

INFLUÊNCIA DA POTÊNCIA DE PREPARO DA SUSPENSÃO NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUO DE TIRA-VIRA

Ingrid Dal Cin Alves¹, Sidinea Cordeiro de Freitas², Jeane Santos da Rosa², Caroline Mellinger Silva², Angela Aparecida Lemos Furtado², Ana Iraidy Santa Brígida^{2,3*}

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia (IT), Departamento de Engenharia Química, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

²Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro - RJ – Brasil.

³Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza - CE – Brasil.

*Autor para correspondências: ana.iraidy@embrapa.br

RESUMO

Uma forma de aproveitamento de resíduos provenientes da produção de pescado é a hidrólise enzimática das proteínas presentes nesses resíduos, o que pode gerar uma melhora nas propriedades funcionais e, conseqüentemente, a obtenção de produtos com maior valor agregado. Neste trabalho, investigou-se a influência da potência de processamento da suspensão de proteína de pescado (resíduo de Tira-Vira) na hidrólise enzimática. O grau de hidrólise foi acompanhado ao longo da reação e as amostras foram avaliadas quanto ao teor de aminoácidos livres, capacidade emulsificante e atividade antioxidante. Em condições reacionais de 50°C e pH 8,0, fazendo uso de alcalase[®] como biocatalisador, foi observado um grau de hidrólise de 19% após 5 horas de reação, independentemente da potência utilizada no preparo da suspensão. A capacidade emulsificante e a atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos apresentaram comportamentos similares, independente da potência aplicada. Desta forma, nas condições estudadas, a potência de processamento da suspensão de tira-vira não demonstra influência na qualidade do hidrolisado obtido.

Palavras-chave: hidrolisado proteico; alcalase; atividade antioxidante; capacidade emulsificante.

1. INTRODUÇÃO

O peixe Tira-Vira, como é conhecido popularmente no Brasil a espécie *Percophis brasiliensis*, é encontrado em águas costeiras do sudoeste do Atlântico. Pertencente à família Percophidae, essa espécie também é conhecida como Brazilian flathead, Pez Palo e Ajourreal e sua distribuição se estende de 23 °S (Rio de Janeiro, Brasil) para 47 °S (norte da província de Santa Cruz, Argentina). Sua comercialização é na forma de filés frescos ou congelados e sua exploração ocorre por meio de pesca multiespécies (Barretto *et al.*, 2011; Sánchez Pascua *et al.*, 2010). O país que mais produz o peixe Tira-Vira é a Argentina, com 7913 t de produção média no intervalo de 2005 a 2015. No Brasil, a produção média foi de 757 t e no mundo foi de 8670 t (FAO, 2015).

A produção e comercialização de pescado geram subprodutos e resíduos que muitas vezes são utilizados em produtos de baixo valor agregado ou descartados. Uma maneira de recuperar proteínas e converter esses subprodutos em produtos de maior valor agregado é a hidrólise enzimática, podendo, inclusive, promover uma melhora nas propriedades funcionais dos derivados proteicos, como solubilidade, capacidade e estabilidade emulsificante e capacidade de formação de espuma (Je *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2017).

Para obtenção de hidrolisados proteicos de matrizes de pescado, diversas proteases vêm sendo investigada. Harnedy *et al.* (2018), por exemplo, aplicou diferentes proteases para estudar a atividade antidiabética de hidrolisados de gelatina de pele de salmão (*Salmo salar*). Dentre as proteases comerciais estudadas, uma de grande aplicação e que tem demonstrado eficiência na hidrólise de matrizes de pescado é a

alcalase[®]. Esta enzima é uma solução de protease produzida pela Novozymes, onde a enzima dominante é uma subtilisina produzida por um *Bacillus licheniformis* via fermentação submersa (Li *et al.*, 2016).

A alcalase[®] tem sido aplicada na hidrólise de proteínas provenientes de diferentes fontes, visando a obtenção de hidrolisados proteicos com propriedades funcionais de interesse à indústria alimentícia e farmacêutica. Foh *et al.* (2010), por exemplo, obteve hidrolisado de carne de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com 25% de grau de hidrólise e atividade antioxidante de 87%. Para a matriz de Tira-Vira, até o presente momento, não foi encontrado qualquer trabalho de obtenção de hidrolisado proteico, seja com alcalase[®] ou qualquer outra protease. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência da potência de processamento no preparo da suspensão na hidrólise enzimática e nas propriedades funcionais do hidrolisado de resíduo de Tira-Vira utilizando alcalase[®].

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais

Alcalase[®] foi cedida pela Novozymes. O resíduo de Tira-Vira utilizado foi obtido após processamento de filetagem e extração de carne mecanicamente separada (CMS) a partir de peixes frescos adquiridos em Niterói. Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido-carboxílico) e padrão de tirosina foram adquiridos pela Sigma. Outros reagentes usados foram de grau analítico.

2.2. Métodos

2.2.1. Obtenção da pasta de Tira-Vira

A pasta de Tira-Vira usada como fonte proteica para o preparo da suspensão foi obtida na Planta Piloto da Embrapa Agroindústria de Alimentos. O peixe inteiro fresco foi eviscerado, filetado e o resíduo da filetagem foi submetido a uma despulpadeira para extração de CMS de Tira-Vira. Após obtenção da CMS, o resíduo desse processamento foi novamente submetido à despulpadeira para extração da pasta de Tira-Vira.

2.2.2. Composição centesimal da pasta de Tira-Vira

A pasta de Tira-Vira foi caracterizada quanto ao teor de umidade, cinzas, nitrogênio total e extrato etéreo, tendo como base as metodologias descritas pela AOAC (2010).

2.2.3. Hidrólise enzimática do resíduo

Uma massa de 100g dessa pasta foi submetida a um processamento em homogeneizador por 10 minutos com 400 mL para a obtenção da suspensão a ser hidrolisada, sendo a amostra TV-1 submetida a uma potência média e a amostra TV-2 a uma potência baixa. O branco foi coletado dessa suspensão antes da hidrólise ocorrer. A temperatura e o pH do meio reacional foram ajustados para 50°C e 8,0, respectivamente, sob agitação mecânica, sendo as condições mantidas durante toda a reação e o ajuste de pH realizado com adição contínua de NaOH 5M. Então, foi adicionado um volume de enzima correspondente a uma razão enzima:substrato de 1:8, em peso, e após 1 minuto de reação coletou-se o ponto 0 hora (0h). Também foram coletadas amostras com 0,5 hora, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas e 5 horas de reação. A reação foi interrompida através de aquecimento das amostras em banho a 90°C por 15 minutos e posterior congelamento das mesmas. O cálculo do grau de hidrólise foi feito conforme descrito em Foh *et al.* (2010). As amostras coletadas também foram analisadas quanto ao teor

de aminoácidos aromáticos livres, capacidade emulsificante e atividade antioxidante, sendo as análises realizadas em triplicata.

2.2.4. Dosagem de aminoácidos aromáticos livres

As amostras foram analisadas quanto ao teor de aminoácidos aromáticos livres de acordo com o método espectrofotométrico utilizado por Mellinger-Silva *et al.* (2015). Foi preparada uma solução com 1 mL da amostra e 1 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v), e posteriormente foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio, diluído e a leitura da absorbância realizada à 280 nm em espectrofotômetro. Como padrão, foram utilizadas soluções com teores conhecidos de tirosina.

2.2.5. Capacidade emulsificante

A capacidade emulsificante das amostras foi medida conforme descrito por Liu *et al.* (2014). Uma solução de amostra de 0,2 % (p/v) de proteína foi preparada e uma alíquota de 30 mL dessa solução adicionada a 10 mL de óleo vegetal. A suspensão foi homogeneizada a 10.000 rpm por 1 min em Ultra Turrax. Após 0 minutos (A0) e 10 minutos (A10) da homogeneização, foram pipetados 50 µL da emulsão os quais foram adicionados a 5 mL de dodecil sulfato de sódio 0,1 % (p/v) e a absorbância lida em espectrofotômetro a 500 nm. O índice da atividade emulsificante (EAI) foi calculado pela Equação 1:

$$EAI = \frac{2T}{(1 - \theta) \times C} \quad (1)$$

Onde:

$$T: \text{turbidez} = \frac{2,303 \times A \times \text{fator de diluição}}{L}$$

A: absorbância a 500nm

Fator de diluição: 100

L: caminho óptico das cubetas = 0,01m

θ: fração de óleo para formar a emulsão = 0,25

C: concentração inicial do hidrolisado = 1g/L

2.2.6. Atividade antioxidante

Quanto à atividade antioxidante, as amostras foram analisadas pelo método ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) conforme descrito por Zulueta *et al.* (2009). Trolox foi utilizado como padrão positivo. Os resultados foram expressos em Trolox equivalente (TE), de forma que a unidade de atividade foi µmol TE por grama de proteína.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização da pasta de Tira-Vira

A pasta de Tira-Vira obtida foi caracterizada. Os teores de umidade, cinzas, nitrogênio e extrato etéreo da pasta de resíduo de Tira-Vira estão apresentados na Tabela 1. Mais de 70% do material é água, e proteína representa o segundo componente em maior quantidade. No estudo de Borgogno *et al.* (2017) foram obtidas

amostras de carne mecanicamente separada (CMS) de três espécies diferentes de peixes encontradas na Europa, *Dicentrarchus labrax* (robalo), *Sparus aurata* (dourada) e *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris). Os valores reportados de umidade, em g/100g de produto, foram 68,8; 71,1 e 70,6, respectivamente. E de proteína, encontrou-se, também em g/ 100g de produto, 19,2; 19,3 e 21, respectivamente. Os valores diferentes podem ser explicados pelas diferenças entre as espécies e seus tecidos. Métodos de processamento bem como variáveis no maquinário utilizado também podem contribuir para diferenças, especialmente na umidade do produto obtido.

Tabela1 – Composição centesimal da pasta de Tira-Vira.

Análise	Valor percentual %
Umidade	74,7
Cinzas	2,3
Nitrogênio Total	15,7
Extrato Etéreo	7,8

3.2. Influência do modo de preparo da suspensão de Tira-Vira na hidrólise enzimática das proteínas

No presente estudo, mudou-se a potência de processamento da suspensão com o objetivo de avaliar a influência do modo de preparo da suspensão proteica na hidrólise enzimática das proteínas de uma suspensão constituída por resíduo de Tira-Vira. Essa influência foi avaliada no grau de hidrólise da reação, no teor de aminoácidos aromáticos livres, na capacidade emulsificante do hidrolisado e na atividade antioxidante do hidrolisado obtido.

O acompanhamento da cinética de reação foi realizado pelo grau de hidrólise e pelo teor de aminoácidos aromáticos liberados durante a hidrólise (Figura 1). Observou-se que o perfil do grau de hidrólise manteve-se independente da potência aplicada no processamento da suspensão de Tira-Vira durante a hidrólise catalisada por alcalase[®] (Figura 1a). Maior velocidade de reação ocorreu na primeira hora e o grau de hidrólise máximo foi de 19% após 5 horas de reação. Na literatura são encontrados resultados de grau de hidrólise semelhantes, como no estudo de Fonseca *et al.* (2016) sobre hidrólise de carne e resíduos de cobia (*Rachycentron canadum*), que obteve um grau de hidrólise de cerca de 10% na carne e de cerca de 8% no resíduo de cobia, após 5 horas de reação com alcalase[®]. Quanto ao teor de aminoácidos aromáticos livres, embora de forma oscilante, observou-se um aumento na concentração de aminoácidos na amostra TV-1, referente a amostra que foi obtida utilizando uma potência maior no processador. O motivo desse aumento pode ser o fato de que uma maior potência no homogeneizador pode relaxar as cadeias polipeptídicas presentes no aglomerado proteico formador da pasta de Tira-Vira obtida, facilitando a atuação da enzima durante a reação de hidrólise.

Visando avaliar o efeito da potência de processamento na qualidade dos hidrolisados obtidos, determinou-se a capacidade emulsificante em óleo de soja e a atividade antioxidante por ORAC do hidrolisado ao longo da reação para os dois tipos de amostras (Figura 2). Para a amostra TV-1, a capacidade emulsificante apresenta uma queda logo no primeiro minuto de reação, mas ao longo do tempo de hidrólise, esta não mostra uma diferença intensa. O motivo pode ser a variação que ocorre no tamanho e no peso molecular dos hidrolisados, já tendo sido reportado na literatura que existe um tamanho molecular ótimo para peptídeos serem bons emulsificantes, sendo que os peptídeos com peso molecular baixo podem não ser anfifílicos o suficiente para apresentarem boas propriedades emulsificantes (Liu *et al.*, 2014; Klompong *et al.*, 2007). E a amostra preparada com uma potência menor (TV-2), antes da reação apresentou metade da capacidade emulsificante da amostra TV-1. Ao longo da reação, TV-2 não apresentou diferença. Logo, independente da forma de preparo da amostra, os valores de capacidade emulsificante dos hidrolisados obtidos são similares.

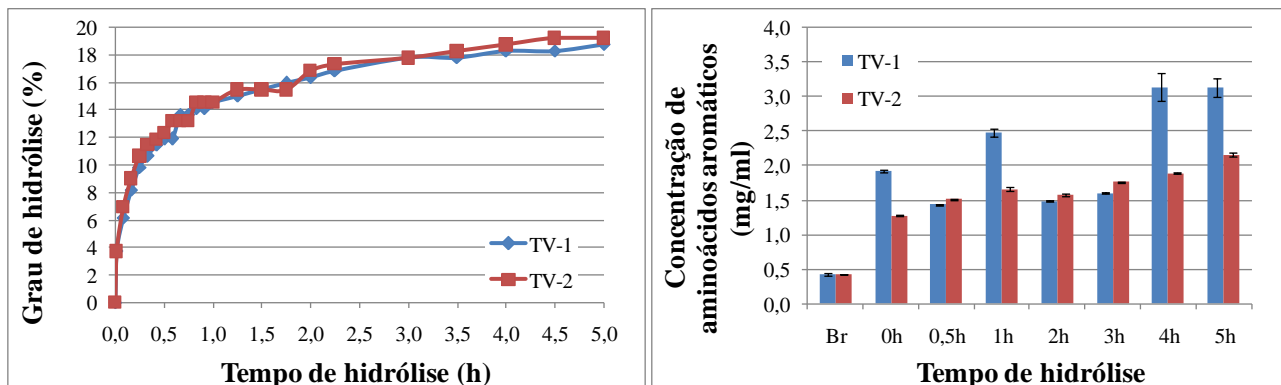


Figura1 - Grau de hidrólise (a) e teor de aminoácidos aromáticos (b) durante hidrólise enzimática de suspensão de Tira-Vira obtida em média (TV-1) e baixa (TV-2) potência de processamento.

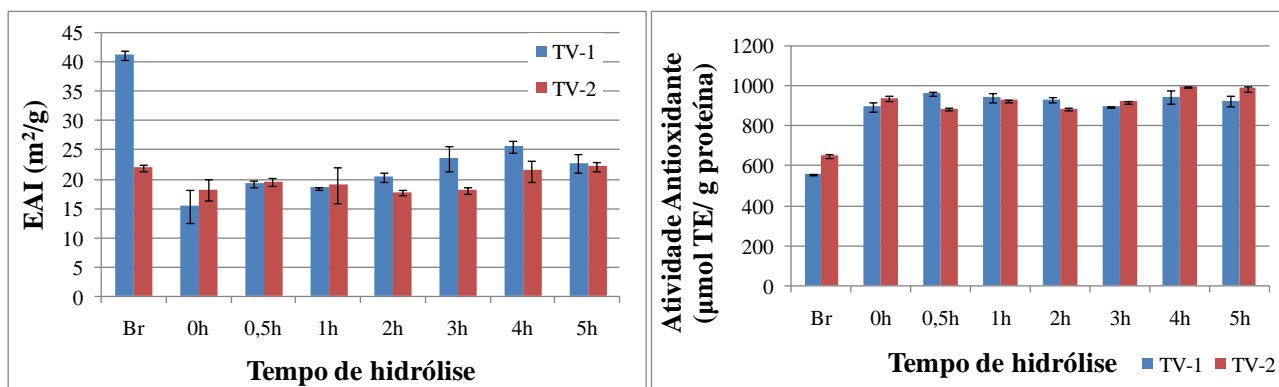


Figura2 - Índice de atividade emulsificante (a) e atividade antioxidante (b) dos hidrolisados de suspensão de Tira-Vira obtida em média (TV-1) e baixa (TV-2) potência de processamento.

Analisando os efeitos quanto à atividade antioxidante utilizando ORAC, observou-se perfis similares de atividade ao longo da reação, independente da forma de obtenção. O ganho de atividade frente ao valor inicial (Br) foi mais expressivo apenas no primeiro minuto reacional (0h), alcançando pouco mais de 800 µmol TE por grama de proteína, frente aos 600 iniciais. Alguns fatores como enzima utilizada, condições de hidrólise, composição de aminoácidos e pequenos peptídeos livres afetam a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos (Klompong *et al.*, 2007) e podem ter contribuído para o resultado obtido.

4. CONCLUSÕES

Para as condições estudadas, a potência de processamento da suspensão de tira-vira não demonstra influência na qualidade do hidrolisado obtido. O uso de potência mais elevada só se faz necessário caso haja necessidade de obter um hidrolisado com maior teor de aminoácidos livres.

Agradecimentos

A Embrapa pelo apoio ao projeto, a FIPERJ pelo pescado para processamento e a Novozymes pela doação da enzima.

5. REFERÊNCIAS

- Association of Official Analytical Chemists.(2010). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18. ed. Gaithersburg, Maryland. 1298 p.
- Barretto, A. C., Sáez, M. B., Rico, M. R., & Jaureguizar, A. J. (2011). Age determination, validation, and growth of Brazilian flathead (*Percophis brasiliensis*) from the southwest Atlantic coastal waters (34°-41° S).*Latin American Journal of Aquatic Research*, 39(2).
- Borgogno, M., Husein, Y., Secci, G., Masi, S., &Parisi, G. (2017). Technological and nutritional advantages of mechanical separation process applied to three European aquacultured species. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 298-305.
- FAO, R. (2015). FAO yearbook: fishery and aquaculture statistics 2015. *Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Foh, M. B. K.; Amadou, I.; Foh, B. M.; Kamara, M. T.; Xia, W. (2010). Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1851-1869.
- Fonseca, R. A. S., Silva, C. M., Silva, G. R., & Prentice, C. (2016). Enzymatic hydrolysis of cobia (*Rachycentron canadum*) meat and wastes using different microbial enzymes. *International Food Research Journal*, 23(1), 152.
- Harnedy, P. A., Parthasarathy, V., McLaughlin, C. M., O'Keeffe, M. B., Allsopp, P. J., McSorley, E. M., ... & FitzGerald, R. J. (2018). Atlantic salmon (*Salmo salar*) co-product-derived protein hydrolysates: A source of antidiabetic peptides. *Food Research International*.
- Je, J. Y., Qian, Z. J., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42(5), 840-846.
- Jeon, Y. J., Byun, H. G., & Kim, S. K. (1999). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process biochemistry*, 35(5), 471-478.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., &Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chemistry*, 102(4), 1317-1327.
- Li, Y., Yu, J., Goktepe, I., &Ahmedna, M. (2016). The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. *Food chemistry*, 196, 1338-1345.
- Liu, Y., Li, X., Chen, Z., Yu, J., Wang, F., & Wang, J. (2014).Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food chemistry*, 151, 459-465.
- Mellinger-Silva, C., Rosa, L. O.,Stephan, M. P., Brígida, A. I. S., Cabral, L. M., da Silva, G. O., ... & da Silva-Santos, J. E. (2015). Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 48, 73-79.
- Nguyen, E., Jones, O., Kim, Y. H. B., San Martin-Gonzalez, F., & Liceaga, A. M. (2017). Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*by-products. *Fisheries science*, 83(2), 317-331.
- Sánchez Pascua, G. L., Casales, M. R., &Yeannes, M. I. (2010). Psychophysical estimation of acid intensity and determination of sweet-acid interaction in a fish paste containing glycerol. *Food Science and Technology*, 30, 260-263.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food chemistry*, 114(1), 310-316.