

EFEITO DA TEMPERATURA, PH E AGITAÇÃO NO GRAU DE HIDRÓLISE DE PLASMA SUÍNO PREPARADO COM FLAVOURZYME®

Resumo Expandido

Eduarda Baggio Paglia ¹
Cristine Vogel ²
Aniela Pinto Kempka ³

Resumo

A hidrólise enzimática da proteína de plasma suíno (PS) com Flavourzyme® para obtenção de hidrolisados foi otimizada através da metodologia de superfície de resposta (MSR). Um desenho composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para estudar a influência de três variáveis independentes, temperatura (°C) de hidrólise, pH e agitação (rpm) no grau de hidrólise (GH%). A hidrólise foi realizada a partir de diferentes combinações de três parâmetros hidrolíticos em cinco níveis por 120 minutos. O DCCR consistiu de 17 pontos experimentais, sendo três repetições dos pontos centrais. Os dados foram analisados usando o Software Statistica® 10.0. Os resultados mostraram que a variável que mais influenciou significativamente o GH foi a temperatura (L), porém as variáveis investigadas não foram significativas ao nível de 95%, para a geração de um modelo. Devido aos resultados obtidos não apresentarem um bom ajuste, não foi possível encontrar um ponto ótimo para esse processo, ou seja, prever quais as melhores condições de temperatura, pH e agitação, para a hidrólise de plasma suíno pelo método de análise estudado, sugerindo-se o estudo de outras condições e/ou aplicando o método da hidrólise combinada de mais proteases, e por conseguinte o estudo das bioatividades dos hidrolisados obtidos.

Palavras-chave: Exopeptidase. Condições de hidrólise. Hidrolisados proteicos.

Introdução

A hidrólise das proteínas leva à liberação de peptídeos com diferentes massas moleculares e sequências de aminoácidos apresentando diversas atividades biológicas. Por conseguinte, uma variável importante a controlar no processo hidrolítico é o grau de hidrólise o qual é levado em conta para determinar muitas das propriedades funcionais e biológicas dos hidrolisados obtidos (efeitos anti-hipertensivos, antioxidantes, hipocolesterolêmicos, antitrombóticos, imunomodulatórios e antimicrobianos). O tipo de peptidase que se utiliza na hidrólise também é um fator importante, uma vez que estas apresentam especificidades diferentes.

A Flavourzyme por exemplo, é uma protease fúngica complexa produzida pela fermentação submersa de uma linhagem selecionada de *Aspergillus oryzae* (KRISTINSSON; RASCO, 2000a). Seu pH e temperatura de máxima atividade é de

¹ Acadêmica do curso de Graduação em Engenharia Química, Universidade do Estado de Santa Catarina, eduarda_paglia@hotmail.com

² Acadêmica do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina, cristine_vogel@hotmail.com

³ Orientadora, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química, Universidade do Estado de Santa Catarina, aniela.kempka@udesc.br

7,0 e 50°C, respectivamente. Flavourzyme trata-se da mistura de proteases, endo e exopeptidase, contendo ambas as atividades, liberando aminoácidos N-terminais, sendo preferencialmente liberada a leucina, como também outros aminoácidos incluindo prolina (NCHIENZA; MORAWICKI; GADANG, 2010).

A maior parte do sangue animal proveniente dos frigoríficos é descartada. As frações do sangue são altamente proteicas como é o caso do plasma sanguíneo, que é constituído por albumina, globulina e fibrinogênio (DÁVILA et al., 2007; NIU et al., 2018). Dessa forma, a utilização de plasma suíno no processo de hidrólise enzimática é altamente desejado.

Objetivos

Avaliar a produção de hidrolisado proteico proveniente de plasma suíno utilizando no processo a enzima Flavourzyme®, através de um planejamento experimental visando a obtenção da otimização do grau de hidrólise.

Materiais e Métodos

Materiais

Plasma suíno, fornecido pela empresa APC do Brasil e protease de *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme®), adquirida da Sigma-Aldrich. Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e os demais produtos químicos utilizados neste estudo foram de grau analítico.

Design experimental

Os parâmetros para a hidrólise do PS foram otimizados usando o MSR. Para otimizar o grau de hidrólise, três variáveis independentes em cinco níveis foram empregadas em um planejamento experimental composto central rotacional (DCCR). As variáveis e os níveis estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis do planejamento experimental e os respectivos níveis codificados para a enzima Flavourzyme®.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1,0	0,0	1,0	+ α
Temperatura (°C)	45	47	50	53	55
pH	6,2	6,5	7,0	7,5	7,8
Agitação (rpm)	83	100	125	150	167
$\alpha = 1,68$					

Fonte: Elaborada pelos autores, 2019.

O Software *Statistica*® 10.0, foi usado para analisar e calcular as respostas previstas e o desenho experimental.

Preparação do hidrolisado

Para a realização do processo de hidrólise, utilizou-se a relação substrato/tampão (S/T) de 5% em relação a proteína total presente na amostra (82,44%), que foram previamente homogeneizados em um erlenmeyer de 125 ml. Foi empregue tampão Tris-HCl e o pH ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N. A enzima foi acrescida na relação enzima/substrato de 4% e colocados em banho termostaticado nas condições estabelecidas no planejamento. Durante a hidrólise, amostras foram coletados aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Todos os hidrolisados coletados foram

filtrados em papel filtro Whatmann nº 1 por 15 minutos para posterior determinação do GH.

Determinação do grau de hidrólise (% GH)

O grau de hidrólise de plasma suíno foi determinado segundo o método Hoyle; Mettitt (1994). Uma alíquota de 1 mL do hidrolisado foi coletado e misturado com a adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 20% para preparar 10% de misturas solúveis em TCA e insolúveis em TCA. Cada mistura foi centrifugada, e a proteína solúvel em TCA a 10% do sobrenadante foi medido utilizando o método de Lowry et al. (1951). O GH foi expresso como porcentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, segundo a Equação 1. A concentração de proteínas foi expressa em mg de albumina bovina, através de leitura em espectrofotômetro à 660 nm.

$$GH(\%) = \frac{\text{Proteína Solúvel em TCA } 10\%}{\text{Proteína Total da Amostra}} \times 100 \quad \text{Eq.1}$$

Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento com os níveis reais para cada variável independente estudada e o resultado do GH correspondente a cada ensaio.

Tabela 2 - Projeto experimental composto central rotacional (DCCR) das variáveis independentes (fatores) e o valor de resposta correspondente Y (GH%) para a hidrólise do PS com Flavourzyme®.

Ensaios	T (°C)	pH	Agitação	GH(%)
1	47	6,5	100	10,82
2	47	6,5	150	9,88
3	47	7,5	100	7,72
4	47	7,5	150	6,98
5	53	6,5	100	9,75
6	53	6,5	150	10,77
7	53	7,5	100	7,77
8	53	7,5	150	8,66
9	45	7	125	7,26
10	55	7	125	10,87
11	50	6,2	125	9,98
12	50	7,8	125	10,54
13	50	7	83	9,85
14	50	7	167	10,54
15	50	7	125	10,11
16	50	7	125	9,72
17	50	7	125	9,75

Fonte: Elaborada pelos autores, 2019.

O GH apresentou uma variação de 7,26% a 10,87%. Observou-se que nos níveis -1,68 e +1,68, para a temperatura (ensaios 9 e 10, respectivamente), fixando o

pH e a agitação em seus valores centrais, obtiveram-se o menor e o maior GH de todos os ensaios do planejamento com PS.

Hidrolisados proteicos foram obtidos no estudo desenvolvido por Sbroggio et al. (2016), pela hidrólise enzimática de okara utilizando Flavourzyme®, nas condições de temperatura de 50°C e pH 7,0 em 110 min de hidrólise. O GH obtido foi 1,45%, 2,9%, 4,35% e 5,8% em 5, 15, 40 e 110 minutos, respectivamente. Resultados esses menores que o encontrado no estudo, porém ambos os resultados foram baixos quando se observa a aplicação do mesmo substrato por outras enzimas. Okara também foi hidrolisada com Alcalase® e apresentou GH de 8,4% em 5 min, 16,8% em 25 min, 25,2% em 75 min e 33,6 em 180 min de hidrólise. De acordo com Klompong et al. (2007), geralmente as proteases alcalinas exibem atividades mais altas do que as proteases ácidas ou neutras, como Flavourzyme®. Hidrólise de proteína muscular de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) hidrolisada por Flavourzyme® foi realizada e o GH em 60, 120 e 180 min foi de 5,17%, 6,64% e 7,45% respectivamente (KRISTINSSON; RASCO, 2000b). Corolase 7089® (endoproteínase de *Bacillus subtilis*) também foi utilizada para hidrolisar o mesmo substrato e apresentou GH de 13,03% em 120 min.

O tratamento estatístico dos dados obtidos permitiu a análise dos efeitos dos fatores, assim como suas interações no grau de hidrólise para um nível de confiança de 95%. Tais efeitos podem ser visualizados na Tabela 3.

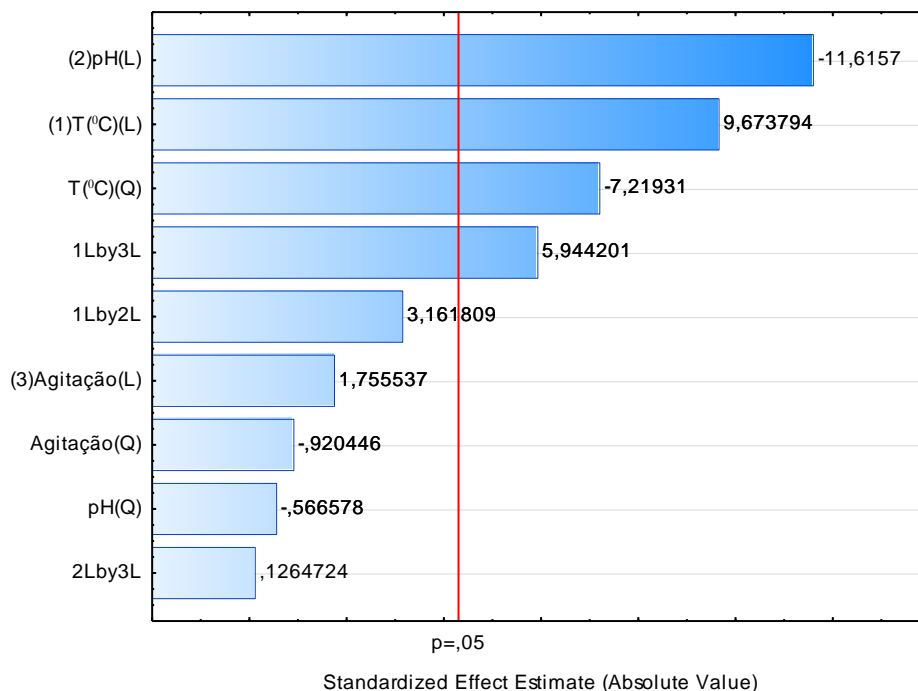
Tabela 3 - Efeitos estimados para o grau de hidrólise de plasma suíno com a enzima Flavourzyme®.

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor
Intercessão	9,9118	0,1229	80,6528	0,0002
Temperatura (L)*	1,1166	0,1154	9,6738	0,0105
Temperatura (Q)*	-0,9172	0,1270	-7,2193	0,0187
pH (L)*	-1,3407	0,1154	-11,6157	0,0073
pH (Q)	-0,0720	0,1270	-0,5666	0,6281
Agitação (L)	0,2026	0,1154	1,7555	0,2213
Agitação (Q)	-0,1169	0,1270	-0,9204	0,4545
Temperatura X pH	0,4768	0,1508	3,1618	0,0872
Temperatura X Agitação*	0,8964	0,1508	5,9442	0,0272
pH X Agitação	0,0191	0,1508	0,1265	0,9109

*Fator de significancia (p<0,05) (L):linear (Q): quadrático

Pode-se observar que somente as variáveis da temperatura (L) e (Q), pH (L), interação entre temperatura X agitação e temperatura X pH apresentaram uma influência significativa nas faixas estudadas no processo, sendo que a agitação não apresentou um efeito significativo. A Figura 1 apresenta graficamente os efeitos obtidos das variáveis estudadas no GH.

Figura 1 – Diagrama de Pareto, análise das variáveis do ensaio com a enzima Flavourzyme®.



Para verificação do modelo matemático realizou-se uma análise de variância (Tabela 4) com os valores de GH obtidos com a enzima Flavourzyme® para plasma suíno considerando somente os efeitos significativos.

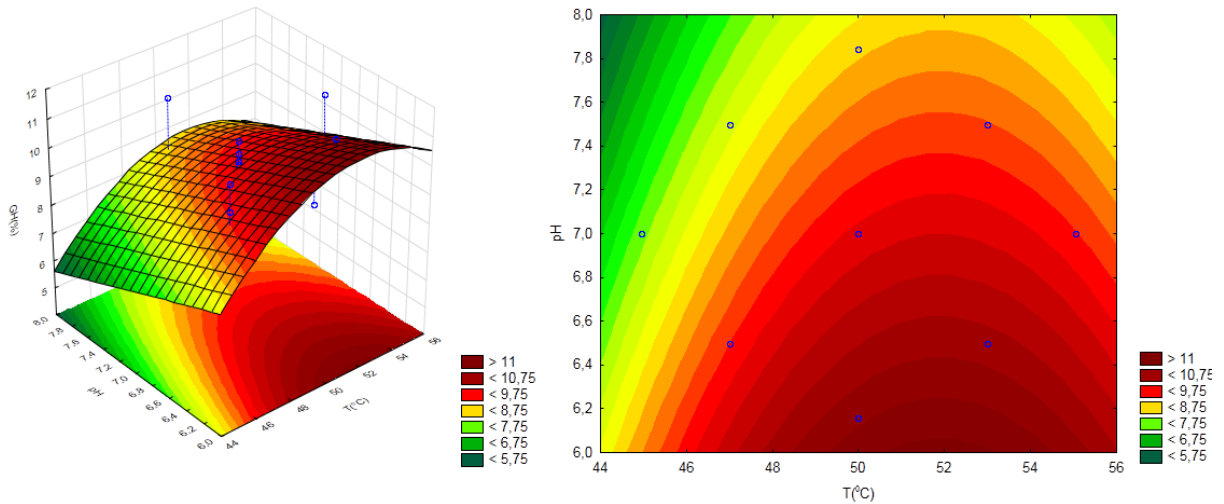
Tabela 4 - Análise de variância dos valores de GH obtidos com a enzima Flavourzyme® a um nível de confiança de 95%.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F calculado
Regressão	14,4900	4	3,6225	2,88
Falta de Ajuste	12,1021	10	1,2102	
Erro puro	0,0910	2	0,0455	
Total	26,6830	16		

$F_{0,05;4,12}$ (F tabelado) = 3,26 $R^2 = 0,5430$

A Tabela 4 mostra um valor de F calculado menor que o tabelado, podendo afirmar-se que o modelo não é suficientemente confiável para prever o GH de qualquer combinação das variáveis independentes nos níveis estudados. O baixo valor do coeficiente de determinação demonstra baixa correlação entre os dados obtidos, evidenciando que Flavourzyme® não possui boa afinidade com o substrato utilizado. Mesmo sem a geração de um modelo, a construção da superfície de resposta foi realizada, permitindo a visualização do comportamento do hidrolisado enzimático de plasma suíno com a enzima Flavourzyme® em função das variáveis que apresentaram influência significativa sobre a variável dependente, grau de hidrólise, demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Superfície de resposta do efeito combinado da temperatura da enzima Flavourzyme® e do pH em função do grau de hidrólise.



Para o hidrolisado enzimático de PS a partir da Flavourzyme® foi observado pH ótimo abaixo de 6,5, trabalhando melhor em temperatura mais branda (50°C), o que pode ser explicado por sua baixa resistência ao calor. Alguns autores relataram quem a Flavourzyme® é uma enzima que precisa de tempo maior para atingir o grau de hidrólise desejado e que trabalha a temperaturas mais brandas quando comparada a outras enzimas (SANTOS et al., 2009; SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009).

Nchiencia; Morawicki; Gadang, 2010, verificaram a eficácia da hidrólise enzimática com farinha de aves, utilizando a combinação de endo e exopeptidases industriais. Foi relatado que o maior GH (11,13%) foi obtida com Alcalase e Flavourzyme adicionados sequencialmente e menor com Flavourzyme (2,5%). Uma alternativa para o aumento na eficiência do grau de hidrólise é utilizar combinações de enzimas. A associação de Alcalase e Flavourzyme teve o benefício da ação de uma endopeptidase combinada com a capacidade de uma exopeptidase. Iniciar a hidrólise com Alcalase atinge predigestão que aumenta o número de locais do terminal N disponíveis para a ação da exopeptidase (Flavourzyme). Misturas de endo e exopeptidases são frequentemente preferidas porque enzimas únicas não podem produzir um hidrolisado extenso em um período de tempo curto (ADLER-NISSEN, 1979).

Conclusões/Considerações Finais

A fim de tornar materiais de descarte uma matéria-prima rica, a hidrólise enzimática controlada para a obtenção de produtos com diferentes graus de hidrólise e de baixa massa molecular tem recebido muita atenção, visando agregar valor aos produtos, tanto comercial quanto nutricional.

A obtenção dos hidrolisados de plasma suíno com Flavourzyme não demonstrou uma boa eficiência, ressaltando a necessidade de um estudo subsequente na utilizando de outras proteases. Cabe ressaltar também que o grau de hidrólise baixo não evidencia a ausência de peptídeos sem nenhuma atividade, sendo necessária o estudo da sequência dos aminoácidos constituintes e a determinação das atividades biológicas dos hidrolisados obtidos.

Referências

- ADLER-NISSEN, J. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1256–1262, 1979.
- DÀVILA, E. et al. Surface functional properties of blood plasma protein fractions. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 1–2, p. 207–214, 2007.
- HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 1–4, 1994.
- KLOMPONG, V. et al. 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**, v. 102, p. 1317–1327, 2007.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. **Fish Protein Hydrolysates : Production , Biochemical , and Functional Properties**. [s.l: s.n.]. v. 40.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 131–139, 2000b.
- LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- NCHIENZA, H. A.; MORAWICKI, R. O.; GADANG, V. P. Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases. **Poultry Science**, v. 89, p. 2273–2280, 2010.
- NIU, H. et al. Effect of porcine plasma protein hydrolysates on long-term retrogradation of corn starch. **Food Chemistry**, v. 239, p. 172–179, 2018.
- SANTOS, SARITA D'AVILA DOS et al. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 72–77, 2009.
- SBROGGIO, M. F. et al. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 375–381, 2016.
- SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1144–1150, 2009.