

AValiação DO GraU DE HidróLise DA CMS DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) EM DIFERENTES ConDIÇÕES DA REAÇÃO ENZIMÁTICA

FILIPINI, Gabriel¹; PIOTROWICZ, Inajara Beatriz Brose¹; PRENTICE-HERNÁNDEZ, Carlos¹; SALAS-MELLADO, Myriam¹

¹Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Tecnologia de Alimentos. inabbp@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Atualmente há grandes quantidades de pescado subaproveitado ou subprodutos da industrialização de pescado que são descartados no meio ambiente. As proteínas musculares do pescado apresentam a vantagem de possuírem elevado valor biológico, decorrente da sensibilidade à hidrólise e de composição balanceada em aminoácidos, particularmente daqueles que costumam ser os limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina e a cisteína. Outra peculiaridade relacionada com o uso do pescado é o fato de que certas espécies não são apropriadas para a comercialização, geralmente, por não possuírem rendimento satisfatório com relação à filetagem, devido à estrutura corporal e por apresentarem baixo valor comercial (BÁRZANA E GARIBAY-GARCIA, 1994).

Em busca de alternativas para resolver esta problemática, vem-se propondo o desenvolvimento de processos para recuperação e/ou alteração das proteínas musculares de pescados, como a anchoita, uma espécie que ainda não é utilizada para consumo direto na região Sul do Brasil e, com isto, promover seu uso como ingrediente funcional em alimentos processados.

Dentre as muitas inovações tecnológicas está o uso de enzimas microbianas para modificar as propriedades funcionais das proteínas. A adição de enzimas para hidrolisar as proteínas de um substrato é um processo de grande importância para melhorar ou modificar as propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais da proteína nativa sem comprometer o seu valor nutritivo (KRISTINSSON e RASCO, 2000; CENTENARO, 2011).

Algumas enzimas tem sido bastante usadas para a produção de hidrolisados de pescado, como a Flavourzyme (NIELSEN *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2009). A Flavourzyme é um complexo de protease fúngica, constituída de exopeptidases e endopeptidases, produzida pela fermentação submersa de uma linhagem selecionada de *Aspergillus oryzae* que não foi geneticamente modificada, atuando na hidrólise sob condições neutras ou ligeiramente ácidas (SLITZE *et al.*, 2005).

Segundo Nielsen *et al.* (2001) na hidrólise de proteínas o parâmetro para monitorar a reação é o grau de hidrólise, que é definido como a porcentagem de ligações peptídicas quebradas.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o grau de hidrólise da CMS de anchoita em diferentes condições da reação enzimática.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A matéria prima utilizada neste trabalho foi anchoita (*Engraulis anchoita*), capturada na região sul do Rio Grande do Sul, e levada diretamente à indústria de processamento de pescado. Do pescado inteiro foi retirada a cabeça e as vísceras,

sendo passado pela despoldadeira, onde foram separados o músculo das escamas, pele e espinhos. A carne mecanicamente separada (CMS) foi armazenada congelada em embalagens plásticas à -20°C até a sua utilização. A CMS foi caracterizada pela sua composição proximal, seguindo os métodos descritos pela AOAC (2000).

Para a obtenção dos hidrolisados foram realizados três diferentes procedimentos de hidrólise:

Hidrolisado 1 (H_1) - concentração de substrato de 1% ($\rho_{\text{proteína}}/V_{\text{tampão}}$) e de Flavourzyme de 1% ($\rho_{\text{enzima}}/\rho_{\text{proteína}}$). Foi preparado uma suspensão com tampão fosfato 0,2M de pH 7,0. O processo transcorreu na temperatura de 50°C por um período de 60 minutos. A desativação da enzima com aquecimento a 90°C por 15 minutos, Foram coletadas amostras em períodos de 15, 30 e 60 minutos para verificar o aumento no grau de hidrólise;

Hidrolisado 2 (H_2) - Hidrólise nas mesmas condições citadas acima, porém adicionando a enzima desativada por aquecimento a 90°C por 15 minutos para verificar a presença de enzimas endógenas na CMS de anchoita;

Hidrolisado 3 (H_3) - Hidrólise nas mesmas condições citadas em H_1 , porém o substrato desnaturado por aquecimento a 90°C por 15 minutos, para inativar as enzimas endógenas anterior a adição da Flavourzyme.

Após esse processo de hidrólise as amostras foram centrifugadas a $8000xg$ por 15 minutos e filtrada. Do filtrado foi verificado o teor de proteína solúvel pelo método de Lowry *et al.* (1951). A determinação do grau de hidrólise foi feito conforme Pezoa e Salas-Mellado (1979).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 apresenta-se a composição proximal da anchoita.

Tabela 1: Composição proximal da CMS de anchoita.

Componentes	Experimental % (g/100g)	Teórico * %(g/100g)
Umidade	79,7±0,30	78,1±0,37
Proteína	15,6±0,70	17,5±0,20
Lipídeos	2,2±0,04	2,4±0,13
Cinzas	1,2±0,20	2,0±0,19

*Furlan *et al.* (2009).

Os resultados obtidos estão próximos aos valores encontrados no estudo de Furlan *et al.* (2009), apresentando conteúdos menores de proteína e de lipídeos o que pode ser consequência do maior conteúdo de umidade. Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2006) para as variadas carnes de pescado cru a porcentagem de proteínas varia entre 13,1 a 25,7%. A composição do pescado é bastante diferenciada dependendo do sexo, condições ambientais e a idade.

Os valores de grau de hidrólise dos diferentes hidrolisados se apresentam na Tabela 2.

Tabela 2: Grau de hidrólise das proteínas obtidas nos testes de hidrólise da CMS de anchoita, tratada com a enzima Flavourzyme.

Tempo (min)	%GH		
	H ₁	H ₂	H ₃
15	5,42	5,19	5,19
30	5,48	5,30	5,21
60	5,55	5,46	5,40

Verificou-se que os valores do grau de hidrólise ficaram entre 5,0 e 6,0%, não apresentando grande variação devido ao curto tempo de hidrólise. Normalmente, a variação do grau de hidrólise é maior nos períodos iniciais, onde se tem bastante substrato para a enzima atuar (REVALLEC-PLÉ *et al.*, 2000).

Pode-se observar que o hidrolisado H₁ foi o que apresentou maior grau de hidrólise nos três tempos analisados, sendo que o H₂ também apresentou valores de grau de hidrólise próximos ao H₁. Isto indica que há presença de enzimas endógenas na CMS que poderiam ser provenientes das vísceras no momento da evisceração, como reportado por Martins *et al.*, (2009) e Centenaro (2011).

O experimento que apresentou os menores valores de grau de hidrólise foi o terceiro (H₃), com a CMS desnaturada, ou seja, com as enzimas endógenas desativadas. Essa desnaturação das proteínas foi relatada por Guerard *et al.* (2001) que, interessados em inativar as enzimas endógenas do estômago do atum, principalmente pepsina, realizaram a cocção antes do tratamento enzimático. Mohr (1980) verificou que as proteínas desnaturadas são aparentemente resistentes à quebra enzimática, o que ficou comprovado no experimento H₃.

4 CONCLUSÃO

Obteve-se o grau de hidrólise em diferentes hidrolisados de anchoita, verificando a presença de enzimas endógenas no hidrolisado H₂ e a ação da enzima Flavourzyme no hidrolisado H₁ levemente superior quando a reação foi realizada sobre o substrato desnaturado pelo calor (hidrolisado H₃).

5 REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis. 13 ed. Arlington, 2000.

BÁRZANA, E.; GARIBAY-GARCÍA, M.; Production of fish protein concentrates in Fisheries processing: biotechnological applications, Chapman&Hall: London, 1994.

CENTENARO, G. S. **Obtenção de peptídeos bioativos com atividade antioxidante a partir de proteínas de origem animal.** Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). FURG, Rio Grande, 2011.

FURLAN, V. J. M.; da SILVA, A. P. R.; QUEIROZ, M. I. Avaliação da eficiência de extração de compostos nitrogenados da polpa de anchoíta (*Engraulis anchoita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.º. 4, p. 834-839, 2009.

GUERARD, F.; DUFOSSÉ, L.; DE LA BROISE, D.; BINET, A.; Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymes**, v.11, 1051-1059, 2001.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Proteina measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, p.265-275, 1951.

MARTINS, V. M.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v 32, n.º.1, 61-66, 2009.

MOHR, V.; Enzymes technology in the meat and fish industries. **Process Biochemistry**, v.15, n.º. 6, p. 18-21, 1980.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMAN, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Food Chemistry and Toxicology**. v. 66, n. 5, 2001.

PEZOA, V.; SALAS-MELLADO, M. M.; Obtenção de um concentrado de proteínas de pescado para alimentos, pelo método enzimático, utilizando as próprias enzimas do pescado, 1a ed., Editora FURG: Rio Grande, 1979.

RAVALLEC-PLÉ, R; GILMARTIN, L; WORMHOUDT, A.V.; GAL, Y. L. Influence of the hydrolysis process on the biological activities of protein hydrolysates from cod (*Gadus morhua*) muscle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 2176-2180, 2000.

SANTOS, S. D.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, v. 32, n. 1, 2009.

SLIZYTÉ, R.; MOZURAITYTÉ, R.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; FALCH, E.; FOUCHEREAU-PERON, M.; RUSTAD, T. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 668–677, 2009.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos / NEPA-UNICAMP.- T113 Versão II. 2. ed. -- Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 113p., 2006.