

CINÉTICA DE HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DA SEMENTE DE ABÓBORA USANDO PROTEASES COMERCIAIS ATIVADAS POR ULTRASSOM

RESUMO

A hidrólise enzimática das proteínas da semente de abóbora é uma estratégia para geração de hidrolisados proteicos de alto valor agregado. No entanto, o alto custo das proteases, longo tempo de reação e baixo grau de proteólise limitam a aplicação industrial. Neste contexto, o ultrassom (US) tem sido explorado para potencializar a performance enzimática. Assim, este estudo avaliou a taxa (k) e o grau de hidrólise (GH) do concentrado proteico da semente de abóbora (CPSA) em diferentes temperaturas usando três proteases comerciais (Brazyn[®], Flavourzyme[®] e Neutrase[®]) pré-processadas por US (23,4W/L, 40kHz) sob condições otimizadas. A Flavourzyme[®] pré-tratada por US (25°C/90 min) apresentou maior taxa de hidrólise (aumento de até 125% a 25°C). Em paralelo, a Brazyn[®] e a Neutrase[®] pré-tratadas por US a 25°C/60min apresentaram maior grau de hidrólise final (GH_∞) (aumento de até 75% a 25°C e 76% a 40°C, respectivamente - $p < 0,05$). Portanto, o ultrassom pode ser estrategicamente usado para melhorar os parâmetros cinéticos de proteases comerciais visando a produção de hidrolisados proteicos a partir da CPSA.

INTRODUÇÃO

As proteínas de sementes de abóbora apresentam excelente perfil de aminoácidos de grande potencial para serem utilizadas na produção de hidrolisados com propriedades biológicas e técnico-funcionais aprimoradas (1). Para exercerem essas propriedades, a proteína nativa deve ser hidrolisada para liberar os peptídeos (2). A hidrólise enzimática é uma das formas mais utilizadas para obtenção destes hidrolisados (1). Proteases comerciais como a Brazyn[®], Flavourzyme[®] e Neutrase[®] são utilizadas em processos industriais, entretanto, o uso dessas enzimas apresenta alguns desafios como: custo elevado da protease, longo tempo de reação, baixo grau de hidrólise e alto consumo de energia. A fim de superar essas limitações, estudos apontam que a aplicação de ultrassom (US) pode ser usada para potencializar a hidrólise enzimática.

O ultrassom (US) tem sido utilizado em combinação com a hidrólise enzimática para melhorar o desempenho enzimático (2). Especificamente, o US pode ser aplicado na hidrólise enzimática por meio de três métodos principais: em enzimas ou substratos isoladamente e, para alguns processos, por meio de reações assistidas (3, 4). O US como um pré-tratamento de enzimas pode induzir mudanças estruturais e desdobramentos, expondo sítios ativos aprisionados no núcleo catalítico de enzimas nativas, melhorando seu desempenho (2, 3). A partir do pré-tratamento de enzimas, é possível definir condições otimizadas que favoreçam maiores taxas de hidrólise. Entretanto, estudos sobre o efeito do uso da Brazyn[®], Flavourzyme[®] e Neutrase[®] pré-tratadas por US em condições otimizadas sob a taxa e o grau de hidrólise nas proteínas de sementes de abóbora ainda não foi explorado.

OBJETIVO

Este trabalho avaliou a taxa e o grau de hidrólise do concentrado proteico da semente de abóbora em diferentes temperaturas usando três proteases comerciais

(Brauzyne[®], Flavourzyme[®] e Neutrase[®]) pré-processadas por US em condições otimizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Proteases e obtenção do concentrado proteico da semente de abóbora (CPSA)

A Brauzyne[®] foi fornecida pela Prozyn Biosolutions (São Paulo, Brasil), a Neutrase[®] e Flavourzyme[®] foram fornecidas pela Novozymes Latino Americana Ltda (Paraná, Brasil).

As sementes de abóbora (*Curcubita pepo*) foram adquiridas por doação da empresa Doces Mirahy localizada na cidade de Mirai (Minas Gerais, Brasil). A extração das proteínas das sementes de abóbora (PSA) foi realizada por extração alcalina com precipitação isoelétrica conforme descrito por Pereira et al. (5). A composição do concentrado proteico da semente de abóbora (CPSA) foi de 66,5% de proteína, 19,8% de umidade e 13,6% de extrato seco não proteico (gordura, carboidrato e resíduos minerais).

Hidrólise do CPSA usando proteases pré-tratadas com US sob condições otimizadas

Para avaliar a hidrólise do CPSA utilizando as proteases pré-tratadas por US sob condições otimizadas, foi utilizado um banho de ultrassom (Unique, modelo USC 2800 A, Indaiatuba, Brasil) com controle de temperatura, capacidade de 9,5 L, dimensões de 300 x 240 x 150 mm, equipado com cinco transdutores de disco dispostos abaixo da cuba, com potência nominal de 450 W e frequência de 20 kHz.

Soluções enzimáticas (1,0 % m/v para Brauzyne[®], 0,5% v/v para Flavourzyme[®] e 1,0 % v/v para Neutrase[®], foram preparadas em tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,5) e pré-tratadas por US sob condições otimizadas (25°C/60 min para Brauzyne[®], 25°C/90 min para Flavourzyme[®] e 25°C/60 min para Neutrase[®]). Essas condições foram escolhidas considerando a maior atividade enzimática após pré-tratamento por US das enzimas, conforme resultados preliminares.

Após o pré-tratamento, as soluções enzimáticas e a solução do CPSA (1% p/v) foram usadas em uma razão enzima-substrato de 1%. A hidrólise enzimática foi conduzida em um banho termostático por 180 min em diferentes temperaturas: ambiente (25°C), ótima de cada enzima (60°C para Brauzyne[®], 55°C para Flavourzyme[®] e 50°C para Neutrase[®]) e 40°C. A hidrólise convencional foi realizada usando proteases não tratados por US.

Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) foi determinado pelo método pH-stat, definido como a razão percentual entre o número de ligações peptídicas quebradas (h) e o número total de ligações peptídicas no substrato estudado (h_{tot}), calculado de acordo Magalhães et al. (2).

Cinética de hidrólise de CPSA

A cinética de hidrólise do CPSA foi avaliada utilizando um modelo de cinética de primeira ordem, onde a velocidade de reação foi demonstrada pelo aumento do grau de hidrólise (GH), de acordo com a equação 1 (Eq. 1).

$$GH_t = GH_{\infty} (1 - e^{-kt}) \quad Eq. 1$$

Onde: $G H_t$: Grau de hidrólise (%) no tempo t ; $G H_{\infty}$: Grau final de hidrólise (%) do CPSA; t : Tempo de reação (min); k : taxa de reação de hidrólise (min^{-1}) a uma dada temperatura.

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 parâmetros do modelo (k e $G H_{\infty}$) foram obtidos por regressão não linear usando o software Curve Expert Professional (Hyams Development, Chattanooga, EUA) em um nível de 95%. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e os dados foram analisados usando ANOVA pelo teste de Tukey a 95% (SAS Institute, NC, EUA).

RESULTADO E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra as curvas do grau de hidrólise (GH) (%) da CPSA utilizado as proteases pré-tratadas por US em condições otimizadas em comparação com a reação convencional em diferentes temperaturas. As curvas foram modeladas utilizando a Eq. 1 para obtenção da taxa de hidrólise (parâmetro k) e do grau de hidrólise final (parâmetro $G H_{\infty}$) (Tabela 1).

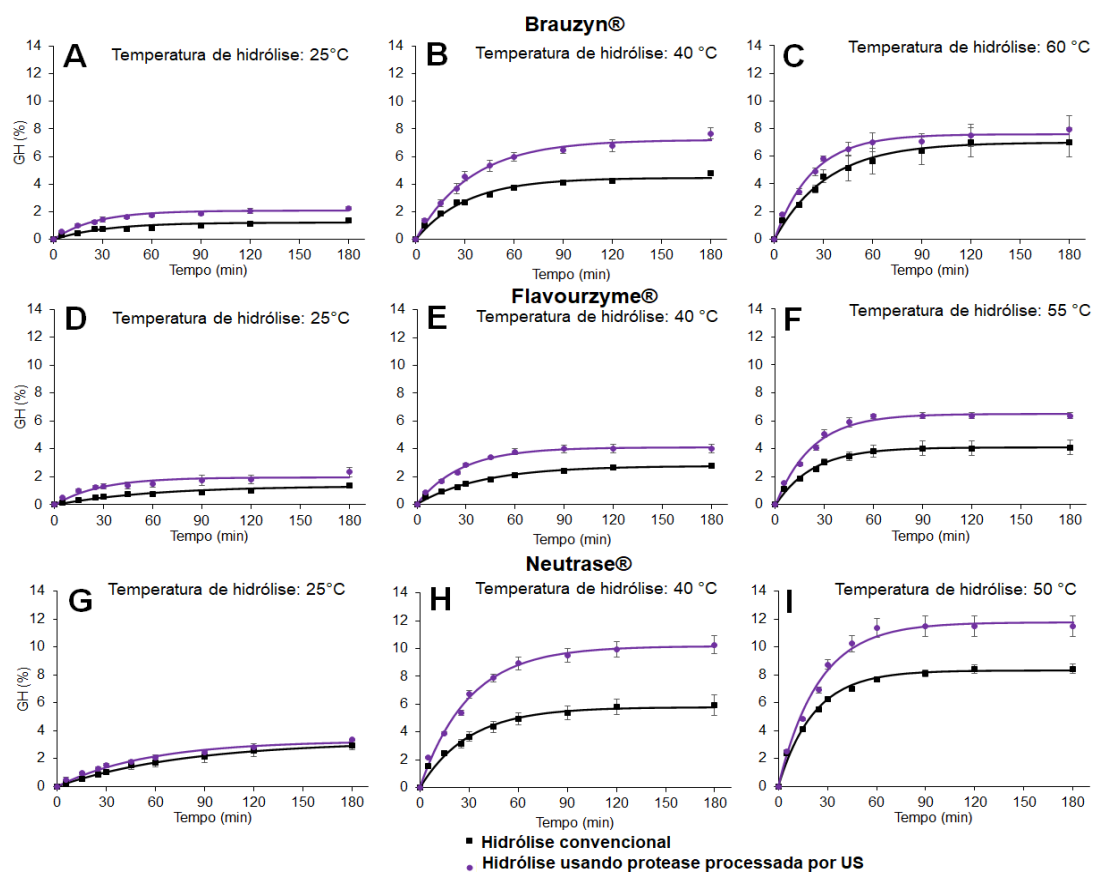


Figura 1. Hidrólise do CPSA utilizando Brauzyne[®] (A, B e C), Flavourzyme[®] (D, E e F) e Neutrase[®] (G, H e I) pré-tratadas por US sob condições otimizadas em diferentes temperaturas. Os pontos são os valores experimentais e as curvas (linhas contínuas) são do modelo ajustado a Eq. (1).

De forma geral, comparando os resultados das diferentes enzimas dentre as temperaturas estudadas, verificou-se que o aumento na temperatura da reação promoveu um aumento na taxa de hidrólise sob condições específicas ($p < 0,05$), exceto para Brauzyn®.

Na avaliação comparativa entre os processos, verificou-se que as reações utilizando as proteases pré-tratadas por US apresentaram maior taxa de hidrólise (máximo aumento de até 125% na avaliação comparativa a 25°C para Flavourzyme®). Além disso, a Brauzyn® e a Neutrase® pré-tratadas por US (25°C/60min) apresentaram maior grau de hidrólise final em comparação com o controle (incremento máximo de até 75% a 25°C para Brauzyn® e de até 76% a 40°C para Neutrase®) ($p < 0,05$) (Tabela 1). Um maior GH indica um maior número de ligações peptídicas clivadas, ou seja, uma maior proporção de hidrolisados de cadeia menores e aminoácidos livres (6).

Tabela 1. Parâmetros da Eq. (3) ajustado para hidrólise de concentrado de proteína de semente de abóbora (CPSA) usando proteases pré-tratadas com US sob condições otimizadas em diferentes temperaturas de reação.

Enzima	Hidrólise	T (°C)	k(min ⁻¹)	GH _∞ (%)	R ²	GH _{45 min} (%)	GH _{180 min} (%)
Brauzyn®	Hidrólise convencional	25	0.032 ± 0.018a	1.2 ± 0.2c	0.959	0.7 ± 0.2d	1.4 ± 0.1c
		40	0.032 ± 0.001a	4.5 ± 0.1b	0.989	3.2 ± 0.1c	4.8 ± 0.2b
		60	0.031 ± 0.003a	7.0 ± 1.2a	0.994	5.1 ± 0.9b	7.0 ± 1.0a
	Hidrólise usando enzima pré-tratada com US (25°C/60 min)	25	0.040 ± 0.007a	2.1 ± 0.1c	0.986	1.6 ± 0.1d	2.3 ± 0.1c
		40	0.030 ± 0.002a	7.3 ± 0.3a	0.994	5.3 ± 0.4ab	7.7 ± 0.4a
		60	0.044 ± 0.006a	7.6 ± 0.9a	0.995	6.5 ± 0.5a	8.0 ± 1.0a
Flavourzyme®	Hidrólise convencional	25	0.016 ± 0.004c	1.3 ± 0.1d	0.964	0.7 ± 0.1d	1.4 ± 0.1d
		40	0.025 ± 0.003bc	2.8 ± 0.2c	0.994	1.8 ± 0.0c	2.8 ± 0.2c
		55	0.044 ± 0.007a	4.1 ± 0.6b	0.995	3.5 ± 0.3b	4.1 ± 0.5b
	Hidrólise usando enzima pré-tratada com US (25°C/90 min)	25	0.036 ± 0.006ab	1.9 ± 0.4cd	0.948	1.4 ± 0.2cd	2.3 ± 0.3c
		40	0.037 ± 0.005ab	4.1 ± 0.3b	0.996	3.4 ± 0.1b	4.0 ± 0.3b
		55	0.045 ± 0.001a	6.5 ± 0.2a	0.995	5.9 ± 0.3a	6.4 ± 0.2a
Neutrase®	Hidrólise convencional	25	0.013 ± 0.001c	3.3 ± 0.3e	0.996	1.5 ± 0.3d	2.9 ± 0.3d
		40	0.034 ± 0.002b	5.8 ± 0.6d	0.992	4.4 ± 0.4c	5.9 ± 0.8c
		50	0.046 ± 0.005a	8.3 ± 0.3c	0.996	7.0 ± 0.0b	8.4 ± 0.3b
	Hidrólise usando enzima pré-tratada com US (25°C/60 min)	25	0.018 ± 0.003c	3.3 ± 0.1e	0.988	1.8 ± 0.1d	3.4 ± 0.0d
		40	0.034 ± 0.002b	10.2 ± 0.6b	0.997	7.9 ± 0.3b	10.3 ± 0.6a
		50	0.041 ± 0.002ab	11.8 ± 0.8a	0.995	10.2 ± 0.6a	11.5 ± 0.7a

* Média ± desvio padrão de nove repetições (n = 9). Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos avaliados separadamente para cada protease. US: ultra-som. k = taxa de reação de hidrólise (min⁻¹) em dada temperatura. DH_∞ = Grau final de hidrólise (%). DH_{45 min} e DH_{180 min} = grau de hidrólise aos 45 e 180 min de hidrólise, respectivamente (%).

Esses resultados podem ser explicados devido as alterações na estrutura da enzima em decorrência da energia liberada durante o fenômeno de cavitação provocado pelo US (4). Neste contexto, o colapso das bolhas durante a cavitação resulta em forças intensas de cisalhamento, que podem induzir mudanças estruturais com exposição de sítios ativos aprisionados no núcleo catalítico de enzimas nativas (7), melhorando seu desempenho. Esses efeitos são dependentes de diversos fatores como o tipo de enzima e sua especificidade, o que justifica o estudo comparativo entre as enzimas. As enzimas do

presente estudo possuem diversas especificidades. Brauzyn[®] (papaína) é uma protease derivada de plantas com atividade exógena que cliva ligações peptídicas de regiões hidrofóbicas, incluindo aminoácidos Ala, Val, Leu, Phe, Trp e Tyr, enquanto Flavourzyme[®] cliva preferencialmente a ligação peptídica entre Leu e Pro. A Neutrase[®] é uma endopeptidase neutra que, aleatoriamente, hidrolisa ligações peptídicas de aminoácidos não terminais (2, 8). De acordo com a literatura, as endoproteases tendem a agir sinergicamente com as exoproteases, aumentando o número de N-sítios terminais disponíveis para sua ação (2, 8).

Outro ponto importante a ser destacado, se deve ao aumento da taxa de hidrólise das reações assistidas por US em temperaturas de 25 e 40 °C (Figura 1 / Tabela 1). Esse aumento proporcionou taxas de hidrólises similares ou superiores com a taxa de hidrólise da reação convencional em temperaturas superiores (temperaturas ótimas das proteases) ($p > 0,05$). Este resultado é interessante, uma vez que a baixa temperatura de operação é preferida na indústria devido à economia de energia e custos, além de evitar alterações na qualidade do produto em temperaturas elevadas.

CONCLUSÃO

Neste estudo, o pré-tratamento ultrassônico da Brauzyn[®], Flavourzyme[®] e Neutrase[®] em condições otimizadas aumentou em até 125% a taxa de hidrólise na avaliação comparativa a 25°C para Flavourzyme[®]. Além disso, a Brauzyn[®] e Neutrase[®] apresentaram maior grau de hidrólise final em comparação com o controle (incremento máximo de até 75% a 25°C para Brauzyn[®] e de até 76% a 40°C para Neutrase[®]). Desta forma, os resultados ampliam o uso do ultrassom, indicando que essa tecnologia pode ser utilizada para melhorar os parâmetros cinéticos de diferentes proteases comerciais visando a produção de hidrolisados proteicos multifuncionais a partir das proteínas da semente de abóbora.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. BUČKO S, et al. Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 271–278, 2016.
2. MAGALHÃES, I. A. et al. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: Effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates. **Food Research International**, v. 157, p. 111310, 2022.
3. WANG, D. et al. Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: 483 Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 453-461, 2018.
4. SOARES, A. S. et al. Ultrasound processing of amyloglucosidase: impact on enzyme activity, stability and possible industrial applications. **LWT - Food Science Technology**, v. 43, p. e48929, 2020.
5. PEREIRA, G. Z. et al. Atividade enzimática de proteases comerciais em proteínas de semente de abóbora. In: X Convibra - Congresso Virtual de Agronomia, **Anais do X Convibra - Congresso Virtual de Agronomia**, Paraná, UFPR, 2022.
6. WANG, B. et al. Mechanism study of dual-frequency ultrasound assisted enzymolysis on rapeseed protein by immobilized Alcalase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 307-313, 2016.
7. LI, F., & TANG, Y.. The activation mechanism of peroxidase by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 71, 2021.
8. Hong, G. P. et al. Anti-oxidative and anti-aging activities of porcine by-product collagen hydrolysates produced by commercial proteases: effect of hydrolysis and ultrafiltration. **Molecules**, v. 24, p. 1104, 2019.