

Extração enzimática das proteínas do farelo de arroz

Enzymatic extraction of rice bran proteins

RESUMO

Ana Lidia Rezende de Lima
analidia140@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Medianeira, Paraná,
Brasil

Ediane Umbelina Ferrazzo do
Carmo
edianeuferrazzo@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Medianeira, Paraná,
Brasil

Eliane Colla
collaeliane@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Medianeira, Paraná,
Brasil

A proteína de farelo de arroz é considerada uma proteína de origem vegetal que apresenta uma boa qualidade nutricional para o consumo humano, quando comparado com a maioria das proteínas de origem vegetal, e tem como vantagem a ausência de glúten, podendo ser consumida por indivíduos celíacos e também por vegetarianos. Assim, o estudo de métodos de extração de proteínas da matriz farelo de arroz apresenta-se como uma necessidade científica atual. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a extração de proteínas do Farelo de Arroz Desengordurado (FAD) por via enzimática para a obtenção de um Hidrolisado Proteico de Farelo de Arroz (HPFA) com alto rendimento e propriedades tecnológicas adequadas. Foram avaliados os efeitos das variáveis concentração de protease, tempo de processo, temperatura e pH, na resposta de percentual de proteínas extraídas, pela aplicação de um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF). Com as variáveis selecionadas no PFF, aplicou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a otimização do processo de extração. O rendimento proteico alcançado do processo de extração enzimática foi de 4,63 por cento, sendo que o HPFA apresentou 71,19 por cento de proteínas.

PALAVRAS-CHAVE: Farelo de arroz. Proteínas. Enzima.

ABSTRACT

Rice bran protein is considered a protein of vegetable origin that has a good nutritional quality for human consumption, when compared to most proteins of vegetable origin, and has the advantage of the absence of gluten, which can be consumed by celiac individuals and also by vegetarians. Thus, the study of protein extraction methods from rice bran matrix is a current research topic. The main objective of this work was to evaluate the protein extraction of Defatted Rice Bran (DRB) by enzymatic route to obtain a Rice Bran Protein Hydrolysate (RBPH) with high yield and adequate technological properties. The effects of the protease concentration, process time, temperature and pH variables on the response of the percentage of extracted proteins were evaluated by the application of a Fractional Factorial Design (FFD). With the variables selected in the FFD, a Central Composite Rotatable Design (CCRD) was applied to optimize the extraction process. The protein yield achieved from the enzymatic extraction process was 4.63 percent, with RBPH having 71.19 percent of proteins.

KEYWORDS: Rice bran. Proteins. Enzyme.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A proteína de farelo de arroz apresenta uma boa qualidade nutricional para o consumo humano, quando comparado com a maioria das proteínas de origem vegetal, e tem como vantagem, em relação a outros farelos a ausência de glúten, podendo ser consumida por indivíduos celíacos (HAMMOND, 1994; ZHANG et al., 2012). Métodos enzimáticos foram desenvolvidos com o principal objetivo de isolar apenas o amido do arroz, utilizando proteases alcalinas e/ou neutras; no entanto, os baixos conteúdos de proteína obtidos no amido indicam que é possível obter subprodutos ricos em proteína (LUMDUBWONG; SEIB, 2000; WANG; WANG, 2001; WANG; WANG, 2004).

As proteases atuam na extração de aminoácidos e peptídeos favorecendo a solubilidade, devido ao processo de proteólise, onde as proteínas são degradadas a peptídeos ou aminoácidos. Logo, os hidrolisados proteicos possuem propriedades nutricionais e funcionais distintos (LIU et al., 2016; SARI, 2015; WHITEHURST; OORT, 2010). As proteases são empregadas em diferentes tipos de indústrias com a finalidade de extrair e/ou transformar as proteínas presentes em diversas fontes vegetais, modificando suas propriedades e aplicações (LI et al., 2012; LIU et al., 2016; TABTALBAEI; DIOSADY, 2013).

Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar o processo de extração de proteínas do farelo de arroz pelo método enzimático, com aplicação de proteases para a extração e hidrólise das proteínas do farelo de arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

O farelo de arroz desengordurado (FAD) na forma peletizada, cedido pela Indústria Riograndense de Óleos Vegetais (IRGOVEL – Pelotas/RS), foi padronizado pela moagem em moinho de facas (Solab, SL 31, Tipo Willye, Brasil) com granulometria média de 70 mesh, posteriormente embalado em sacos de polietileno e congelado (-20°C). A enzima utilizada para a hidrólise enzimática do farelo de arroz foi a protease (ALCALASE 2.4 L Food Grade) cedida pela empresa LNF – Latino Americana, Bento Gonçalves - RS. Os demais reagentes foram de grau analítico.

Para determinar as melhores condições de extração enzimática, aplicou-se uma estratégia sequencial de planejamento experimental; inicialmente foi aplicado um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF) 2^{4-1} (2 níveis, 4 repetições no ponto central, 12 ensaios) para a seleção das variáveis de influência sobre a resposta de concentração de proteínas extraídas, conforme Tabela 01.

Tabela 01 - Matriz do PFF 2^{4-1} com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração enzimática.

Ensaios	X1 ^a	X2 ^b	X3 ^c	X4 ^d
1	-1(0,5)	-1(30)	-1(30)	-1(7)
2	1(5)	-1(30)	-1(30)	1(9)
3	-1(0,5)	1(60)	-1(30)	1(9)
4	1(5)	1(60)	-1(30)	-1(7)
5	-1(0,5)	-1(30)	1(120)	1(9)
6	1(5)	-1(30)	1(120)	-1(7)
7	-1(0,5)	1(60)	1(120)	-1(7)
8	1(5)	1(60)	1(120)	1(9)

9	0(2,8)	0(45)	0(75)	0(8)
10	0(2,8)	0(45)	0(75)	0(8)
11	0(2,8)	0(45)	0(75)	0(8)
12	0(2,8)	0(45)	0(75)	0(8)

^aConcentração de protease (%); ^bTemperatura (°C); ^cTempo (Minutos); ^dpH.

Fonte: Autoria própria (2019)

Considerou-se a melhor condição de extração, aquela com maior teor proteico (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo), determinado pelo teor de nitrogênio total, multiplicando-se pelo fator 5,95 para conversão em proteínas totais, conforme descrição da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

Para a obtenção do hidrolisado proteico do farelo de arroz (HPFA), o FAD foi submetido às condições de extração enzimática. Pesou-se 100 g de FAD e homogeneizou-se em 1 L de água ultra pura, o pH foi ajustado para 9,0 (Meter Hanna, Brasil) com solução de NaOH 2 mol.L⁻¹ e adicionou-se 3% de protease; em seguida a solução foi submetida a incubação em estufa com agitação (TECNAL, TE4080) (55 °C/150 minutos/ 160 RPM). Sequencialmente a amostra foi centrifugada a 11979 × g durante 15 minutos (25 °C) (Rotina 420 R, Hettich Zentrifugen, Alemanha). O sobrenadante (S1) teve seu pH ajustado para 4,5 (solução de HCl 3 mol.L⁻¹) que é o ponto isoelétrico das proteínas do arroz (GUPTA; CHANDI; SOGI, 2008). A solução foi deixada em repouso *over night* a 10 °C, seguida de centrifugação nas mesmas condições. O precipitado foi recolhido e o sobrenadante foi novamente centrifugado (11979 × g, 15 min, 25 °C), recolhendo-se o precipitado a cada centrifugação. Ao fim, a amostra foi neutralizada (pH 7,0, NaOH 2 mol.L⁻¹), congelada (-18 °C) e liofilizada (Labconco, FreeZone, EUA) (pressão absoluta menor que 0,5 mBar, temperatura de 40 °C, 24 h).

O rendimento global do processo de obtenção do HPFA foi determinado conforme a Equação 01. A pesagem das massas foi realizada em balança analítica (Marte, AW220, São Paulo, Brasil).

$$\text{Rendimento global (\%)} = \frac{\text{Massa HPFA (g)}}{\text{Massa FAD (g)}} \times 100 \quad (01)$$

Para determinar o rendimento proteico da extração, seguiu-se a metodologia proposta por SELLING et al. (2013), conforme descrito na Equação 2:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{(g_0 \times \text{PTO}) \times (100 - U_0)}{(g_{\text{inicial FAD}} \times \text{PTFAD}) \times (100 - U_{\text{FAD}})} \times 100 \quad (02)$$

Onde: g₀ = Massa de HPFA inicial (g); g inicial FAD = Massa de farelo de arroz inicial (g); PTFAD = Proteína total no farelo de arroz (%); PTO = Proteína total no HPFA (%); U₀ = Umidade do HPFA (%); U_{FAD} = Umidade do farelo de arroz (%).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados do PFF 2⁴⁻¹ estão demonstradas na Tabela 02.

Tabela 02 - Matriz do PFF 2⁴⁻¹ com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração enzimática e resposta experimental.

Ensaios	X1 ^a	X2 ^b	X3 ^c	X4 ^d	y ^e
1	-1(0,5)	-1 (30)	-1 (30)	-1 (7)	3,44 ± 0,00
2	1(5)	-1 (30)	-1 (30)	1 (9)	4,69 ± 0,41
3	-1(0,5)	1 (60)	-1 (30)	1 (9)	5,61 ± 0,06
4	1(5)	1 (60)	-1 (30)	-1 (7)	6,95 ± 0,01
5	-1(0,5)	-1 (30)	1 (120)	1 (9)	6,40 ± 0,00
6	1(5)	-1 (30)	1 (120)	-1 (7)	6,70 ± 0,00
7	-1(0,5)	1 (60)	1 (120)	-1 (7)	8,54 ± 0,01
8	1(5)	1(60)	1(120)	1(9)	9,03 ± 0,00
9	0(2,8)	0(45)	0(75)	0(8)	8,35 ± 0,01
10	0(2,8)	0(45)	0(75)	0(8)	8,40 ± 0,01
11	0(2,8)	0(45)	0(75)	0(8)	8,24 ± 0,04

^a Concentração de protease (%); ^b Temperatura (°C); ^c Tempo (Minutos); ^d pH; e Resposta Experimental (média ± erro padrão) para o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo).

Fonte: Autoria própria (2019)

Através da análise de efeitos (Tabela 03), nota-se que as variáveis temperatura (x₂) e tempo (x₃) apresentaram efeitos significativos. Quando a temperatura (x₂) passou do nível inferior (-1) para o superior (+1), ou seja, quando ocorreu o aumento de 30 para 60 °C, esta mudança gerou um efeito positivo sobre o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo). Assim como para o tempo (x₃), quando o nível inferior (-1) passou para o superior (+1), ou seja, com o acréscimo de 30 para 120 minutos, houve um efeito positivo sobre o rendimento da extração (g de proteína. 100g⁻¹ de farelo).

Tabela 03 - Efeitos das variáveis independentes avaliadas no PFF 2⁴⁻¹ sobre o rendimento da extração enzimática das proteínas do farelo de arroz desengordurado.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	6,94	0,36	19,46	0,0000*
(X ₁) Concentração de protease (%)	0,85	0,84	1,01	0,3510
(X ₂) Temperatura (°C)	2,22	0,84	2,66	0,0376*
(X ₃) Tempo (minutos)	2,49	0,84	2,98	0,0246*
(X ₄) pH	0,02	0,84	0,02	0,9811

* p ≤ 0,05; R² = 0,74

Fonte: Autoria própria (2019).

Apesar de não apresentar efeito significativo no teor proteico, observou-se que com o aumento do pH, a separação das fases (sobrenadante 1 e precipitado 1) era favorecida; portanto, fixou-se o pH em 9.

Com base nos efeitos das variáveis do processo observados no PFF, para a realização da segunda etapa (DCCR), a concentração de protease foi fixada em 3% e o pH em 9. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 04. O menor teor de proteínas (7,12 ± 0,01 g de proteína.100 g⁻¹ de farelo) foi obtido no ensaio 7 9 (105 minutos e 40 °C). A maior extração foi alcançada no ensaio 4 (9,59 ± 0,01 g de proteína.100 g⁻¹ de farelo) onde aplicou-se 137 minutos e 57 °C.

Tabela 04 - Matriz do DCCR com valores reais e codificados (entre parênteses) das variáveis estudadas na extração enzimática.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	Y^c	$\hat{Y}^d$	Desvio relativo e (%)
1	-1 (73)	-1 (43)	$8,41 \pm 0,01$	7,59	9,72
2	-1 (73)	1 (57)	$8,36 \pm 0,01$	8,62	-3,18
3	1 (137)	-1 (43)	$8,43 \pm 0,03$	8,33	1,26
4	1 (137)	1 (57)	$9,59 \pm 0,01$	9,36	2,43
5	-1,41 (60)	0 (50)	$7,72 \pm 0,00$	8,02	-3,86
6	1,41 (150)	0 (50)	$8,91 \pm 0,01$	9,05	-1,66
7	0 (105)	-1,41 (40)	$7,12 \pm 0,01$	7,68	-7,87
8	0 (105)	1,41 (60)	$9,25 \pm 0,02$	9,14	1,25
9	0 (105)	0 (50)	$8,31 \pm 0,01$	8,18	1,55
10	0 (105)	0 (50)	$8,24 \pm 0,00$	8,18	0,71
11	0 (105)	0 (50)	$8,00 \pm 0,00$	8,18	-2,34

^a Tempo (Minutos); ^b Temperatura (°C); ^{c,d} Respostas Experimental (média $\pm$ erro padrão) e Predita para o teor de proteínas extraídas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo), respectivamente; ^e Desvio Relativo para teor de proteínas (g de proteína.100 g⁻¹ de farelo) = $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e $\hat{Y}$ = resposta predita pelo modelo.
Fonte: Autoria própria (2019)

Na Tabela 05 estão apresentados os coeficientes de regressão para a resposta do teor de proteínas. A variável temperatura apresentou efeito significativo sobre a resposta, ou seja, quando o nível passou do inferior (-1,41, 40 °C) para o superior (+1,41, 60° C) o teor de proteína extraída aumentou. Verificou-se que a variável tempo também apresentou efeito significativo na faixa estudada, ou seja, quando o nível passou do inferior (-1,41, 60 minutos) para o superior (+1,41, 150 minutos) o teor de proteína extraída aumentou.

Tabela 05 - Coeficientes de regressão para a resposta g de proteína.100 g⁻¹ de farelo

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t (5)	p – valor
Média	8,18	0,25	32,83	0,0000*
x_1^a (L)	0,73	0,31	2,41	0,0612*
x_1^a (Q)	0,35	0,36	0,97	0,3767
x_2^b (L)	1,03	0,301	3,37	0,0198*
x_2^b (Q)	0,23	0,36	0,63	0,5576
$x_1^a \cdot x_2^b$	0,61	0,43	1,40	0,2200

x_1^a – Tempo (minutos); x_2^b – Temperatura (°C); L – termo linear; Q – termo quadrático; * $p \leq 0,10$; $R^2=0,80$;

Fonte: Autoria própria (2019)

Considerando-se os parâmetros significativos ($p \leq 0,10$) obteve-se a Equação 03, que representa o modelo para o teor de proteínas extraídas em função das variáveis estudadas. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 06. Como o $F_{calculado}$ para a regressão foi significativo ($p= 0,080$), sendo maior que o $F_{tabelado}$, podemos concluir que o modelo obteve bons ajustes aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta da Figura 01.

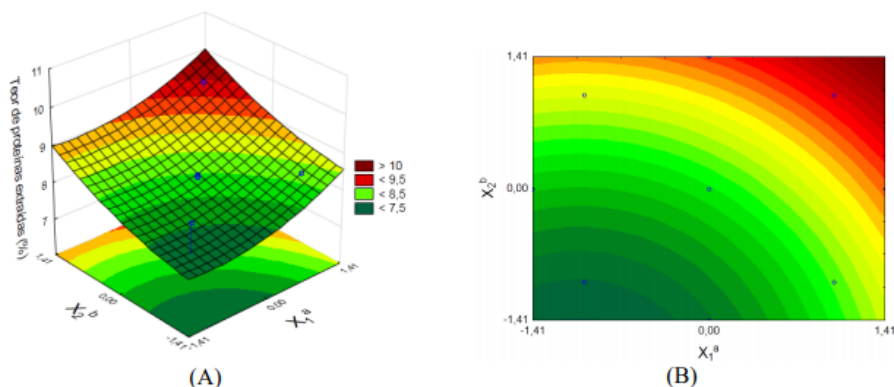
$$Y = 8,18 + 0,367 \cdot x_1 + 0,176 \cdot x_1^2 + 0,51 \cdot x_2 + 0,11 \cdot x_2^2 \quad (03)$$

Tabela 06 - Análise de variância do modelo para predição do teor de proteínas extraídas do farelo de arroz desengordurado pelo método enzimático.

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F _{calculado}	p – valor
1					
Regressão	3,810	5,000	0,762	4,089	0,080
Resíduos	0,932	5,000	0,186		
Total	4,694	10,000	0,469		

^a soma dos quadrados; ^b grau de liberdade; ^c quadrado médio; $R^2 = 0,80$; $F_{\text{Tabelado}} = 3,453$
Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 01: Superfície de resposta (A) e Curvas de curvas de contorno (B) do teor de proteína extraído do farelo de arroz (g de proteína.100g⁻¹ de farelo) em função do tempo (minutos) e temperatura (°C).



x_1^a tempo (minutos), x_2^b Temperatura (°C); %Teor de proteínas extraídas do farelo de arroz (g de proteína.100g⁻¹ de farelo).

Fonte: Autoria própria (2019).

Através da análise da superfície de resposta pode-se verificar que a elevação da temperatura e do tempo resultaram em acréscimo do teor de proteína extraída. Assim, maiores temperaturas (57 e 60 °C) e maior tempo (137 e 150 minutos), proporcionaram maior eficiência do processo. Para validar os resultados obtidos no DCCR e confirmar o efeito da temperatura, foram realizados quatro ensaios, em triplicata, mantendo fixo o pH em 9, a concentração da enzima em 3%, o tempo em 150 minutos e variando a temperatura em 50, 55, 60 e 65 °C.

Observa-se que para o processo de extração proteica, as melhores condições para a obtenção do HPFA foram 3% de protease, em pH 9, durante 150 minutos, a 55 °C.

CONCLUSÃO

O emprego de protease para extração de proteína mostrou-se eficiente e no estudo das variáveis tempo e temperatura, observou-se que em maiores períodos de extração e em temperaturas superiores, o rendimento da extração é favorecido, enquanto que o pH, e concentração de protease não interferiram de modo significativo. A metodologia de superfície de resposta gerou graficamente o conjunto de variáveis operacionais e os níveis adequados ao processo. Entre as

condições estudadas, os melhores resultados foram obtidos em 150 min, à 55 °C, pH 9 e 3% de protease, sendo possível obter um concentrado proteico com teor de proteína de 71,19% com rendimento no processo de 4,63%.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq – Brasil, na forma de bolsa de iniciação científica. Agradecemos também a UTFPR – MD, a Profa. Eliane Colla, pela colaboração na pesquisa científica, ao Programa de Mestrado em Tecnologia de Alimentos da UTFPR-MD e aos programas de iniciação científica da UTFPR.

REFERÊNCIAS

AOAC. American Organization Of Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18. ed. Arlington: AOAC, 2005.

GUPTA, S.; CHANDI, G.K.; SOGI, D. S. Effect of extraction temperature on functional properties of rice bran protein concentrates. **International Journal of Food Engineering**. v.4, art. 8, 2008.

HAMMOND, N. Functional and nutritional characteristics of rice bran extracts. **American Cereal Chemists**, Saint Paul, v. 39, n. 10, p. 752-754, 1994.

LI, Shuang et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. e201209017, 2012.

LIU, Jun-jun et al. Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 35, p. 184-193, 2016.

LUMDUBWONG, N.; SEIB, P. A. Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wetmilled rice flour. **Journal of Cereal Science**, v. 31, n. 1, p. 63-74, 2000.

SARI, Yessie Widya. **Biomass and its potential for protein and amino acids: valorizing agricultural by-products**. Wageningen University, 2015.

TABTABAEI, Solmaz; DIOSADY, Levente L. Aqueous and enzymatic extraction processes for the production of food-grade proteins and industrial oil from dehulled yellow mustard flour. **Food research international**, v. 52, n. 2, p. 547-556, 2013.

VOET, D., VOET, J.G. **Bioquímica**. 3ª.edição. Porto Alegre: Artmed, 2006.

WANG, L.; WANG, Y. J. Comparison of protease digestion at neutral pH with alkaline steeping method for rice starch isolation. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 6, p. 690-692, 2001.

WANG, L.; WANG, Y. J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 291-296, 2004.

WHITEHURST, Robert J.; VAN OORT, Maarten (Ed.). **Enzymes in food technology**. Chinchester: Wiley-Blackwell, 2010.

ZHANG, H. et al. -N. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heatstabilized defatted rice bran. **Food Research International**, v.47, p. 359–363, 2012