

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES COMERCIAIS EM PROTEÍNAS DE SEMENTE DE ABÓBORA

PEREIRA, G. Z.¹; PACHECO, A. F. C.¹; CUNHA, J. S.¹; PAIVA, P. H. C.²; TRIBST, A.A. L.³; LEITE JÚNIOR, B. R. C.¹

¹Universidade Federal de Viçosa; ²Instituto de Laticínios Cândido Tostes - EPAMIG.;

³Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação NEPA-UNICAMP.

RESUMO

As sementes de abóbora são resíduos com elevado teor de proteínas. A hidrólise enzimática dessas proteínas é uma estratégia para geração de hidrolisados proteicos de alto valor agregado e elevada aplicação industrial. O processo de hidrólise é determinado por alguns fatores como a natureza e especificidade da enzima. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade enzimática da Flavourzyme®, Brauzyn® e Neutrase® utilizando proteínas de sementes de abóbora (PSA) como substrato. A Flavourzyme® teve a maior atividade enzimática relativa, enquanto que a Neutrase® a menor atividade enzimática relativa. A partir do experimento foi possível concluir que algumas características distintas das enzimas, bem como a sua especificidade, influenciaram na atividade enzimática de cada enzima.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática; Semente de abóbora; Enzimas comerciais.

INTRODUÇÃO

A Abóbora (*Cucurbita pepo*), da família Cucurbitaceae, é amplamente usada na indústria alimentícia como matéria-prima para produção de doces, geleias, compotas e conservas. As sementes de abóbora constituem cerca de 3,2 a 4% dos frutos inteiros e geralmente são descartadas como resíduos (DHURVE; ARORA, 2021). Contudo, o estudo dessas sementes tem despertado interesse de pesquisadores, principalmente por ser rica em proteínas, cujo teor varia de 24,5 a 36,0% (BUČKO et al., 2015; BUČKO et al., 2016).

O uso de proteínas vegetais em formulações ainda é limitado por sua baixa solubilidade em meio aquoso (OMURA et al., 2021), o que impacta em outras propriedades técnico-funcionais, como emulsificantes, capacidade de retenção de água e óleo, capacidade formação de espuma, etc. Uma forma de melhorar a solubilidade da proteína da semente de abóbora e potencializar sua aplicabilidade é obtendo hidrolisados proteicos a partir de hidrólise enzimática.

A adição de enzimas para hidrolisar as proteínas dos alimentos é um método reconhecido por melhorar ou modificar as propriedades físico-químicas, técnico-funcionais e sensoriais das proteínas, sem prejudicar o seu valor nutritivo (GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994). Além disso, esses hidrolisados proteicos podem conter peptídeos com propriedades potencialmente biológicas, como atividade antioxidantes, antidiabéticos, anti-hipertensivos, etc.

O processo de hidrólise é determinado por alguns fatores como: natureza e especificidade da enzima utilizada na catálise, natureza do substrato, condições de processamento e razão enzima/substrato. Tais fatores irão influenciar no peso molecular, na composição e sequência dos aminoácidos e, portanto, impactam em suas propriedades técnico-funcionais dos hidrolisados obtidos (NASRI, 2016).

A Flavourzyme® é uma protease comumente usada na indústria alimentícia. É um complexo enzimático que contém atividades de endo e exopeptidase. As endopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas dentro de moléculas de proteínas e as exopeptidases hidrolisam os aminoácidos no final das cadeias peptídicas (HU et al., 2021). A Brauzyn® é uma preparação comercial de protease vegetal designada para a ruptura de paredes celulares de leveduras (MARSON et al., 2019). A Neutrase® é uma endopeptidase produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* e apresenta uma atividades ótima em temperaturas entre 45°C e 55°C e pH entre 5,5 e 7,5 (DAMRONGASAKKUL et al., 2008).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade enzimática da Flavourzyme®, Brauzyn® e Neutrase® utilizando proteínas de semente de abóbora (PSA) como substrato.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Inovação no Processamento de Alimentos (LIPA) e na planta piloto do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para o presente estudo, foram utilizadas as enzimas comerciais Brauzyn®, doada pela Prozyn Biosolutions (São Paulo, Brasil), Neutrase® e Flavourzyme® doadas pela Novozymes Latino Americana Ltda (Paraná, Brasil).

Extração das proteínas da semente de abóbora (PSA)

As sementes de abóbora (*Curcubita pepo*) foram adquiridas por doação da empresa Doces Mirahy localizada na cidade de Miraf (Minas Gerais, Brasil). As sementes de abóbora foram armazenadas e congeladas em um freezer com temperatura de aproximadamente -18°C. A obtenção das proteínas das sementes de abóbora (PSA) seguiu a metodologia de extração alcalina com precipitação isoelétrica conforme descrito por Bučko et al. (2016) com algumas modificações.

Para isso, as sementes foram lavadas com solução de cloro 250 ppm por 10 min para diminuição da carga microbiana. As sementes de abóbora foram descascadas manualmente para obtenção da polpa e, posteriormente, foram moídas em um moedor analítico (IKA, Alemanha).

Após moagem, foram realizadas duas etapas de desengorduramento com éter de petróleo. A primeira etapa foi realizada na proporção de 1:3 e a segunda na proporção de 1:1. Essas etapas foram realizadas em temperatura de refrigeração (4 °C) por 1 hora e após a segunda etapa, foram deixadas secando ao ar em temperatura ambiente até peso constante. A semente

de abóbora desengordurada foi misturada com água destilada estéril (proporção 1:10) e em seguida adicionado uma solução alcalina (NaOH 1mol/L) até atingir pH 10,00. Essa suspensão foi agitada suavemente por 30 min e posteriormente foi filtrada com papel filtro qualitativo Whatman n°1 a 4 °C.

As proteínas dissolvidas no filtrado foram precipitadas com solução ácida (HCl 1 mol/L) por meio do abaixamento do pH até 5,0. O precipitado foi separado da fase líquida por filtração com papel filtro qualitativo Whatman n°1 a 4 °C e, posteriormente, liofilizado para obtenção do pó de PSA, que foi envasado à vácuo em embalagens de polietileno de alta densidade e armazenado no freezer (-18 °C).

Determinação da atividade das enzimas comerciais usando a PSA como substrato

A atividade enzimática das proteases foi determinada de acordo com os procedimentos descritos por Leite Júnior et al. (2014). Para isso, no meio reacional, uma alíquota da solução de PSA (1% p/v) dispersa sob agitação em solução tampão de fosfato de sódio (0,1 mol/L) com pH 7,5 foi mantida em um banho termostático com a temperatura de 55 °C por 5 minutos. Após esse período, uma alíquota da solução enzimática foi adicionada no respectivo tampão (fosfato de sódio 0,1 mol/L) na concentração de 0,5% (v/v), conforme recomendado pelas fichas técnicas fornecidas pelos fabricantes, e o tempo de hidrólise foi estipulado em 30 minutos (conforme previamente determinado para leituras dentro da zona de linearidade). Após esse período, a reação foi paralisada com solução de ácido tricloroacético (TCA) (20%) na proporção de 1:1. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 7.510 g por 15 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi mensurado em um espectrofotômetro UV-visível (DU 1800, Shimadzu) a uma absorvância de 280 nm. Um controle foi preparado, em que o TCA foi adicionado antes da solução enzimática e o ΔAbs_{280nm} foi determinado a partir da diferença na absorvância entre a amostra e o branco. Uma unidade de atividade de enzima (U) foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima necessária para promover um aumento de 0,1 na absorvância a 280 nm, sob as condições do ensaio. Todo o ensaio foi realizado em três repetições e a atividade enzimática foi calculada de acordo com a equação 1 (Eq. 1).

$$U/mL = \frac{\Delta Abs_{280nm} \times 10 \times \text{fator da diluição}}{\text{Volume da solução enzimática} \times \text{tempo de hidrólise}} \quad (\text{Eq. 1})$$

A condição avaliada com maior atividade foi estabelecida como ótima, com 100% da atividade enzimática. A atividade enzimática relativa (AER) foi calculada de acordo com a equação 2 (Eq. 2).

$$AER (\%) = \left(\frac{\text{máxima atividade obtida}}{\text{atividade em condição não máxima}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Desenho experimental e análise estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os processos foram realizados com três repetições independentes, e as análises foram realizadas em triplicata para cada repetição de processamento ($n = 9$). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Os dados de AER foram analisados usando ANOVA pelo teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade (Statistical Analysis System - SAS Institute, Cary, NC, EUA; versão 9.2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 são apresentados os valores da atividade enzimática relativa das diferentes enzimas comerciais (Brauzyn®, Flavourzyme®, Neutrase®) utilizando as proteínas de sementes de abóbora como substrato. A hidrólise foi conduzida em pH 7,5 e temperatura de 55 °C por 30 min. Essas condições foram definidas baseada na atividade ótima de pH e temperatura de cada enzima, bem como nas condições industriais comumente aplicadas.

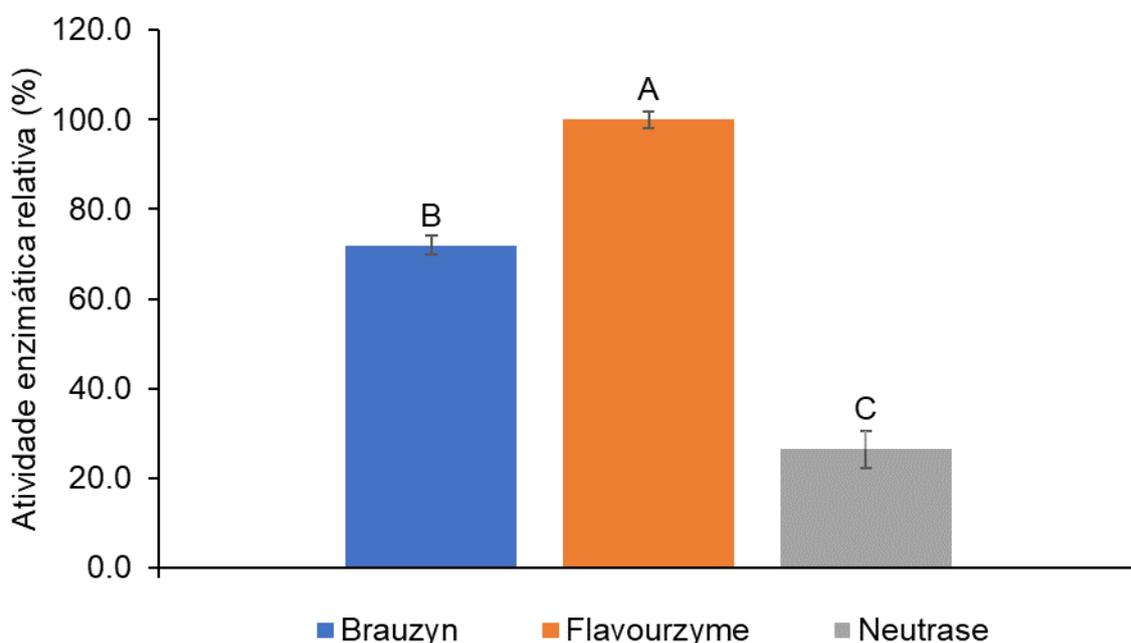


Figura 1. Atividade enzimática relativa (%) das enzimas comerciais usando as proteínas da semente de abóbora como substrato. Letra diferente em cada tratamento indica diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

Com base nos resultados obtidos, podemos observar que a Flavourzyme® foi a enzima que apresentou a maior atividade em relação às demais ($p < 0,05$). A Brauzyn® apresentou uma redução de 28,1% na AER comparada Flavourzyme® ($p < 0,05$) e a Neutrase® foi a enzima com a menor atividade, com apenas 26,4% de AER comparada a Flavourzyme® ($p < 0,05$). A maior AER apresentada pela Flavourzyme® se deve à maior especificidade desta enzima com as proteínas da semente de abóbora e também devido sua composição, que é formada por um pool de endo e exopeptidases, que aumentam o seu grau de ação em comparação com outras enzimas. Por outro lado, a menor atividade enzimática da Neutrase® pode ser explicada pela menor especificidade com as PSA. A especificidade das proteases impacta diretamente nas características dos hidrolisados, pois afeta a composição e sequências de aminoácidos e o peso molecular dos peptídeos obtidos (TKACZEWSKA, 2020).

Bucko et al. (2016) avaliaram a hidrólise enzimática do isolado proteico da semente de abóbora utilizando as enzimas alcalase e pepsina. Esses autores verificaram que os hidrolisados obtidos apresentaram diferentes pesos moleculares e distintas atividades técnico-funcionais, o que foi explicado pela diferença de especificidade entre as enzimas. Desta forma, trabalhos futuros utilizando as enzimas comerciais apresentadas em nosso estudo são necessários para investigar o potencial técnico-funcional, bem como o potencial biológico desses hidrolisados. Entretanto, devido à maior atividade da Flavourzyme®, essa enzima pode ser a escolhida para avaliação visando uma maior produção de peptídeos multifuncionais.

CONCLUSÕES

A partir das hidrólises realizadas com enzimas comerciais, foi possível concluir que algumas características distintas das enzimas, bem como a sua especificidade, influenciaram na atividade enzimática de cada enzima, sendo que a Flavourzyme® obteve o melhor resultado usando como substrato a proteína extraída da semente de abóbora, demonstrando maior especificidade para esse substrato em comparação com as enzimas Brauzyn® e a Neutrase®. Neste contexto, trabalhos futuros devem ser realizados utilizando a Flavourzyme® para investigar o potencial técnico-funcional, bem como o potencial biológico desses hidrolisados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES - Código Financiamento 001; à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto APQ-00388-21 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de desenvolvimento tecnológico outorgada a B.R.C. Leite Júnior e A.A.L Tribst (306514/2020-6; 305050/2020-6, respectivamente).

REFERÊNCIAS

BUČKO, S. et al. Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. **Food Hydrocolloid**, v. 60, p. 271–278, 2016.

BUČKO, S. et al. Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 609–615, 2015.

DAMRONGSAKKUL, S. et al. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and Neutrase. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Washington, v. 14, n. 2, p. 202-206, 2008.

DHURVE, P.; ARORA, V. K. Investigation of geometric and gravimetric properties of pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*) under tray drying. **Materials Today: Proceedings**, 2021.

GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PAEZ, M. P.; GUADIZ, E. M.; Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. **Biotechnol. Bioeng**, v. 44, p. 523.1994.

HU, J.; LIU, Y.; AN, G.; ZHANG, J.; ZHAO, X.; ZHANG, P.; WANG, Z. Characteristics of molecular composition and its anti-nutrition of β -conglycinin during flavorzyme proteolysis. **Food Bioscience**, v. 42. 2021.

LEITE JÚNIOR, B.R.C., TRIBST, A.A.L., & CRISTIANINI, M. Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 21, p.44-49, 2014.

MARSON, G. V.; MACHADO, M. T. C.; CASTRO, R. J. S.; HUBINGER, M. D. Sequential hydrolysis of spent brewer's yeast improved its physico-chemical characteristics and antioxidant properties: A strategy to transform waste into added-value biomolecules. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 91-102.2019.

NASRI, M. Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. 1. ed. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2016.

OMURA, M. H. et al. Effects of protein concentration during ultrasonic processing on physicochemical properties and techno-functionality of plant food proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106457, Apr. 2021.

TKACZEWSKA, J. Peptides and protein hydrolysates as food preservatives and bioactive components of edible films and coatings - A review. **Trends in Food Science & Technology**, v 106, p. 298-311, dez. 2020,