela Cooperativa Regional de Piscicultores e Rancultores do Vale do Macacu e Adjacências Ltda. Os reagentes 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfonato (ABTS), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (trolox), tirosina e hexadecano foram adquiridos pela Sigma-Aldrich. Demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Processo de obtenção do hidrolisado

À CMS de tilápia adicionou-se água destilada na proporção 1:4, em peso, e homogeneizou-se em blender para obtenção da suspensão a ser hidrolisada. Desta solução foi coletado o branco da amostra (Br). O pH e temperatura do meio reacional foram ajustados conforme condições previamente definidas (50°C e pH 8). Em seguida, adicionou-se o volume de enzima adequado de forma a manter a relação enzima:substrato de 1:5, em peso, e esperou-se 1 min para a coleta do ponto 0 hora (0h). As hidrólises foram realizadas sob agitação, mantendo pH e temperatura constante, em reatores de vidro encamisados. O ajuste do pH durante a reação foi realizado com a adição contínua de NaOH 5M. Além do Br e 0h, foram realizadas amostragem em 0,5 hora, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas e 5 horas de reação. A interrupção da reação foi realizada por aquecimento da amostra à 80°C durante 15 minutos e posterior banho de gelo. O grau de hidrólise (GH) foi determinado conforme Foh et al. (2010). As amostras coletadas foram analisadas quanto sua atividade antioxidante, capacidade emulsificante, teor de aminoácidos aromáticos livres e perfil proteico. Os experimentos de hidrólise foram realizados em triplicata.



2.3 Capacidade emulsificante

A capacidade emulsificante foi avaliada através da determinação do índice de emulsificação em hexadecano (Mellinger-Silva et al., 2015). A solução de proteína ou hidrolisado proteico (0,5%, p/v) foi preparada a partir da ressuspensão de amostra, previamente liofilizada, em água destilada a pH 7. As análises foram realizadas em quadruplicata.

2.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade de captura do radical livre ABTS+ conforme descrito por Rufino et al. (2007). Foi realizado preparo do radical ABTS+ a partir da reação de 5 ml de solução ABTS 7,0 mM e 88µl de solução de persulfato de potássio 140 mM. O radical permaneceu em reação por 16 horas, em temperatura ambiente e ausência de luz. Após formado o radical ABTS+, foi adicionado etanol P.A até obtenção de absorbância 0,700 ($\pm 0,2$) a 734nm. Para a análise, 3 ml de radical foram adicionados à 30 µl de amostra, submetidas a agitação em vortex e após 6 minutos foi realizada leitura em espectrofotômetro. As análises foram realizadas em triplicata e o espectrofotômetro foi calibrado a partir da leitura de etanol P.A 95%. Os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico)) em µmol TEAC.g⁻¹ de proteína.

2.5 Dosagem de aminoácidos aromáticos livres

O teor de aminoácidos aromáticos livres durante a hidrólise foi determinado conforme Mellinger-Silva et al. (2015) através de método espectrofotométrico. Foi adicionado 1 ml de ácido tricloroacético 10% (TCA) à 1 ml de amostra e, posteriormente, centrifugado por 30 minutos à 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio e a leitura da absorbância foi realizada em espectrômetro à 280 nm. Soluções de concentrações conhecidas de tirosina foram utilizadas como padrão.

2.6 Perfil proteico por SDS-PAGE

Amostras contendo quantidades conhecidas de proteína foram adicionadas a igual volume de tampão de amostra (Tris-HCl 2 mol.l⁻¹ pH 6,8, EDTA 0,2 mol/l, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,5%), fervidas por dois minutos, centrifugadas rapidamente e aplicadas em géis de 10 % de SDS-poliacrilamida. Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie de acordo com protocolos descritos na literatura (Laemmli, 1970). Marcadores de alto peso molecular (Miosina – 195,3kDa; β-galactosidade – 102,5kDa; BSA – 56,0kDa; Ovalbumina – 40,7kDa) foram utilizados como padrões (P).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

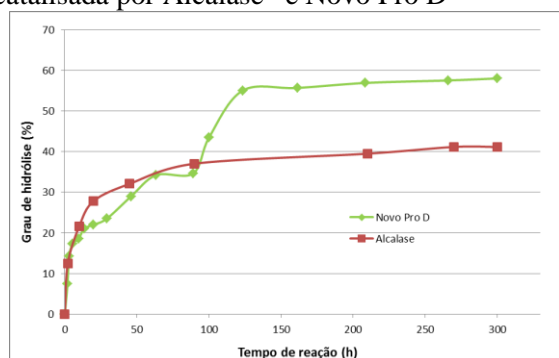
O presente estudo avaliou a capacidade hidrolítica de duas enzimas comerciais (Alcalase[®] e Novo Pro D[®]) para obtenção de hidrolisado de CMS de tilápia processada em blender. Durante o estudo comparou-se a influência de cada enzima no grau de hidrólise, no teor de tirosina livre, no perfil proteico, na atividade antioxidante do hidrolisado e na capacidade emulsificante do hidrolisado.

A cinética da reação de hidrólise foi acompanhada tanto pela obtenção do grau de hidrólise (Figura 1a) quanto pelo teor de aminoácidos aromáticos livres (Figura 1b). Ambos os métodos tiveram perfis similares para cada enzima estudada. Até 10 min de reação, os valores de grau de hidrólise não diferem para ambas as enzimas, contudo, enquanto a Alcalase[®] estabiliza a hidrólise próximo a 100 min, a Novo Pro D[®] apresenta um perfil de estabilização um pouco mais lento devido ao aumento considerável até 120 min. Com cinco horas de reação, o grau de hidrólise final para Alcalase[®] e Novo Pro D[®] é 41% e 56%, respectivamente, e o valor de aminoácido aromático livre é 0,15 e 0,22 mg/mL.

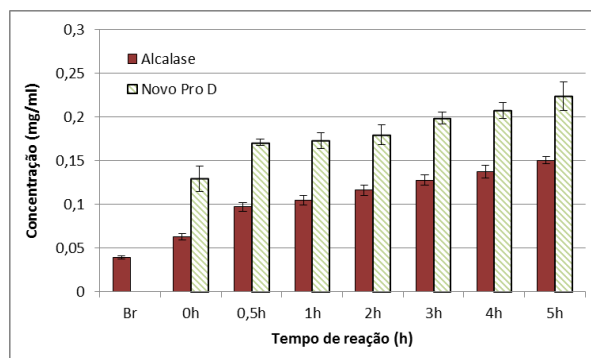


Foh et al. (2010) obteve 25% de grau de hidrólise em estudo de hidrólise de carne de tilápia com Alcalase[®] em duas horas de reação, valor inferior ao observado neste trabalho (40%) para o mesmo tempo de reação. Valor de GH similar a este trabalho foi encontrado por Yarnpakdee et al. (2015), 40%, o qual também observou maior grau de hidrólise para Alcalase[®] frente Flavourzyme[®] e Protamex[®].

Figura 1 – Grau de hidrólise (a) e teor de aminoácidos aromáticos livres (b) na hidrólise de CMS catalisada por Alcalase[®] e Novo Pro D[®]



(a)



(b)

A diferença de concentração nos teores de aminoácidos aromáticos livres para as reações com diferentes enzimas faz referência as preferências de clivagem das ligações peptídicas nas hidrólises catalisadas por estas e ao número de ligações quebradas. Semelhante ao grau de hidrólise (Figura 1a), o teor de aminoácidos aromáticos livres para Novo Pro D[®] foram maiores que para reação catalisada por Alcalase[®] (Figura 1b). Esta diferença na preferência de clivagem também pode ser visualizada se os teores de aminoácidos totais forem analisados. Foh et al. (2010) e Yarnpakdee et al. (2015), por exemplo, analisaram os perfis de aminoácidos totais de cada hidrolisado de tilápia obtido utilizando enzimas distintas. Ambos observaram variação na concentração dos aminoácidos analisados dependendo da enzima aplicada.

O perfil proteico da amostra antes da hidrólise e durante o processo de hidrólise (Figura 2) mostra que ocorre hidrólise da estrutura proteica logo no primeiro minuto de reação, que se justifica pelo aumento expressivo de grau de hidrólise nos primeiros minutos (Figura 1a). Também, mancha de aglomerado peptídico é observado em 0 e 0,5h para hidrólise com Alcalase[®] e apenas em 0,5 h na hidrólise com Novo Pro D[®].

Como o objetivo da hidrólise é agregar valor ao coproduto CMS de tilápia, uma característica funcional de interesse é a atividade antioxidante do hidrolisado. Desta forma, a capacidade de sequestrar radicais livres foi avaliada fazendo uso de ABST. Na Figura 3a observa-se a atividade dos hidrolisados obtidos tanto aplicando Alcalase[®] quanto Novo Pro D[®] como catalisador. Maior atividade é observada quando a reação é catalisada por Alcalase[®]. O aumento de atividade com o tempo comprova que, mesmo em baixa taxa reacional, a hidrólise está ocorrendo e gerando peptídeos ativos. Já a reação catalisada por Novo Pro D[®] tende a expressar um máximo de atividade em 3 horas de reação sofrendo perdas em tempos maiores. Apesar de maior grau de hidrólise observado para Alcalase[®] frente a Neutrase[®], Foh et al (2010) observaram capacidade sequestrante de ABTS iguais para ambas as enzimas. Dentre algumas proteases, Yarnpakdee et al. (2015) também encontrou maior atividade antioxidante (130 $\mu\text{mol TEAC/g}$ de sólido) para hidrolisados obtidos por Alcalase[®].

Na Figura 3b observa-se a capacidade emulsificante da suspensão obtida com CMS de tilápia e seus hidrolisados obtidos tanto aplicando Alcalase[®] quanto Novo Pro D[®]. Logo no primeiro minuto de reação (ponto de 0h) observou-se perda de quase 100% desta propriedade, independente da enzima



utilizada. Utilizando outro método com óleo de soja, também foi observada uma redução da capacidade emulsionante frente a inicial.

Figura 2 – Perfil proteico durante a hidrólise de CMS catalisada por: (a) Alcalase® e (b) Novo Pro D®.

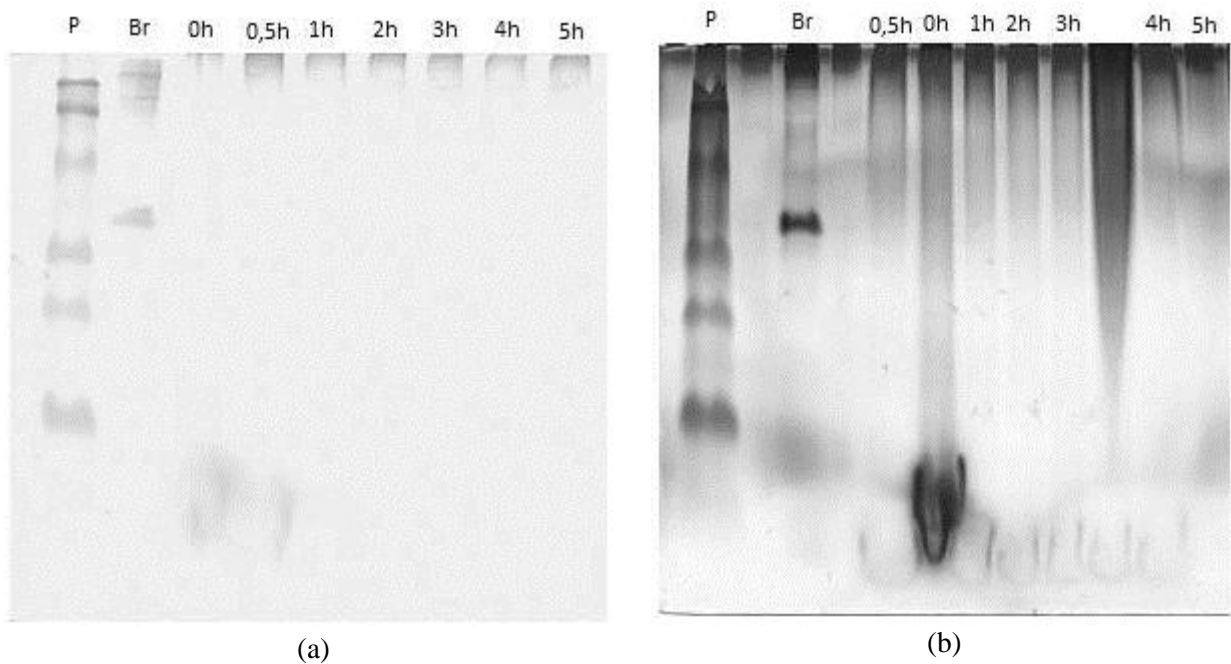
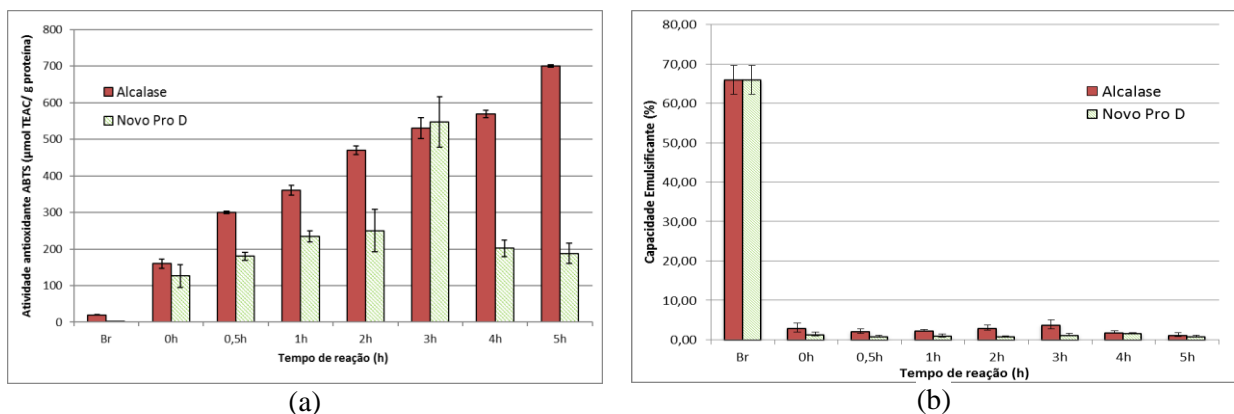


Figura 3 – Atividade antioxidante determinada por sequestro de ABTS (a) e capacidade emulsificante (b) obtidas com CMS de tilápia e seus hidrolisados de CMS de tilápia.



4. CONCLUSÕES

Frente às duas enzimas estudadas, a obtenção de hidrolisado de CMS de tilápia com atividade antioxidante é mais eficiente fazendo uso de Alcalase® como biocatalisador. Contudo, caso essa característica não seja a mais importante e prevaleça apenas a transformação da proteína em peptídeos, tem-se que a mais indicada é a Novo Pro D® por promover maior grau de hidrólise num mesmo tempo reacional.



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chen, Y. C.; Tou, J. C.; Jaczynski, J. (2007). Amino acid, fatty acid, and mineral profiles of materials recovered from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by-products using isoelectric solubilization/precipitation. *Journal of Food Science*, 72, C527-C535.
- Foh, M. B. K.; Amadou, I.; Foh, B. M.; Kamara, M. T.; Xia, W. (2010). Functionality and antioxidante properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1851-1869.
- Furlan, E. F.; Oetterer M. (2002) Hidrolisado Proteico Pescado: Fish Protein Hydrolysed. *Revista de Ciencia & Tecnologia*, 10 (19), 79-89.
- He, S.; Franco, C.; Zhang, W. (2013) Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50, 289-297.
- Furlan, E. F.; Oetterer M. (2002) Hidrolisado Proteico Pescado: Fish Protein Hydrolysed. *Revista de Ciencia & Tecnologia*, 10 (19), 79-89.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Mellinger-Silva, C.; Rosa, I. O. L.; Stephan, M. P.; Brigida, A. I. S.; Cabral, L. M. C.; Silva, G. O.; Guarido, K. L.; Gomes, D. M.; Silva-Santos, J. E. (2015) Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 48, 73-79.
- MPA. 2012. Boletim estatístico da pesca e aquicultura – Brasil 2010. Brasília. 129 pp.
- Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M., Sampaio, C. G, Jimenez, J. P.; Calixto, F. D .S. (2007). Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico Embrapa, 127, 1-4.
- Yarnpakdee, S.; Benjakul, S.; Kristinsson, H. G.; Kishimura, H. (2015). Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one- and two-step hydrolysis. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3336-3349.