

ANA FLÁVIA COELHO PACHECO

**APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DE ULTRASSOM PARA POTENCIALIZAR A
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DA SEMENTE DE ABÓBORA:
EFEITO NAS PROPRIEDADES TÉCNICO-FUNCIONAIS E POTENCIAL
BIOLÓGICO DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Bruno Ricardo de C. Leite Júnior

Coorientadores: Alline Artigiani Lima Tribst
Paulo Henrique Costa Paiva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P116a
2022

Pacheco, Ana Flávia Coelho, 1993-

Aplicação da tecnologia de ultrassom para potencializar a hidrólise enzimática das proteínas da semente de abóbora: efeito nas propriedades técnico-funcionais e potencial biológico dos peptídeos obtidos / Ana Flávia Coelho Pacheco. – Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (104 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.052>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Hidrólise. 2. Abóbora - Semente. 3. Enzimas - Aplicações industriais. 4. Enzimas proteolíticas. 5. Proteínas - Síntese. 6. Ultrassom. I. Leite Júnior, Bruno Ricardo de Castro, 1989-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 660.2844

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

ANA FLÁVIA COELHO PACHECO

**APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DE ULTRASSOM PARA POTENCIALIZAR A
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DA SEMENTE DE ABÓBORA:
EFEITO NAS PROPRIEDADES TÉCNICO-FUNCIONAIS E POTENCIAL
BIOLÓGICO DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de novembro de 2022.

Assentimento:

Ana Flávia Coelho Pacheco
Ana Flávia Coelho Pacheco
Autora

Bruno Ricardo de C. Leite Júnior
Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade oferecida, por ter me guiado até aqui e por abençoar grandemente o meu caminho.

Aos meus pais, Regina e João Carlos, por todo apoio, amor, dedicação, incentivo em mais essa etapa e por não medirem esforços para que eu realize os meus sonhos.

Aos meus irmãos, Flaviana e Jean Carlos, por sempre estarem ao meu lado, pela amizade, apoio e paciência. Vocês são tudo para mim, amo muito vocês.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos em uma excelente instituição.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-00388-2) pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior, pelos ensinamentos, apoio, diálogo, incentivo e confiança durante esses anos de orientação.

Aos meus coorientadores, Dra. Aline Artigiani Lima Tribst e Professor Dr. Paulo Henrique Costa Paiva, pela participação na banca de defesa, ensinamentos, colaboração e assistência na realização desse trabalho. Paulo Henrique Costa Paiva que além de coorientador é meu companheiro, que sempre está ao meu lado, me dando confiança, carinho, paciência, alegria e amor.

Ao Professor Dr. Sebastião Tavares de Rezende, Professora Dra. Érica Nascif Rufino Vieira e Dra. Carini Aparecida Lelis, pela participação na banca de defesa, pela disponibilidade e contribuições tão importantes e necessárias.

À princesinha Maria, por trazer mais alegria e amor pra minha Vida.

Ao Senhor Zezinho, Dona Lucy e família, por todo amor, carinho e recepção.

Aos integrantes do LIPA, por serem ótimos colegas de trabalho, pela cooperação, conversas, cafezinhos e boas risadas.

Aos amigos que conheci durante essa caminhada, especialmente Isabela, Gabriela Zinato, Gabriela Nalon, Jeferson, Heloisa, Letícia e Jhonathan. Obrigada pelos momentos compartilhados.

As amigas Brianny, Laianne, Marcela e Paula, pela amizade desde o ensino médio e que estão sempre presentes em minha vida.

Aos meus amigos acadêmicos, pela escuta empática, incentivo e sobretudo, pela rede de apoio nos momentos mais desafiadores. Carinhosamente, agradeço a Ana Beatriz, Lívia, Rafaela e Valéria.

Aos amigos Kely e Wilson, pela amizade construída na Candinha (ILCT). Vocês são muito especiais.

À Carol, minha cunhada, pela amizade e carinho.

Ao meu Tio Manoel, *in memoriam*, por todo amor, dedicação comigo e meus irmãos, que continuará sempre em nossos corações.

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, fizeram parte dessa conquista e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

BIOGRAFIA

Ana Flávia Coelho, Pacheco, filha de João Carlos Pacheco e Regina Célia Coelho Pacheco, nasceu em São João Nepomuceno, Minas Gerais, em 07 de outubro de 1993.

Em março de 2013, ingressou no curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em julho de 2017.

Em abril de 2017 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, obtendo seu título em fevereiro de 2019.

Em março de 2020 iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em novembro de 2022.

RESUMO

PACHECO, Ana Flávia Coelho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2022. **Aplicação da tecnologia de ultrassom para potencializar a hidrólise enzimática das proteínas da semente de abóbora: Efeito nas propriedades funcionais e biológicas dos peptídeos obtidos.** Orientador: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior. Coorientadores: Alline Artigiani Lima Tribst e Paulo Henrique Costa Paiva.

As proteínas de sementes de abóbora (PSA) apresentam potencial como matéria prima para a produção de hidrolisados multifuncionais. A hidrólise enzimática é preferível; entretanto, o alto custo das enzimas, o baixo grau de hidrólise e o longo tempo de reação limitam a proteólise em escala industrial. Para superar essas desvantagens, a tecnologia de ultrassom (US) pode ser utilizada para melhorar a performance enzimática. Desta forma, este estudo avaliou o efeito do US na hidrólise das PSA usando quatro enzimas comerciais (Alcalase®, Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase®). Inicialmente, avaliou-se o efeito do US (40 kHz, 23,8W/L, pH 7,5, 25-60°C, até 300 min) usando a Alcalase® em três situações: aplicação de US no pré-tratamento da enzima, no pré-tratamento do substrato e na reação assistida visando melhorar a taxa de proteólise, a concentração final de hidrolisados, a solubilidade e a atividade antioxidante *in vitro*. Na etapa seguinte, foi determinado o efeito do US (40 kHz, 23,8 W/L, pH 7,5, em diferentes temperaturas por até 180 min) no pré-tratamento da Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® através da avaliação das alterações induzidas pelo processo nas estruturas das enzimas e estas foram correlacionadas com as melhorias observadas nos parâmetros cinéticos da hidrólise e na solubilidade e atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados obtidos. Após a aplicação do US na Alcalase® e na PSA foi observado que a atividade proteolítica aumentou até 10,3 e 50,1%, respectivamente, sugerindo potencialização da atividade de Alcalase® tratada e maior facilidade da hidrólise da proteína quando esta foi pré-tratada. Em condições potencializadas e assistidas por US, a hidrólise das PSA proporcionou um aumento na taxa (até 280%) e na concentração final de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) (até 24%). Consequentemente, os hidrolisados obtidos com a intervenção do US apresentaram maior solubilidade ($\leq 148,1\%$) e maior capacidade de sequestro de radicais, conforme evidenciado pelos ensaios ABTS e DPPH. O pré-tratamento por US da Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® aumentou a atividade destas enzimas em até 20,8%, 22,4% e 22,7%, respectivamente. Por outro lado, em

condições mais drásticas de processo, o US promoveu uma redução na atividade até 28,0% (Brauzyn®), 73,2% (Flavourzyme®) e 19,3% (Neutrase®). Em condições de ativação e principalmente nas de inativação, observou-se que o US causou alterações nas estruturas terciárias das enzimas. Essas alterações levaram à mudanças nas macros características das enzimas (tamanho médio, IPD e pontecial zeta), impactando nas atividades residuais. Em condições de máxima ativação por US, a Flavourzyme® apresentou maior taxa de hidrólise (aumento de até 125% a 25°C) e a Brauzyn® e a Neutrase® apresentaram maior grau de hidrólise final (aumento de até 75% a 25°C e 76% a 40°C, respectivamente). Consequentemente, houve um aumento na solubilidade (destaque para Neutrase®) e atividade antioxidante *in vitro* (especialmente para Neutrase® e Flavourzyme®) dos hidrolisados. Portanto, o ultrassom pode ser estrategicamente usado para melhorar o perfil hidrolítico de proteases comerciais visando a produção de hidrolisados proteicos com propriedades biológicas e técnico-funcionais a partir da PSA.

Palavras-chave: Ativação enzimática. Peptídeos. Proteases. Proteólise. Semente de abóbora. Sonicação.

ABSTRACT

PACHECO, Ana Flávia Coelho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November 2022. **Application of ultrasound technology to potentiate the enzymatic hydrolysis of pumpkin seed proteins: Effect on the functional and biological properties of the peptides obtained.** Advisor: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior. Co-advisors: Alline Artigiani Lima Tribst and Paulo Henrique Costa Paiva.

Pumpkin seed proteins (PSP) have the potential to generate multifunctional hydrolysates. Enzymatic hydrolysis is preferable, however, high cost of enzymes, low hydrolysis degree and long reaction time limit proteolysis on an industrial scale. To overcome these disadvantages, ultrasound (US) can be used to improve enzyme performance. Thus, this study evaluated the effect of US on PSP hydrolysis using four commercial enzymes (Alcalase®, Brauzyn®, Flavourzyme® and Neutrase®). Initially, the effect of US (40 kHz, 23.8W/L, pH 7.5, 25-60°C, up to 300 min) was evaluated using Alcalase® in three situations: application of US in the pre-treatment of enzyme, in the substrate pre-treatment and in the assisted reaction aiming to improve the proteolysis rate, the final concentration of hydrolysates, the solubility and the *in vitro* antioxidant activity. In the next step, the effect of US (40 kHz, 23.8 W/L, pH 7.5, at different temperatures for up to 180 min) in the pre-treatment of Brauzyn®, Flavourzyme® and Neutrase® was evaluated. The alterations induced by the process in the enzyme structures were correlated with the improvements observed in the kinetic parameters of the hydrolysis and in the solubility and *in vitro* antioxidant activity of the obtained hydrolysates. After the application of US to Alcalase® and PSP, it was observed that the proteolytic activity increased up to 10.3 and 50.1%, respectively, suggesting potentiation of the treated Alcalase® activity and greater ease of protein hydrolysis when it was pre-treated. Under potentiated and US-assisted conditions, PSP hydrolysis provided an increase in the rate (up to 280%) and in the final concentration of soluble trichloroacetic acid (TCA) peptides (up to 24%). Consequently, the hydrolysates obtained with the intervention of US showed greater solubility ($\leq 148.1\%$) and greater ability to scavenge radicals, as evidenced by the ABTS and DPPH assays. US pretreatment of Brauzyn®, Flavourzyme® and Neutrase® increased the activity of these enzymes by up to 20.8%, 22.4% and 22.7%, respectively. On the other hand, under more drastic process conditions, the US promoted a reduction in activity up to 28% (Brauzyn®), 73.2% (Flavourzyme®) and

19.3% (Neutrase®). Under activation and inactivation conditions, it was observed that US caused alterations in the tertiary structures of the enzymes, especially under inactivation conditions. These alterations led to changes in the macro characteristics of the enzymes (average size, IPD and zeta potential), impacting the residual activities. Under conditions of maximum activation by US, Flavourzyme® showed a higher hydrolysis rate (up to 125% increase at 25°C) and Brauzyn® and Neutrase® showed a higher degree of final hydrolysis (up to 75% increase at 25°C and 76% at 40°C, respectively). Consequently, there was an increase in the solubility (especially Neutrase®) and *in vitro* antioxidant activity (especially for Neutrase® and Flavourzyme®) of the hydrolysates. Therefore, ultrasound can be strategically used to improve the hydrolytic profile of commercial proteases aiming at the production of protein hydrolysates with biological and technical-functional properties from PSP.

Keywords: Enzyme activation. Peptides. Proteases. Proteolysis. Pumpkin seed. Sonication.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1: Proteínas de sementes de abóbora e propriedades multifuncionais de seus hidrolisados: uma revisão

Figura 1 – Fluxograma referente a busca de dados.....23

Figura 2 – Propriedades técnico-funcionais e bioativas de hidrolisados e peptídeos, respectivamente.....31

CAPÍTULO 2: Impact of ultrasound on pumpkin seed protein concentrate hydrolysis: Effects on Alcalase®, protein, and assisted reaction

Figure 1 – Effect of pH and Temperature on relative enzyme activity (REA) of Alcalase® in pumpkin seed protein concentrate. Vertical bars represent standard deviation. The pH and temperature condition with the highest activity was established as optimal, with 100% of the enzyme activity. *The relative enzyme activity (REA) was calculated using Eq. (1) for all other temperature and pH values*.....57

Figure 2 – Relative enzyme activity measured at 60 °C/pH 7.50 on pumpkin seed protein concentrate using Alcalase® pretreated by ultrasound for up to 300 min at different temperatures (A: 25 °C, B: 40 °C and C: 60 °C) (REAE, Eq. (2)). *Different letters between the non-processed sample (0 min) and processed samples at different times at the same pH and temperature indicate significant differences at 5% probability by the Tukey test*.....58

Figure 3 – Relative enzyme activity of Alcalase® measured at 60 °C/pH 7.50 using pumpkin seed protein concentrate pretreated by ultrasound for up to 300 min at different temperatures (A: 25 °C, B: 40 °C and C: 60 °C) (REAS, Eq. (2)). *Different letters between the non-processed sample (0 min) and processed samples at different times at the same pH and temperature indicate significant differences at 5% probability by the Tukey test*.....59

Figure 4 – Pumpkin seed protein concentrate (PSPC) hydrolysis by Alcalase® at different temperatures (A: 25, B: 40, C: 60 °C) using ultrasound pretreated Alcalase® and PSPC under optimized conditions or assisted by ultrasound. *The dots are the experimental values, the vertical bars are the standard deviation for each condition and*

the curves (continuous lines) are the adjusted model of Eq. (3).....61

Figure 5 – Protein solubility (%) of pumpkin seed protein concentrate (PSPC) hydrolyzed for 30 (A), 120 (B), and 300 (C) min at 60°C using ultrasound pretreated Alcalase® and PSPC under optimized conditions or assisted by ultrasound. *Different letters at each pH indicate significant differences among samples ($p<0.05$)*.....65

Figure 6 – *in vitro* antioxidant activity from the (A) DPPH and (B) ABTS assays of PSPC hydrolyzed for up to 300 min at 60 °C using ultrasound pretreated Alcalase® and PSPC under optimized conditions or assisted by ultrasound. *Different letters for each assay indicate significant differences among samples ($p<0.05$)*.....67

CAPÍTULO 3: Alterações estruturais induzidas por ultrassom em proteases e suas consequências na hidrólise de proteínas de semente de abóbora e nas propriedades multifuncionais dos hidrolisados obtidos

Figura 1 – Efeito da temperatura na atividade enzimática relativa (AER) de Brauzyn® (A), Flavourzyme® (B) e Neutrase® (C) na PCSA. As barras verticais representam o desvio padrão. A condição de temperatura com maior atividade foi estabelecida como ótima, com 100% da atividade enzimática. A atividade enzimática relativa (AER) foi calculada usando a Eq. (1) para todos os outros valores de temperatura. Letras diferentes para cada enzima em temperaturas diferentes indicam diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....83

Figura 2 – Atividade enzimática relativa medida a 60°C (Brauzyn®), 55°C (Flavourzyme®) e 50°C (Neutrase®) em PCSA usando Brauzyn® (A-C), Flavourzyme® (D-F) e Neutrase® (G-I) pré-tratada por US por até 180 min em diferentes temperaturas (AER_E, Eq. (2)). Letras diferentes para a mesma amostra em diferentes tempos na mesma temperatura indicam diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....85

Figure 3 – Espectros UV em pH 7,5 para Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® pré-tratadas por US sob condições de ativação (linha verde) e inativação (linha vermelha).....	87
Figura 4 – Espectros de fluorescência intrínseca de emissão de Trp para Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® pré-tratadas por US sob condições de ativação (linha verde) e inativação (linha vermelha).....	89
Figura 5 – Tamanho médio de partícula (A), índice de polidispersão (B) e potencial zeta (C) em pH 7,5 para Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® pré-tratadas por US sob condições de ativação (linha verde) e inativação (linha vermelha). <i>Letras diferentes para cada enzima indicam diferenças significativas entre as amostras ($p<0,05$)</i>	91
Figure 6 – Hidrólise da proteína concentrada da semente de abóbora (PCSA) em diferentes temperaturas usando Brauzyn® (A, B e C), Flavourzyme® (D, E e F) e Neutrase® (G, H e I) em suas formas nativas ou pré-tratadas por US em condições de máxima ativação. <i>Os pontos são os valores experimentais, as barras verticais são o desvio padrão para cada condição e as curvas (linhas contínuas) são geradas pelo modelo ajustado a Eq. (4)</i>	93
Figura 7 – Solubilidade proteica (%) da PCSA hidrolisada por 45 e 180 minutos em temperatura ótima para cada enzima usando as proteases em suas formas nativas ou ativadas por US. <i>Letras diferentes em cada pH indicam diferenças significativas entre as amostras ($p<0,05$)</i>	96
Figura 8 – Atividade antioxidante <i>in vitro</i> (%) dos ensaios DPPH e ABTS da PCSA hidrolisada por 45 e 180 minutos em temperatura ótima para cada enzima em sua forma nativa ou ativada por US. <i>Letras diferentes para cada ensaio indicam diferenças significativas entre as amostras ($p<0,05$)</i>	98

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Proteínas de sementes de abóbora e propriedades multifuncionais de seus hidrolisados: uma revisão

Tabela 1 – Composição centesimal média de sementes de abóbora.....24

Tabela 2 – Perfil de aminoácidos (g/100 g) em sementes de abóbora.....25

Tabela 3 – Propriedades técnico-funcionais e biológicas de hidrolisados e peptídeos de proteínas de sementes de abóbora obtidos pela ação de proteases.....32

Tabela 4 – Propriedades técnico-funcionais e biológicas de hidrolisados e peptídeos de proteínas de sementes de abóbora obtidos pela ação de proteases.....36

CAPÍTULO 2: Impact of ultrasound on pumpkin seed protein concentrate hydrolysis: Effects on Alcalase®, protein, and assisted reaction

Table 1 – Parameters of Eq. (3) adjusted to hydrolysis of Alcalase® on pumpkin seed protein concentrate (PSPC) at different reaction temperatures using ultrasound pretreated Alcalase® and PSPC under optimized conditions or assisted by ultrasound.....62

CAPÍTULO 3: Alterações estruturais induzidas por ultrassom em proteases e suas consequências na hidrólise de proteínas de semente de abóbora e nas propriedades multifuncionais dos hidrolisados obtidos

Tabela 1 – Parâmetros da Eq. (4) ajustado à hidrólise da PCSA em diferentes temperaturas usando proteases em sua forma nativa ou pré-tratadas por US em condições de máxima ativação.....94

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
Capítulo 1: Proteínas de sementes de abóbora e propriedades multifuncionais de seus hidrolisados: uma revisão	20
Resumo	20
1. Introdução	21
2. Metodologia	22
3. Resultados e Discussão	23
3.1. Composição das sementes de abóbora e suas proteínas	23
3.2. Propriedades técnico-funcionais de proteínas de sementes de abóbora	26
3.3. Métodos para obtenção de hidrolisados e peptídeos a partir da proteína nativa	28
3.4. Propriedades multifuncionais dos hidrolisados e peptídeos de proteínas de sementes de abóbora	30
3.5. Perspectivas futuras e desafios	38
4. Considerações Finais	39
Agradecimentos	39
Referências	40
Capítulo 2: Impact of ultrasound on pumpkin seed protein concentrate hydrolysis: Effects on Alcalase®, protein, and assisted reaction	49
Graphical Abstract	50
Abstract	51
1. Introduction	52
2. Material and Methods	53
2.1 Enzyme and pumpkin seed protein concentrate (PSPC)	53
2.2 Determination of Alcalase® activity in PSPC at different pH and temperatures	54
2.3 Effect of pretreatment by ultrasound on Alcalase® and PSPC: Evaluation of enzyme activity	54
2.4 PSPC hydrolysis using US-pretreated enzyme and substrate under optimized conditions or under US-assisted reaction	55
2.5 Evaluation of solubility and <i>in vitro</i> antioxidant activity	56
2.6 Experimental design and statistical analysis	56
3. Results and Discussion	57
3.1. Effect of ultrasound on Alcalase® and PSPC: Evaluation of enzyme activity	57
3.2. Kinetic parameters of PSPC hydrolysis	60

3.3 Evaluation of solubility and <i>in vitro</i> antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from US-enhanced enzymatic hydrolysis of PSPC	64
4. Conclusion.....	68
Acknowledgments	68
References	69
Capítulo 3: Alterações estruturais induzidas por ultrassom em proteases e suas consequências na hidrólise de proteínas de semente de abóbora e nas propriedades multifuncionais dos hidrolisados obtidos	74
Resumo	74
1. Introdução	75
2. Material e Métodos	76
2.1 Proteases e proteína concentrada de semente de abóbora (PCSA).....	76
2.2 Atividade das proteases comerciais sobre a PCSA em diferentes temperaturas	77
2.3 Pré-tratamento das proteases por US: Efeito na atividade enzimática residual ..	77
2.4 Efeito do pré-tratamento ultrassônico na conformação estrutural das proteases em condições de ativação e inativação	78
2.4.1 Espectros de absorbância na região Ultravioleta (UV)	78
2.4.2 Fluorescência Intrínseca	79
2.4.3 Potencial zeta, tamanho médio de partícula (TMP) e índice de polidispersão (IPD).....	79
2.5. Cinética de hidrólise das proteases pré-processadas por US em condições de máxima ativação	80
2.6 Avaliação da solubilidade e da atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos hidrolisados obtidos utilizando enzima pré-processada em condições de máxima ativação	81
2.6.1 Solubilidade.....	81
2.6.2. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	81
2.7 Desenho experimental e análises estatísticas.....	82
3. Resultados e Discussão	82
3.1. Determinação da temperatura ótima para atividade das diferentes enzimas em PCSA	82
3.2. Efeito do ultrassom na atividade proteolítica das enzimas sobre a PCSA	84
3.3 Alterações conformacionais induzidas pelo processo de US nas proteases.....	86
3.3.1 Espectros de absorbância na região Ultravioleta (UV) e Fluorescência Intrínseca	86
3.3.2 Tamanho médio de partícula (TMP), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta	90
3.3. Parâmetros cinéticos da hidrólise de PCSA usando proteases pré-tratadas por US em condições de máxima ativação	93

3.4 Avaliação da solubilidade e atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos hidrolisados proteicos obtidos da hidrólise da PCSA utilizando enzimas ativadas por US	96
4. Conclusão	99
Agradecimentos	99
Referências	100
CONCLUSÕES GERAIS.....	104

INTRODUÇÃO GERAL

A de sementes de abóbora (*Curcubita pepo*) é um subproduto que apresenta alto potencial para ser explorada por conter 24,5 – 36% de proteínas em sua composição. As proteínas da semente de abóbora (PSA) são fonte de aminoácidos essenciais, como leucina, fenilalanina, histidina e isoleucina que, quando liberados da proteína nativa, exibem atividades biológicas, como capacidade antioxidante e ações anti-hipertensiva e antidiabética. Além disso, a hidrólise proteica pode melhorar as propriedades técnico-funcionais, como solubilidade.

A melhoria das propriedades técnico-funcionais em proteínas vegetais é muito desejável, uma vez que a maioria dessas proteínas apresentam baixa solubilidade em água. Particularmente, a PSA apresenta baixa solubilidade em solução aquosa em pH 4,0-6,0, o que influencia diretamente nas demais propriedades técnico-funcionais, como emulsificação e formação de espuma, limitando seu uso em escala industrial.

A hidrólise enzimática é uma das abordagens mais importantes para a produção de hidrolisados. Diversos estudos têm usado diferentes proteases comerciais devido às especificidades de cada enzima na geração de peptídeos multifuncionais. Entre opções de enzimas comerciais, a Alcalase® catalisa as ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos com grupos carboxila Phe, Tyr, Trp e Lys, Brauzyn® cliva as ligações peptídicas dos aminoácidos Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp e Tyr, Flavourzyme® clivam preferencialmente a ligação peptídica entre Leu e Pro ou Pro e Pro e Neutrase® cliva preferencialmente a ligação peptídica entre o C-terminal Leu e Phe na posição P1.

Apesar das vantagens no uso de enzimas em processos industriais, como sustentabilidade do processo e especificidade dos produtos, existem algumas desvantagens como o alto custo da enzima, o longo tempo de reação e o alto consumo de energia. Consequentemente, tecnologias não-convencionais têm sido empregadas em conjunto com a hidrólise enzimática para melhorar o desempenho das enzimas. Dentre as tecnologias, destaca-se o ultrassom (US) por ser considerado economicamente viável, eficiente e versátil, com aplicações diversas na indústria alimentícia. Estrategicamente, o US pode ser aplicado isoladamente em enzimas ou substratos como um pré-tratamento antes da hidrólise e, para alguns processos, por meio de reações assistidas, visando melhorar o desempenho enzimático. O aumento na hidrólise observado pode ser atribuído a três fatores distintos: (i) aceleração da

transferência de massa sob reação assistida por ultrassom (Soares et al., 2019), (ii) ocorrência de alterações estruturais no substrato e/ou (iii) em enzimas.

A aceleração da transferência de massa pode ser explicada pelo alto nível de energia liberada durante o fenômeno de cavitação, que pode reduzir a barreira limitante de difusão entre a enzima e o substrato, aumentando a velocidade da atividade da enzima. Com relação às mudanças estruturais no substrato e na enzima, a intensa força de cisalhamento gerada pela implosão das bolhas de cavitação pode afetar as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio de moléculas de proteínas, induzindo o desdobramento parcial de suas estruturas moleculares tridimensionais, com a consequente exposição de grupos hidrofóbicos e/ou sulfidríla, bem como agregação molecular devido a alterações nas estruturas secundárias e terciárias da proteína. Em enzimas, mudanças estruturais e desdobramentos podem expor sítios ativos aprisionados no núcleo catalítico de enzimas nativas, melhorando seu desempenho.

Apesar da existência de estudos que mostram que o US apresenta resultados satisfatórios em diversas reações enzimáticas, os efeitos da aplicação desta tecnologia na hidrólise das PSA ainda não haviam sido elucidados. Portanto, este projeto propôs investigar a aplicação da tecnologia de US para potencializar a hidrólise enzimática das PSA, visando a obtenção de hidrolisados com melhores propriedades técnico-funcionais e peptídeos potencialmente bioativos. Especificamente, o Capítulo 1 aborda uma revisão das proteínas das sementes de abóbora e as propriedades multifuncionais de seus hidrolisados. No Capítulo 2 é descrito o impacto do US na hidrólise das PSA em três vias: efeito na Alcalase®, na PSA e na reação assistida. Por fim, o Capítulo 3 apresenta as alterações estruturais induzidas por ultrassom na Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® e suas consequências na hidrólise das PSA e nas propriedades multifuncionais dos hidrolisados obtidos. A partir destes resultados, espera-se diversificar as aplicações do US e ampliar a utilização deste subproduto permitindo a viabilização econômica em termos de qualidade, custo e rendimento.

Capítulo 1

Proteínas de sementes de abóbora e propriedades multifuncionais de seus hidrolisados: uma revisão

Trabalho publicado na revista Research, Society and Development. Pacheco, A. F. C.; Pereira, G. Z.; Rodrigues, A. C. S.; Cunha, J. S.; Pacheco, F. C.; Paiva, P. H. C.; Tribst, A. A. L.; Leite Junior, B. R. C. Proteínas de sementes de abóbora e propriedades multifuncionais de seus hidrolisados: uma revisão. Research, Society and Development., v. 11, n. 8, p. e47211831161, 2022.

Capítulo 1: Proteínas de sementes de abóbora e propriedades multifuncionais de seus hidrolisados: uma revisão

Resumo

As sementes de abóbora são, na maioria das vezes, descartadas ou destinadas à alimentação animal, apesar de serem uma fonte promissora de proteínas. Diversos estudos têm demonstrado o potencial técnico-funcional de diferentes proteínas vegetais utilizadas no processamento de alimentos como ingredientes para melhoria das propriedades de formação de espuma, emulsificação e gelificação. Entretanto, a baixa solubilidade em água das proteínas de sementes de abóbora dificulta a sua aplicação industrial em diversos produtos. Para superar esta limitação, a hidrólise dessas proteínas surge como uma estratégia promissora para obtenção de compostos com melhores propriedades técnico-funcionais em comparação com as proteínas nativas. Além disso, os peptídeos obtidos podem exercer potenciais propriedades biológicas, tais como: atividades antidiabética, antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória e antimicrobiana. Com esta revisão de literatura, estudos sobre proteínas de sementes de abóbora, sua composição e propriedades técnico-funcionais foram compilados. As propriedades dos hidrolisados e peptídeos bioativos obtidos por meio da hidrólise enzimática das proteínas de sementes de abóbora foram enfatizados, de modo a difundir conhecimentos acerca do aproveitamento sustentável de uma fonte proteica de elevado potencial industrial. Os trabalhos mostraram que a hidrólise enzimática possibilita a obtenção de peptídeos bioativos com propriedades biológicas relevantes. Porém, estudos também devem ser conduzidos para compreensão do comportamento dos peptídeos bioativos em diferentes matrizes alimentares e em sistemas *in vivo*, a fim de reconhecer as suas bioatividades apresentadas *in vitro*.

Palavras-chave: Proteína vegetal; Propriedades técnico-funcionais; Propriedades biológicas; Hidrolisados; Peptídeos.

1. Introdução

As indústrias de processamento vegetal geram toneladas de resíduos anualmente por não utilizarem de modo integral as suas matérias-primas, sendo o quinto maior contribuinte para o total de desperdícios de alimentos dentre os diversos segmentos do setor alimentício, representando 8% do total (Fava et al., 2015; Banerjee et al., 2017). Entre os alimentos vegetais que geram uma grande quantidade de resíduos, principalmente sementes e cascas, destaca-se a abóbora (Fava et al., 2015).

A abóbora pertence à família Cucurbitaceae (Rahman et al., 2019). Sua produção mundial aumentou consideravelmente nos últimos anos, passando de 22 milhões de toneladas em 2008 para 27 milhões de toneladas em 2017, sendo a China e a Índia os principais produtores com cerca de 30 e 20% do total da produção mundial, respectivamente. Do ponto de vista nutricional, as abóboras são fontes valiosas de carotenoides, mas também contêm quantidades significativas de proteínas, fibras e tocoferol (Norfezah et al., 2011). No entanto, seu processamento, tanto artesanal quanto industrial, gera toneladas de resíduos como as sementes (representam 5% do peso total da abóbora) que, apesar de serem uma fonte expressiva de proteínas (24,5 a 36,0% em base seca), na maioria das vezes são destinadas à alimentação animal ou descartadas.

As sementes de abóbora representam uma fonte relativamente barata de proteínas em comparação com produtos de origem animal. Na indústria de alimentos, as proteínas de sementes de abóbora têm demonstrado potencial para diversas aplicações, devido às suas propriedades técnico-funcionais como emulsificação, principalmente (Bučko et al., 2015). Por outro lado, estas proteínas apresentam restrições relacionadas à sua baixa solubilidade em meio aquoso, com valores mínimos em pH 5 (correspondente ao seu ponto isoelétrico) e valores máximos em pH acima de 8, ou seja, a solubilidade aumenta em pH alcalino (Rezig et al., 2013; Bučko et al., 2015).

A solubilidade é uma propriedade que influencia diretamente nas outras propriedades técnico-funcionais e, conseqüentemente, na aplicação das proteínas de sementes de abóbora na indústria alimentícia. Logo, a obtenção de hidrolisados a partir destas proteínas surge como uma estratégia interessante para melhorar a solubilidade e outras propriedades técnico-funcionais como a emulsificação e formação de espuma (Bučko et al., 2016). Além disso, alguns estudos têm

demonstrado que os hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora podem conter peptídeos potencialmente bioativos, apresentando atividades antidiabética, antioxidante e anti-hipertensiva (Vaštag et al., 2011; Venuste et al., 2013; Vaštag et al., 2014; Nourmohammadi et al. 2017).

Desta forma, esta revisão tem o objetivo de apresentar o conhecimento atual sobre as proteínas de sementes de abóbora, sua importância tecnológica e limitações em aplicações na indústria de alimentos, enfatizando a obtenção de hidrolisados como uma estratégia para superar os desafios relacionados à sua técnico-funcionalidade. Assim, esse estudo descreve as principais formas de obtenção e as propriedades multifuncionais dos hidrolisados e peptídeos obtidos a partir de proteínas de sementes de abóbora, assim como as perspectivas futuras e desafios para otimizar à sua aplicação em diversos produtos alimentícios.

2. Metodologia

O presente trabalho trata-se de uma revisão narrativa, sobre os temas relacionados com propriedades multifuncionais dos hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora. As informações foram adquiridas com base em uma extensa pesquisa bibliográfica nas seguintes bases de dados eletrônicas: Web of Science, Scopus, Pubmed, Science Direct e Google Acadêmico. Para a busca de artigos científicos, selecionaram-se as palavras-chave “proteínas vegetais”, “abóboras”, “sementes de abóbora”, “resíduos agroindustriais”, “proteínas de sementes de abóbora”, “propriedades técnico-funcionais de proteínas de sementes de abóbora” e “propriedades biológicas de proteínas de sementes de abóbora”.

Os critérios adotados para a seleção dos artigos incluíram estudos publicados em inglês, predominando aqueles publicados nos últimos 15 anos. Além disso, para evitar possíveis fontes de viés e com base no objetivo do estudo, foram utilizados critérios de inclusão/exclusão e eliminação de duplicatas para elegibilidade.

Os resultados da revisão narrativa foram apresentados no fluxograma ilustrado na Figura 1. Inicialmente, foram identificados 5543 artigos, dos quais 451 artigos no Web of Science, 446 no Scopus, 607 no Pubmed e 4039 no Science Direct. Após os critérios de inclusão/exclusão e eliminação de duplicatas, a amostra final foi de 28 artigos.

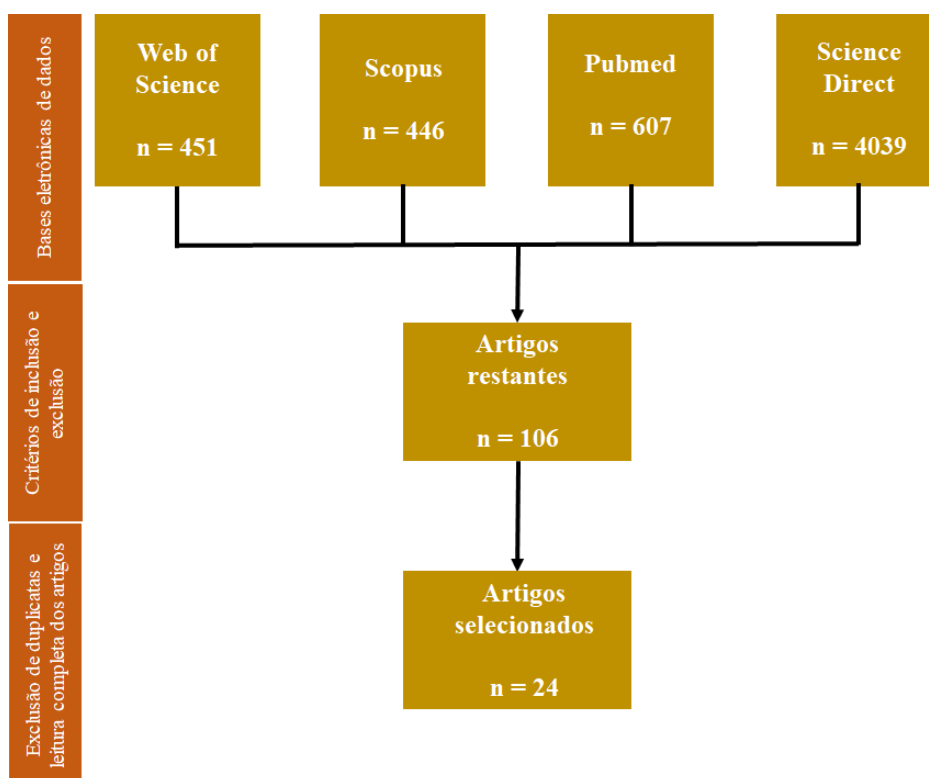


Figura 1 – Fluxograma referente a busca de dados. **Fonte:** Os autores.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição das sementes de abóbora e suas proteínas

As abóboras pertencem à família Cucurbitaceae (Rahman et al., 2019) e sua produção se destaca no Brasil e em diversos outros países (Mitić et al., 2018). Embora existam diversas variedades cultivadas em todo o mundo, as espécies comercialmente mais importantes são a *Cucurbita pepo*, *C. maxima*, *C. moschata*, *C. mixta* e *C. stilbo* (Rezig et al., 2013; Bučko et al., 2015). Durante a sua industrialização, principalmente pelas indústrias de doces, grande quantidade de resíduos são gerados, constituídos principalmente de sementes e cascas. Estes geralmente são descartados, fato que requer o desenvolvimento de alternativas para a sua utilização sustentável, agregando valor aos produtos obtidos (Vale et al., 2019).

As sementes representam 5% do peso total da abóbora e sua composição varia dependendo de fatores como espécie, variedade, localização e clima. A Tabela 1 apresenta a composição centesimal média de sementes de abóbora descrita em alguns estudos (Lazos, 1986; Amo et al., 2004; Alfawaz, 2006; Rezig et al, 2012).

Tabela 1. Composição centesimal média de sementes de abóbora.

Componente	Valores médios em 100g de semente			
	Lazos, 1986	Amo et al., 2004	Alfawaz, 2006	Rezig, et al., 2012
Umidade (%)	5,40	3,08	5,97	8,46
Energia (kcal)	676	628	453	455
Proteínas brutas (g)	32,3	14,31	39,25	33,92
Gordura Bruta (g)	45,4	52,13	27,83	31,57
Carboidratos (g)	5,55	24,45	11,48	0,11
Fibra Bruta (g)	12,1	2,55	16,84	21,97
Cinzas totais (mg)	4,65	3,60	4,59	3,97

Fontes: Lazos, 1986; Amo et al., 2004; Alfawaz, 2006; Rezig et al, 2012.

Em relação as proteínas, nas sementes de abóbora, a maior fração proteica é representada pelas globulinas 12S (Blagrove & Lilley, 1980; Marcone, 1999). As globulinas 12S das sementes de abóbora são também chamadas de cucurbitinas e são homólogas às relatadas em sementes de leguminosas, como as proteínas de soja (Rezig et al., 2013; Yang et al., 2019). A molécula de globulinas 12S tem uma massa molar de 325 kDa e é composta por seis subunidades semelhantes de massa molar igual a 54 kDa. Estas subunidades, por sua vez, contêm duas cadeias polipeptídicas (massas molares de aproximadamente 33 kDa e 22 kDa, respectivamente) que interagem entre si por meio de ligações dissulfeto (Colman et al., 1980; Marcone et al., 1998). As globulinas 12S são acompanhadas por albuminas 2S e essas duas frações proteicas juntas compõem 59% do teor de proteína bruta em sementes de abóbora (Fruhworth & Hermetter, 2007; Yang et al., 2019). Além disso, pequenas quantidades de globulinas 18S foram detectadas, as quais provaram ser um dímero dos componentes 12S (Blagrove & Lilley, 1980; Yang et al., 2019).

As proteínas têm uma série de funções no desenvolvimento saudável da população, principalmente em relação ao fornecimento de aminoácidos essenciais para a nutrição humana (Devi et al., 2018). Neste sentido, o fornecimento dietético de aminoácidos essenciais em quantidade e qualidade adequados é igualmente importante para as funções fisiológicas do organismo humano. No caso das proteínas de sementes de abóbora, estas apresentam quase todos os aminoácidos essenciais e que desempenham papéis importantes tanto como unidades de construção proteica quanto como intermediários no metabolismo (Asiegbu, 1987; Rezig et al., 2013; Amin et al., 2019). A composição média de aminoácidos das proteínas de sementes de abóbora é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Perfil de aminoácidos (g/100 g) em sementes de abóbora.

Aminoácido	Ocorrência (%)
Alanina	0,74 - 6,9
Arginina	1,70 - 23,10
Ácido aspártico	2,05 - 2,70
Cistina	0,40 - 6,40
Ácido glutâmico	3,50 - 3,73
Glicina	1,50 - 6,80

Histidina	0,80 - 3,00
Isoleucina	0,81 - 4,90
Leucina	2,30 – 12,20
Lisina	1,50 - 4,00
Metionina	0,30 - 2,10
Fenilalanina	1,30 - 8,20
Prolina	1,70 - 5,00
Serina	0,64 - 7,40
Treonina	0,83 - 3,40
Triptofano	0,60
Tirosina	0,83 - 4,30
Valina	1,36 - 6,70

Fontes: Asiegbu, 1987; Rezig et al., 2013; Amin et al., 2019.

3.2. Propriedades técnico-funcionais de proteínas de sementes de abóbora

As proteínas vegetais são consideradas as fontes mais baratas e abundantes de proteínas, sendo também a melhor alternativa em substituição às proteínas animais (Du et al., 2012; Muhamyankaka et al., 2013). Nos últimos anos, tem crescido o interesse da comunidade científica por estudos relacionados a utilização de proteínas vegetais como ingredientes na alimentação, bem como a exploração das propriedades técnico-funcionais dessas proteínas. Esse movimento tem sido impactado por diversos fatores, dentre eles: redução de custos, demandas dietéticas religiosas, mudanças relacionadas a estilos de vida (vegetarianos e veganos) e pessoas com restrição de consumo à proteínas de origem animal (Aiking, 2011; Singh et al., 2014; Tovar-Pérez et al., 2019). Somado a isso, segundo as perspectivas da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO (2015), em 2024 a população mundial será superior a 7,8 bilhões de pessoas e estima-se que em 2050 este número chegue a 9,7 bilhões, o que equivale a uma taxa de crescimento populacional de 1,18% ao ano (Grande & Cren, 2016).

As proteínas de sementes de abóbora apresentam uma estrutura semelhante à das globulinas das sementes de leguminosas (Bučko et al., 2015). Essa semelhança indica que o isolado proteico de sementes de abóbora tem propriedades técnico-funcionais comparativas às das proteínas de sementes de leguminosas, como

capacidade emulsificante, espumante e gelificante (Yang et al., 2019). Por outro lado, pesquisas sobre as propriedades técnico-funcionais das proteínas de sementes de abóbora ainda estão em estágio primário, predominando estudos relacionados somente à sua solubilidade, porém ainda escassos (Bucko et al., 2015; Rezig et al., 2013). Diversas alternativas têm sido utilizadas para melhorar a solubilidade e outras propriedades técnico-funcionais destas proteínas, como a emulsificação e a formação de espuma, de modo a aumentar o seu potencial de aplicação na indústria de alimentos. Dentre as alternativas, a hidrólise enzimática visando à geração de hidrolisados a partir das proteínas nativas apresenta-se como uma estratégia promissora (Bučko et al., 2016).

Os hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora podem desempenhar propriedades técnico-funcionais melhoradas em relação às proteínas nativas, aumentando as opções de uso nos diversos segmentos do setor alimentício. Bučko et al. (2016) estudaram a influência da hidrólise enzimática na solubilidade, propriedades interfaciais e emulsificantes do isolado proteico de sementes de abóbora (IPSA). Com a hidrólise enzimática, a solubilidade dos hidrolisados de IPSA aumentou em relação à IPSA nativa no intervalo de pH avaliado. A investigação tensiométrica mostrou que IPSA e seus hidrolisados adsorveram nas interfaces da solução ar-proteína e da solução óleo-proteína em todo o pH (3-8) e força iônica (0 - 1 mol dm⁻³ NaCl) testados. Isso foi evidenciado devido ao aumento na tensão interfacial após um aumento na concentração de proteína em solução. A amostra de IPSA nativa não apresentou capacidade emulsificante nas condições avaliadas, porém os seus hidrolisados apresentaram capacidade emulsificante independentemente do pH e da força iônica.

Aliado ao incremento técnico-funcional proporcionado, os hidrolisados contêm peptídeos que podem desempenhar propriedades potencialmente biológicas como antioxidante, anti-hipertensivo e antidiabética (Vaštag et al., 2011; Venuste et al., 2013; Vaštag et al., 2014; Nourmohammadi et al. 2017). Esses peptídeos são denominados como “peptídeos bioativos” e são geralmente compostos de 2 a 20 resíduos de aminoácidos (Martines-Villaluenga et al., 2017; Karami & Akbari-Adergani, 2019).

3.3. Métodos para obtenção de hidrolisados e peptídeos a partir da proteína nativa

A escolha do método de hidrólise proteica influencia na geração de diferentes hidrolisados e peptídeos com distintas propriedades técnico-funcionais e biológicas (Magalhães et al., 2022). Estas propriedades estão relacionadas diretamente à estrutura primária, tamanho e conformação molecular dos hidrolisados e peptídeos obtidos (Magalhães et al., 2022). Além disso, uma única sequência peptídica pode ser capaz de exercer diferentes propriedades técnico-funcionais e/ou potencialmente biológicas (Karami & Akbari-Adergani, 2019). Existem diversos métodos que podem ser utilizados para obtenção de hidrolisados e peptídeos bioativos de proteínas, como por exemplo: digestão humana, fermentação utilizando-se culturas microbianas, hidrólise química e hidrólise enzimática (Karami & Akbari-Adergani, 2019; Chourasia et al., 2020).

A digestão humana ocorre naturalmente, na qual a liberação de hidrolisados e peptídeos inicia-se na boca, onde proteínas maiores são hidrolisadas em frações menores (Angelis et al., 2017). Posteriormente, ocorre a digestão gástrica: o estômago libera ácido clorídrico e pepsina para a digestão química/enzimática das proteínas, levando à liberação de polipeptídeos que se movem para o intestino delgado, onde o pâncreas secreta as enzimas como tripsina, quimotripsina (Mejia & Lumen, 2006; Angelis et al., 2017). Estas irão hidrolisar os polipeptídeos em peptídeos menores e/ou aminoácidos. Por fim, esses pequenos peptídeos são absorvidos pela corrente sanguínea, possibilitando que exerçam efeitos sistêmicos ou locais nos tecidos-alvo (Mejia & Lumen, 2006; Angelis et al., 2017).

A fermentação é um método eficiente e barato para a produção de hidrolisados e peptídeos por meio da atividade microbiana ou atividade enzimática microbiana (Cabanos et al., 2021). A fermentação envolve a incubação de microrganismos específicos que secretam proteases em condições ambientais definidas quanto a variáveis como temperatura, pH, potencial de oxirredução e substrato (Sanjukta & Rai, 2016; Cabanos et al., 2021). Estas proteases microbianas são capazes de hidrolisar proteínas alimentares e, assim, produzir hidrolisados e peptídeos (Sanjukta et al., 2015). À medida que as enzimas proteolíticas microbianas hidrolisam as proteínas em função da sua especificidade, são produzidos hidrolisados com diferentes tamanhos, sequências e propriedades químicas e físicas (Sanjukta & Rai, 2016). A natureza do substrato proteico, a especificidade das enzimas proteolíticas utilizadas e as

condições de processamento (pH, tempo, temperatura e agitação) são fatores que influenciam consideravelmente a composição de aminoácidos dos hidrolisados (Cabanos et al., 2021).

Outro método para obtenção de hidrolisados e peptídeos é a hidrólise química, que pode ser ácida ou básica (Posorske, 1984). Apesar de ser altamente eficiente na geração de hidrolisados, a hidrólise química tem um alto custo operacional devido às elevadas temperatura e pressão (Posorske, 1984). Além disso, possui baixa especificidade com formação de produtos indesejáveis, necessitando-se de etapas posteriores de purificação (Castro et al., 2004) ou limitando as aplicações em produtos alimentícios. Assim, tem-se usado a hidrólise enzimática em substituição à hidrólise química (Posorske, 1984).

A hidrólise enzimática é um dos métodos mais utilizados para obtenção de hidrolisados e peptídeos (Magalhães et al., 2022). As enzimas são biomoléculas que atuam como catalisadores de reações bioquímicas e desempenham um importante papel em diversos processos industriais (Wang et al., 2018). Elas aumentam a taxa das reações ao reduzir a energia de ativação necessária para converter os substratos em produtos sem alterar o equilíbrio químico (Wang et al., 2018).

As proteases possuem grande importância na obtenção de hidrolisados e peptídeos a partir de proteínas nativas (Wang et al., 2018). Este método consiste na hidrólise da ligação peptídica entre aminoácidos específicos das proteínas, produzindo hidrolisados de vários tamanhos e diferentes estruturas primárias (Agyei et al., 2016; Wang et al., 2018). Consequentemente, a hidrólise proteica leva a um aumento dos grupos amino e carboxílico ionizáveis e permite a exposição de grupos hidrofóbicos, alterando as propriedades técnico-funcionais das proteínas nativas (Agyei et al., 2016).

Diferentes proteases podem ser aplicadas no processo de hidrólise, as quais podem ser classificadas de acordo com sua origem (animal, vegetal ou microbiana), tipo de reação catalítica (endo ou exopeptidases) e natureza química do sítio catalítico (Aguilar & Sato, 2018; Wang et al., 2018). As endopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas no interior da proteína, enquanto as exopeptidases atuam nas extremidades (Muri, 2014; Aguilar & Sato, 2018). A natureza do sítio catalítico define a classificação das proteases em serina, cisteína, aspárticas, glutâmico ou metaloproteínas, dependendo do tipo de aminoácido ou íon metálico presente no seu sítio ativo (Sumantha et al., 2006; Muri, 2014; Aguilar & Sato, 2018).

Dentre as enzimas proteolíticas utilizadas destacam-se a pepsina, tripsina, bromelina e papaína, além das comerciais tais como Alcalase®, Neutrase®, Protamex® e Flavourzyme® (Muri, 2014; Aguilar & Sato, 2018; Wang et al., 2018). O tipo de protease utilizada é fundamental, pois estabelece os padrões de hidrólise das ligações peptídicas, determinando diretamente o grau de hidrólise juntamente às condições do processo (Shahiidi & Zhong, 2008). A especificidade das enzimas no substrato também irá influenciar o grau de hidrólise, estando relacionada com os aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada e àqueles adjacentes a ela (Santos & Koblitz, 2008). Por exemplo, a Alcalase® é uma endopeptidase com ampla especificidade e preferência por resíduos não carregados, como Ser, Thr, Asp e Glu (Markland & Smith, 1971). Já a Flavourzyme® é uma mistura natural complexa de diferentes endo e exopeptidases sem especificidade na hidrólise de ligações peptídicas (Blinkovsky et al., 1999). A hidrólise enzimática também pode ser melhorada usando as condições ótimas de pH e temperatura das proteases, visando um maior rendimento na obtenção de peptídeos bioativos.

3.4. Propriedades multifuncionais dos hidrolisados e peptídeos de proteínas de sementes de abóbora

Os hidrolisados e peptídeos oriundos de proteínas são ingredientes de interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica ao serem utilizados para melhoria da qualidade dos produtos e promoção da saúde humana (Wang et al., 2018; Magalães et al., 2022).

A Figura 2 apresenta as principais propriedades multifuncionais desempenhadas por hidrolisados e peptídeos derivados de proteínas alimentares.

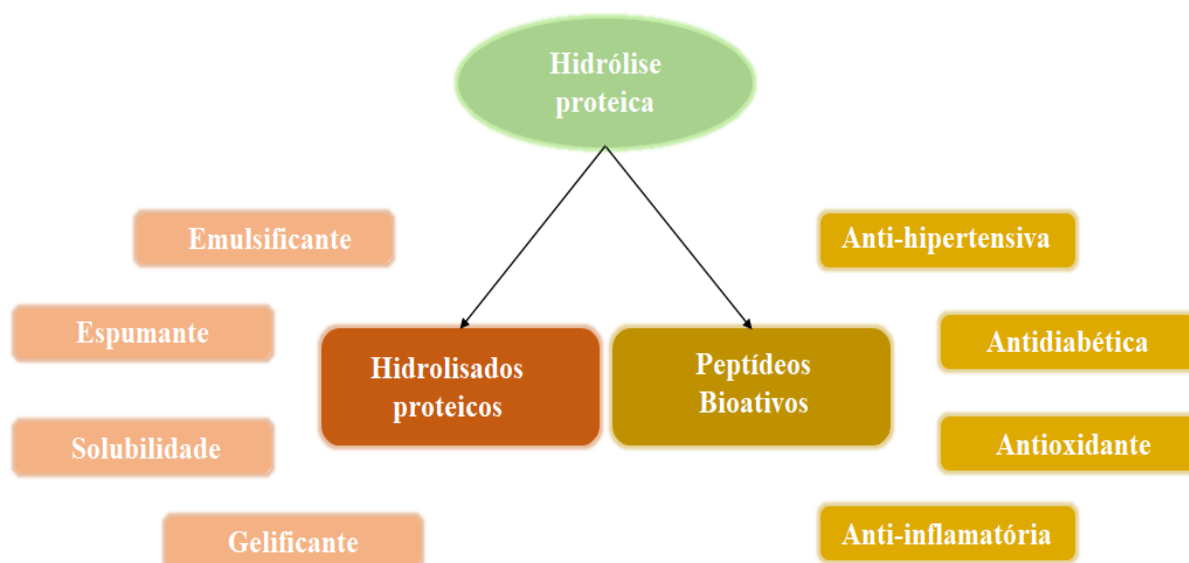


Figura 2 – Propriedades técnico-funcionais e bioativas de hidrolisados e peptídeos, respectivamente. Fonte: Elaborada pelos autores (2022).

As propriedades técnico-funcionais dos hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora, bem como as propriedades potencialmente bioativas dos peptídeos obtidos por hidrólise enzimática, foram até o momento pouco exploradas, sendo os trabalhos apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades técnico-funcionais e biológicas de hidrolisados e peptídeos de proteínas de sementes de abóbora obtidos pela ação de proteases.

Substrato	Enzima	Propriedades	Referência
Proteína isolada	Alcalase®; Pepsina	Solubilidade e Capacidade emulsificante	Bučko et al. (2016)
Cucurbitina	Alcalase®; Flavourzyme®; Pepsina	Solubilidade, Capacidade emulsificante, espumante e ligação ao óleo. Atividade antioxidante (<i>in vitro</i>)	Popovic et al. (2013)
Proteína isolada	Alcalase®; Flavourzyme®; Uso sequencial (Alcalase® + Flavourzyme®)	Atividade inibidora da ECA* e antioxidante (<i>in vitro</i>)	Vaštag et al. (2011)
Proteína isolada	Alcalase®; Tripsina	Atividade antioxidante (<i>in vitro</i>)	Nourmohammadi et al. (2017)
Proteína isolada	Alcalase®; Flavourzyme®; Protamex®; Neutrase®	Atividade antioxidante (<i>in vitro</i>)	Venuste et al. (2013)
Cucurbitina	Alcalase®; Pepsina	Atividade inibitória da ECA*, antioxidante e α – amilase (<i>in vitro</i>)	Vaštag et al. (2014)

* ECA – Enzima conversora de angiotensina.

Bučko et al. (2016) observaram que os hidrolisados do isolado proteico de sementes de abóbora (IPSA) obtidos pela ação da Alcalase® e pepsina apresentaram solubilidade e propriedades emulsificantes maiores em comparação com a proteína nativa em toda a faixa de pH avaliada, especialmente na região de pH próxima ao pl. A solubilidade dos hidrolisados de Alcalase® e pepsina foi menos dependente do pH em comparação com IPSA, ou seja, na faixa de 60% a 76% para hidrolisados de Alcalase® e superior a 90% para hidrolisados de pepsina. Os efeitos da força iônica na solubilidade dos hidrolisados de Alcalase® e pepsina também foram avaliados. Neste caso, os hidrolisados de Alcalase® tiveram menor influência da força iônica quando comparado aos hidrolisados de pepsina. Ressaltou-se também a presença de peptídeos relativamente maiores em todos os hidrolisados (14-20, 24 e 36 kDa), os quais devem ser responsáveis pelas excelentes propriedades emulsificantes obtidos.

Popović et al. (2013) observaram que a solubilidade dos hidrolisados de cucurbitina obtidos pelas enzimas Alcalase®; Flavourzyme®; Pepsina, foi maior em comparação com a proteína nativa dentro da faixa de pH estudada. A melhor atividade de emulsão e índice de estabilidade ($AE = 143,28 \pm 3,05 \text{ m}^2/\text{g}$ e $IE = 87,5 \pm 1,96 \text{ min}$) foi dos hidrolisados obtidos pela enzima Flavourzyme® enquanto que a Alcalase® produziu hidrolisados com a melhor capacidade de formação de espuma ($CFE = 242 \pm 3,21$). Além disso, os hidrolisados obtidos por Alcalase® e pepsina apresentaram poder redutor e atividade de eliminação de cátions do radical $ABTS^+$, enquanto os hidrolisados de Flavourzyme® não demonstraram essas atividades. O poder redutor de Fe^{3+} e a atividade de eliminação de cátions do radical $ABTS^+$ do hidrolisado de cucurbitina foram positivamente relacionados ao grau de hidrólise (DH). A maior atividade antioxidante foi encontrada no hidrolisado obtido por Alcalase® a DH 25,6 % (poder redutor de Fe^{3+} de $0,25 \pm 0,01 \text{ A700 nm}$ e atividade sequestrante de $ABTS$ de $3,34 \pm 0,02 \text{ mmol/L}$ coeficientes antioxidantes equivalentes de Trolox (TEAC)).

Vaštag et al. (2014) observou que o uso de diferentes enzimas na hidrólise de curcubitina não afetou significativamente a atividade de eliminação de cátions do radical $ABTS^+$ ($3,3 \text{ mmol/L}$ Trolox para os hidrolisados de Alcalase® e $3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ para os hidrolisados de pepsina). No entanto, comprovou-se que o poder redutor de Fe^{3+} dos hidrolisados de Alcalase® foi quase duas vezes maior do que os hidrolisados de pepsina ($A_{\lambda=700 \text{ nm}}$ de cerca de 0,25 e cerca de 0,14, respectivamente). Ambos os hidrolisados de Alcalase® e pepsina provaram também ter atividade inibitória da ECA e atividade inibitória de α -amilase, com valores aparentes de IC_{50} de 0,0244 mg

e 0,0445 mg atividade inibitória da ECA, respectivamente e uma redução de até 30% na atividade inibitória de α -amilase. Os hidrolisados obtidos por meio da ação da pepsina demonstraram inibição da α -amilase ligeiramente maior do que os hidrolisados da Alcalase®, em todas as concentrações de proteína estudadas (0,5 - 2,0 mg/mL).

Venuste et al. (2013) observou que o uso de diferentes enzimas (Alcalase®; Flavourzyme®; Protamex®; Neutrase®) usadas na hidrólise de proteínas de sementes de abóbora levou a obtenção de hidrolisados com atividade de eliminação de radicais DPPH, poder redutor de Fe^{3+} e capacidade quelantes de Fe^{2+} . A 10 mg/mL, os hidrolisados aumentaram as atividades de eliminação de radicais DPPH (de 21,89% para 85,27% para Flavourzyme®) e o poder redutor de Fe^{3+} (de Abs 700nm 0,21 para 0,48 para Flavourzyme®). A 1 mg/mL, a capacidade quelantes de Fe^{2+} (de 30,50% para 80,03% para Flavourzyme®) também foi melhorada. Os hidrolisados também mostraram melhores capacidades para suprimir ou retardar a peroxidação lipídica em um sistema modelo de ácido linoleico.

Vaštag et al. (2011) observaram que os hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora obtidos pelas enzimas Alcalase® e Flavourzyme® isoladas e em combinação, apresentaram atividade de eliminação de cátions do radical ABTS⁺ e o poder redutor de Fe^{3+} . Os hidrolisados de Alcalase® apresentaram atividade de eliminação de cátions de radical ABTS⁺ significativamente maior ($7,59 \pm 0,08$ mM Trolox mg^{-1}) do que os hidrolisados de Flavourzyme® ($3,27 \pm 0,19$ mM Trolox mg^{-1}). Além disso, comprovou-se o poder redutor de Fe^{3+} dos hidrolisados de Alcalase®, com valores máximos de $A_{\lambda=700 \text{ nm}}$ oscilando entre $0,33 \pm 0,03$ e $0,38 \pm 0,04$. Além disso, os hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora apresentaram potencial bioativo para a atividade inibidora da ECA. Os hidrolisados obtidos pela ação da enzima Alcalase® apresentaram maior atividade inibidora da ECA $71,1 \pm 7,5\%$ ($\text{IC}_{50} = 0,422$ mg/mL) em comparação com os hidrolisados obtidos pela ação da Flavourzyme®, que apresentaram atividade inibidora da ECA de $55,8 \pm 6,2\%$.

Nourmohammadi et al. (2017) observou que os hidrolisados de Alcalase® (tamanho de peptídeo < 6,5 kDa) atingiram um máximo valor de 90% de atividade de eliminação de radicais DPPH enquanto os hidrolisados de tripsina atingiram um valor máximo de 78%. Além disso, os hidrolisados de Alcalase® exibiram propriedades antioxidantes totais e atividade quelante de metais (Fe^{2+}) significativamente melhores do que os hidrolisados de tripsina.

A Tabela 4 apresenta um resumo dos resultados dos trabalhos relacionados às propriedades técnico-funcionais dos hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora, bem como às propriedades bioativas dos peptídeos obtidos por hidrólise enzimática.

Tabela 4. Propriedades técnico-funcionais e biológicas de hidrolisados e peptídeos de proteínas de sementes de abóbora obtidos pela ação de proteases.

Referência	Condições enzimáticas e de hidrólise	Principais resultados
Nourmohammadi et al. (2017)	Alcalase® (5%) e tripsina (5%) na razão E/S de 1%, 1,5% e 2%. A hidrólise foi realizada por 2; 3,5; e 5 h sob temperaturas de hidrólise de 45, 50 e 55°C para Alcalase® e 35, 40 e 45°C para tripsina.	Os hidrolisados de Alcalase® exibiram atividade de eliminação de radicais DPPH, propriedades antioxidantes totais e atividade quelante de metais (Fe^{2+}) significativamente melhores do que os hidrolisados de tripsina.
Bučko et al. (2016)	Alcalase® e pepsina na razão E/S de 0,5 ml/g e 0,02 g/g, respectivamente. A hidrólise pela Alcalase® foi realizada à 50 °C por 30 min enquanto que da pepsina foi a realizada a 37 °C por 90 min.	A solubilidade de ambos os hidrolisados (obtidos pela ação da Alcalase® e pepsina) foi maior do que a solubilidade da amostra não hidrolisada, especialmente em pH próximo ao pl. O desempenho emulsificante das proteínas foi dependente do pH e da força iônica, enquanto ambos os hidrolisados, estabilizaram emulsões com sucesso independente do pH e força iônica.
Vaštag et al. (2014)	Alcalase® e pepsina na razão E/S de 0,02 g/g. A hidrólise pela Alcalase® foi realizada à 50 °C, pH 8,00 e concentração de NaCl de 40 mg/ml, e para pepsina a pH 3,00 e temperatura de 37°C. Ambos por 60 min.	Ambos os hidrolisados de Alcalase® e pepsina apresentaram maiores valores para atividade de eliminação de cátions do radical ABTS ⁺ , poder redutor de Fe^{3+} , atividade inibitória da ECA e atividade inibitória de α -amilase.

Venuste et al. (2013)	Razão E/S de 1% para todas as enzimas. A hidrólise pela Alcalase® foi realizada à 55 °C e à 50 °C para Flavourzyme®, Protamex® e Neutrase®.	Os hidrolisados obtidos por Alcalase®, Flavourzyme®, Protamex® e Neutrase® apresentaram atividade de eliminação de radicais DPPH, poder redutor de Fe ³⁺ e capacidade quelantes de Fe ²⁺ , além de melhores capacidades para suprimir ou retardar a peroxidação lipídica em um sistema modelo de ácido linoleico.
Vaštag et al. (2011)	Alcalase® e Flavourzyme® nas razões E/S de 1/757 g/g, 1/385 g/g e 1/250 g/g. Para ambas as enzimas a hidrólise foi realizada à 50 °C por 60 min. Para a hidrólise com enzimas combinadas, Alcalase® (E/S 1/250 g/g) foi usada nos primeiros 60 min e então, Flavourzyme® foi adicionado (E/S 1/385 g/g) e a hidrólise prolongada até 120 min.	Os hidrolisados de Alcalase® e Flavourzyme® isoladas e em combinação, apresentaram atividade de eliminação de cátions do radical ABTS ⁺ , poder redutor de Fe ³⁺ e atividade inibidora da ECA.

3.5. Perspectivas futuras e desafios

Conforme dito anteriormente, as proteínas de sementes de abóbora apresentam baixa solubilidade em intervalo de pH de 4,0-6,0, o que é uma característica comum para proteínas vegetais. Além disso, foi mostrado que a hidrólise dessas proteínas pode potencializar as propriedades técnico-funcionais em relação à proteína nativa. Por outro lado, existem outras alternativas que têm sido exploradas e se apresentam promissoras para melhorar a solubilidade e outras propriedades técnico-funcionais de proteínas vegetais. Dentre essas alternativas, encontram-se as tecnologias não convencionais, como por exemplo ultrassom (Flores-Jiménez et al., 2019; Omura et al., 2021; Lo et al., 2022; Sha et al., 2022), micro-ondas (Ertugrul et al., 2021; Huang et al., 2022), alta pressão hidrostática (Liu et al., 2020; Liu et al., 2022) e homogeneização de alta pressão (Guo et al., 2021; Zhang et al., 2022; Melchior et al., 2022).

Du et al. (2022) estudaram o efeito do tratamento ultrassônico de alta intensidade nas propriedades físico-químicas, estruturais, reológicas e funcionais de isolados proteicos de sementes de abóbora. Os resultados mostraram que o ultrassom (US) transformou os agregados de isolados proteicos de sementes de abóbora (IPSA) em agregados menores e com distribuição mais uniforme, o que teve um efeito significativo na cromaticidade e turbidez dos IPSAs. O aumento da potência do US também aumentou a hidrofobicidade da superfície do IPSA, o que foi benéfico para melhorar a capacidade espumante do IPSA.

Em condições otimizadas a aplicação dessas tecnologias, além de melhorar as propriedades técnico-funcionais das proteínas, podem ser usadas em combinação com processos enzimáticos visando maximizar a catálise enzimática e, assim, obter hidrolisados e peptídeos com melhores propriedades (Leite Júnior et al., 2015; Guan et al., 2018; Leite Júnior et al., 2019; Soares et al., 2019; Soares et al., 2020; Carullo et al., 2020; Carullo et al., 2021; Dong et al., 2021; Tian et al., 2022; Magalhães et al., 2022). Na literatura científica, não foram encontrados estudos sobre a aplicação de tecnologias físicas que objetive potencializar a hidrólise enzimática das proteínas de sementes de abóbora. Por outro lado, pesquisas com outras proteínas vegetais têm apresentado resultados promissores (Fathi et al., 2021; Zhou et al., 2017).

Em relação ao potencial bioativo dos hidrolisados das proteínas das sementes de abóbora, os estudos foram focados na avaliação *in vitro* e, portanto, não são conclusivos sobre os resultados *in vivo*. Assim, são necessários realizar outros

trabalhos com foco em ensaios clínicos para comprovar as propriedades biológicas destes peptídeos. Além disso, são necessários estudos que investiguem os riscos quanto à alergenicidade e toxicidade dos hidrolisados e peptídeos obtidos.

4. Considerações Finais

O aumento do interesse da comunidade científica acerca das proteínas vegetais tem contribuído para a exploração de novas fontes proteicas, como as sementes de abóbora. Estas, que na maioria das vezes são descartadas ou usadas na alimentação animal, apresentam expressivo teor proteico, o que estimula sua aplicação na indústria de alimentos.

Pesquisas a respeito das propriedades técnico-funcionais das proteínas de sementes de abóbora ainda são insipientes, predominando estudos relacionados somente à sua solubilidade. Dentre as alternativas utilizadas para melhorar a solubilidade e outras propriedades técnico-funcionais destas proteínas como emulsificação e formação de espuma, por exemplo, a hidrólise enzimática é utilizada estrategicamente para geração de hidrolisados proteicos com propriedades técnico-funcionais realçadas em comparação com a proteína nativa. Esse avanço amplia a utilização destas proteínas como ingredientes no desenvolvimento de produtos em diversos segmentos do setor alimentício.

Além disso, alguns estudos demonstraram que a hidrólise enzimática das proteínas da semente de abóbora contribui com a produção de peptídeos bioativos com diferentes atividades biológicas. Porém, esses estudos foram conduzidos apenas por meio de testes *in vitro*. Desta forma, pesquisas com ênfase em ensaios clínicos devem ser realizadas a fim de comprovar as bioatividades desses peptídeos.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Viçosa (Departamento de Tecnologia de Alimentos), Instituto de Laticínios Cândido Tostes – EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) e Universidade Estadual de Campinas (Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade a B.R.C. Leite Júnior (nº306514/2020-6) e a A.A.L. Tribst (nº305050/2020-6), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Código de Financiamento

001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-00388-2).

Referências

Aguilar, J. G. dos S., Sato, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.

Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. **Food and bioproducts processing**, v. 98, p. 244-256, 2016.

Aiking, H. Future protein supply. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 112-120, 2011.

Alfawaz, M. Chemical Composition and oil characteristics of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed kernels. **Food Science Agricultural and Research**, v. 129, p. 5-18, 2004.

Amin, M. Z., Islam, T., Uddin, M.R., Uddin, M. J., Rahman, M. M., Satter, M. A. Comparative study on nutrient contents in the different parts of indigenous and hybrid varieties of pumpkin (*Cucurbita maxima* Linn.). **Heliyon**, v. 5, n.9, e02462, 2019.

Amo, I., Eleyinmi, A., Ilesaboye, N., Akoja, S. Characterization of oil extracted from gourd (*Cucurbita maxima*) seed. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 2, p. 38-39, 2004.

Angelis, E. de, Pilolli, R., Bavaro, S. L., Monaci, L. Insight into the gastro-duodenal digestion resistance of soybean proteins and potential implications for residual immunogenicity. **Food Function**, v. 8, n. 4, p. 1599-1610, 2017.

Asiegbu., J. E. Some biochemical evaluation of fluted pumpkin seed. **Food Science & Technology**, v. 40, n. 2, p. 151-155, 1987.

Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., Macfarlane, D. Patti, A. F., Arora, A. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. **Food Chemistry**, v. 225, p. 10-22, 2017.

Blagrove, R., Lilley, G. Characterisation of cucurbitin from various species of the *Cucurbitaceae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 103, p. 577-584, 1980.

Blinkovsky, A. M., Byun, T., Brown, K. M., Golightly, E. J. Purification, Characterization, and Heterologous Expression in *Fusarium venenatum* of a Novel Serine Carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3298–3303, 1999.

Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Petrović, L., Milinković, L. 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.

Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Vaštag, Z., Petrović, L., Vučinić–Vasić, M. Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 609-615, 2015.

Cabanos, C., Matsuoka, Y., Maruyama, N. Soybean proteins/peptides: A review on their importance, biosynthesis, vacuolar sorting, and accumulation in seeds. **Peptides**, v. 143, 170598, 2021.

Carullo, D., Donsì, F., Ferrari, G. Influence of high-pressure homogenization on structural properties and enzymatic hydrolysis of milk proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 130, Article e109657, 2020.

Carullo, D., Barbosa-Cánovas, G. V., Ferrari, G. Changes of structural and techno-functional properties of high hydrostatic pressure (HHP) treated whey protein isolate over refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 137, 2021.

Castro, H. F. de, Mendes, A. A., Santos, J. C. dos, Aguiar, C. L. de. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação, Modification of oils and fats by biotransformation. **Quimica Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

Chourasia, R., Phukon, L. C., Singh, S. P., Rai, A. K., Sahoo D. **Chapter 15 - Role of enzymatic bioprocesses for the production of functional food and nutraceuticals**, Editor(s): S. P. Singh, Pandey, A., Singhania, R. R., Larroche, C., & Li, Z. Biomass, Biofuels, Biochemicals, Elsevier, 309-334, 2020.

Colman, P., Suzuki, E., Van D. A. The structure of cucurbitin: subunit symmetry and organization in situ. **European Journal of Biochemistry**, v. 103, p. 585-588, 1980.

Devi, N.M., Prasad, R. V., Sagarika, N. A review on health benefits and nutritional composition of pumpkin seeds. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, n. 3, p. 1154-1157, 2018.

Dong, X., Wang, J., Raghavan. V. Impact of microwave processing on the secondary structure, in-vitro protein digestibility and allergenicity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) proteins. **Food Chemistry**, v. 337, 127811, 2021.

Santos, L. dos, Koblitz, M. Proteases. In: Koblitz, M. **Bioquímica de alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242, 2008.

Du, H., Zhang, J., Wang, S., Manyande, A., Wang, J. Effect of high-intensity ultrasonic treatment on the physicochemical, structural, rheological, behavioral, and foaming properties of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.)-seed protein isolates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 155, 112952, 2022.

Du, Y., Jiang, Y., Zhu, X., Xiong, H., Shi, S., Hu, J., Peng, H., Zhou, Q., Sun, W. Physicochemical and functional properties of the protein isolate and major fractions prepared from Akebia trifoliata var. australis seed, **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 923-929, 2012.

Ertugrul, U., Namli, S., Tas, O., Kocadagli, T., Gokmen, V., Sumnu, S. G., Oztop, M. G. Pea protein properties are altered following glycation by microwave heating. **LWT-Food Science and Technology**, v. 150, 111939, 2021.

Fathi, P., Moosavi-Nasab, M., Mirzapour-Kouhdasht, A., Khalesi, M. Generation of hydrolysates from rice bran proteins using a combined ultrasonication-Alcalase hydrolysis treatment. **Food Bioscience**, v. 42, 101110, 2021.

Fava, F., Totaro, G., Diels, L., Reis, M., Duarte, J., Carioca, O. B., Poggi-Varaldo, H. M., Ferreira, B. S. Biowaste biorefinery in Europe: opportunities and research & development needs. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 100-108, 2015.

Flores-Jiménez, N. T., Ulloa, J. A., Silvas J. E. U., Ramírez, J. C. R., Ulloa, P. R., Rosales, P. U. B., Carrillo, Y. S., Leyva, R, G. Effect of high-intensity ultrasound on the compositional, physicochemical, biochemical, functional and structural properties of canola (*Brassica napus* L.) protein isolate. **Food Research International**, v. 121, p. 947-956, 2019.

Fruhwrith, G., Hermetter, A. Seeds and oil of the styrian oil pumpkin: components and

biological activities. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 1128-1140, 2007.

Grande, S. C.; Cren, É. C. Demanda de proteínas vegetais: potencialidades e o diferencial dos farelos de Macaúba (REVISÃO). **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 2, n. 3, p. 190–214, 26, 2016.

Guan, H., Diao, X., Jiang, F., Han, J., Kong, B. The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 245, p. 89-96, 2018.

Guo, Z., Huang, Z., Guo, Y., Li, B., Yu, W., Zhou, L., Jiang, L., Teng, F., Wang, Z. (2021). Effects of high-pressure homogenization on structural and emulsifying properties of thermally soluble aggregated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins. **Food Hydrocolloids**, 119, 106835.

Huang, K., Shi, J., Li, M., Sun, R., Guan, W., Cao, H., Guan, X., Zhang, Y. Intervention of microwave irradiation on structure and quality characteristics of quinoa protein aggregates. **Food Hydrocolloids**, v. 130, 107677, 2022.

Ibrahim, H. R., Ahmed, A. S., Miyata, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 1, p. 63–71, 2017.

Karami, Z.; Akbari-adergani, B. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 535–547, 2019.

Korhonen, H., Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1297–1308, 2003.

Lazos, E. Nutritional, fatty acid, and oil characteristics of pumpkin and melon seeds. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 5, p. 1382-1383, 1986.

Leite Júnior, B. R. C., Tribst, A. A. L., Ribeiro, L. R. Cristianini, M. High pressure processing impacts on the hydrolytic profile of milk coagulants. **Food Bioscience**, v. 31, 100449, 2019.

Leite Júnior, B. R. C., Tribst, A. A. L.; Cristianini, M. Influence of high pressure homogenization on commercial protease from *Rhizomucor miehei*: Effects on

proteolytic and milk-clotting activities. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 739-744, 2015.

Li-Chan, E. C. Y. Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 28–37, 2015.

Liu, D., Zhang, L., Wang, Y., Li, Z., Wang, Z., Han, J. Effect of high hydrostatic pressure on solubility and conformation changes of soybean protein isolate glycosylated with flaxseed gum. **Food Chemistry**, v. 333, 127530, 2022.

Liu, N., Lin, P., Zhang, K., Yao, X., Li, D., Yang, L., Zhao, M. Combined effects of limited enzymatic hydrolysis and high hydrostatic pressure on the structural and emulsifying properties of rice proteins. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 77, 102975, 2022.

Lo, B., Kasapis, S., Farahnaky, A. Effect of low frequency ultrasound on the functional characteristics of isolated lupin protein. **Food Hydrocolloids**, v. 124, Part B, 107345, 2022.

Magalhães, I. S., Guimarães, A. D. B., Tribst, A. A. L., Oliveira, E. B., Leite Junior, B. R. C. 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, 111310, 2022.

Marcone, M. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. **Food Research International**, v. 32, p. 79-92, 1999.

Marcone, M., Kakuda, Y., Yada, R. (1998). Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants—I. Isolation/purification and characterization. **Food Chemistry**, 62, 27-47.

Markland, F. S., Smith, E. L. **Subtilisins: Primary Structure, Chemical and Physical Properties**, Editor(s): Paul D. Boyer. The Enzymes, Academic Press, v. 3, p. 561-608, 1971.

Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E.; Frias, J. **Bioactive Peptides in Fermented Foods**. In: Fermented Foods in Health and Disease Prevention. [s.l.] Elsevier, p. 23–47, 2017.

McCarthy, A., O'Callaghan, Y., O'Brien, N. (2013). Protein Hydrolysates from Agricultural Crops—Bioactivity and Potential for Functional. **Food Development. Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 112–130.

Mejia, E. de, Lumen, B. de. Soybean bioactive peptides: a new horizon in preventing chronic diseases, sexuality. **Reproduction Menopause**, v. 4, n. 2, p. 91-95, 2006.

Melchior, S., Moretton, M., Calligaris, S., Manzocco, L., Nicoli, M. C. High pressure homogenization shapes the techno-functionalities and digestibility of pea proteins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 131, p. 77-85, 2022.

Mitić, M., Pavlović, A., Tošić, S., Mašković P., Kostić, D., Mitić, S., Kocić, G., Maškovć, J. Optimization of simultaneous determination of metals in commercial pumpkin seed oils using inductively coupled atomic emission spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 197-203, 2018.

Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., Parajó J. C. Functionality of oilseed protein products: a review. **Food Research International**, v. 39, n. 9, p. 945–963, 2006.

Muhamyankaka, V., Shoemaker, C.F., Nalwoga, M., Zhang, X.M. Physicochemical properties of hydrolysates from enzymatic hydrolysis of pumpkin (*Cucurbita moschata*) protein meal. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 5, p. 2227-2240, 2013.

Muri, E. M. F. Proteases virais: Importantes alvos terapêuticos de compostos peptideomiméticos. **Quimica Nova**, v. 37, n. 2, p. 308-316, 2014.

Norfezah, M.N., Hardacre, A., Brennan, C.S. Comparison of waste pumpkin material and its potential use in extruded snack foods. **Food Science and Technology International**, v. 17, n. 4, p. 367-373, 2011.

Nourmohammadi, E., Mahoonak, A.S., Alami, M., Ghorbani. M. Amino acid composition and antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil cake protein. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 12, p. 3244-3255, 2017.

Omura, M. H., Oliveira, A. P. H., Soares, L. S., Coimbra, J. S. R., Barros, F. A. R., Vidigal, M. C. T. R., Baracat-Pereira, M. C., Oliveira, E. B. Effects of protein concentration during ultrasonic processing on physicochemical properties and techno-functionality of plant food proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 113, 106457, 2021.

Popović, L. M., Peričin, D. M., Vaštag, Ž. G., Popović, S. Optimization of

Transglutaminase Cross-linking of Pumpkin Oil Cake Globulin; Improvement of the Solubility and Gelation Properties. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 1105-1111, 2013.

Posorske, L. H. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 11, p. 1758-1760, 1984.

Rahman, M. M., Juahir, H., Islam, M. H., Khandaker, M. M., Ariff, T. M., Norsani W. M. Prophetic vegetable Pumpkin, Its impressive health benefits and total analysis. **Bioscience Research**, v. 16, n. 4, p. 3987-3999, 2019.

Rezig, L., Moncef, C., Kamel, M., Salem, H. Chemical composition and profile characterization of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 82-87, 2012.

Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgarrondo, M.I., Hessini, K., Guéguen, J., Hamdi, S. Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed proteins: sequential extraction processing and fraction characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 32, p. 7715-7721, 2013.

Sanjukta, S., Rai, K. A. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 1-10, 2016.

Sanjukta, S., Rai, A. K., Muhammed, A., Jeyaram, K., Talukdar, N. C. Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 650-658, 2015.

Sarmadi, B. H.; Ismail, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.

Sha, L., Xiong, Y. L. Comparative structural and emulsifying properties of ultrasound-treated pea (*Pisum sativum* L.) protein isolate and the legumin and vicilin fractions. **Food Research International**, v. 156, 111179, 2022.

Shahidi, F.; Zhong, Y. Bioactive Peptides. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 21, p. 14–31, 2008.

Singh, B.P., Vij, S., Hati, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171-179, 2014.

Soares, A. S., Augusto, P. E. D., Leite Júnior, B. R. C., Nogueira, C. A., Vieira, É. N. R., Barros, F. A. R., Stringheta, P.C., Ramos, A. M. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters. **LWT - Food Science and Technology**, v. 107, p. 164-170, 2019.

Soares, A. S., Leite Júnior, B. R. C., Tribst, A. A. L., Augusto, P. E. D., Ramos, A. M. Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. **LWT - Food Science and Technology**, v. 130, 109636, 2020.

Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. **Food Technology and Biotechnolog**, v. 44, n. 2, p. 211-220, 2006.

Tian, S., Du, K., Yan, F., Li., Y. Microwave-assisted enzymatic hydrolysis of wheat germ albumin to prepare polypeptides and influence on physical and chemical properties. **Food Chemistry**, v. 374, 131707, 2022.

Tovar-Pérez, E.G., Lugo-Radillo, A., Aguilera-Aguirre, S. Amaranth grain as a potential source of biologically active peptides: A review of their identification, production, bioactivity, and characterization. **Food Reviews International**, v. 35, p. 221-245, 2019.

Vale, C. P. do, Loquete, F. C. C., Zago, M. G., Chiella, P. V., Bernardi, D. M. Composição e propriedades da semente de Abóbora. **Fag Journal of Health (Fjh)**, v. 1, n. 4, p. 79–90, 2019.

Vaštag, Z.; Popović L.; Popović S. Bioactivity evaluation of cucurbitin derived enzymatic hydrolysates. **International journal of agricultural and biosystems engineering**, v. 8, p. 445 – 448, 2014.

Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin–I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1316-1321, 2011.

Venuste, M., Zhang, X., Shoemaker, C.F., Karangwa, E., Abbas, S., Kamdem, P.E. Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. **Food and Function**, v. 4, n. 5, p. 811–820,

2013.

Wang, D., Yan, L., Ma, X., Wang, W., Zou, M., Zhong, J., Ding, T., Ye, X., Liu, D. Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 453-461, 2018.

Yang, C., Wang, B., Wang, J., Xia, S., Wu, Y. Effect of pyrogalllic acid (1,2,3-benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction degree on structure and antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed protein isolate. **LWT-Food Science and Technology**, v. 109, 443–9, 2019.

Zhang, A., Wang, L., Song, T., Yu, H., Wang, X., Zhao, X. Effects of high pressure homogenization on the structural and emulsifying properties of a vegetable protein: *Cyperus esculentus* L. **LWT-Food Science and Technology**, v. 153, 112542, 2022.

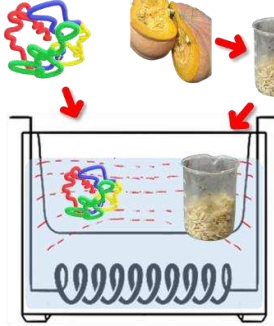
Zhou, C., Hu, J., Yu, X., Yagoub, A. E. A., Zhang, Y., Ma, H., Gao, X., Out, P. N. Y. Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure. **LWT-Food Science and Technology**, v. 77, p. 488-496, 2017.

Capítulo 2: Impact of ultrasound on pumpkin seed protein concentrate hydrolysis: Effects on Alcalase®, protein, and assisted reaction

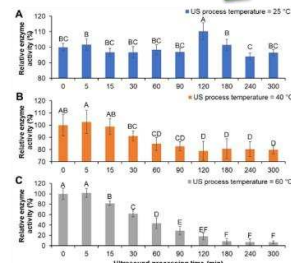
Trabalho submetido na revista Journal of Food Science and Technology. Pacheco, A. F. C.; Souza, L. B.; Paiva, P. H. C.; Lelis, C. A.; Vieira, E. N. R.; Tribst, A. A. L.; Leite Junior, B. R. C. Impact of ultrasound on pumpkin seed protein concentrate hydrolysis: Effects on Alcalase®, protein, and assisted reaction.

Graphical Abstract

Alcalase®
Pumpkin seed protein
concentrate (PSPC)

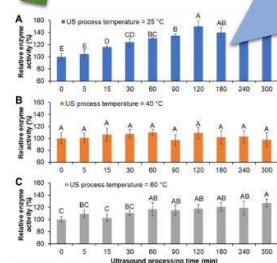


US pretreatment of Alcalase®
and PSPC separately



US pretreatment of Alcalase:

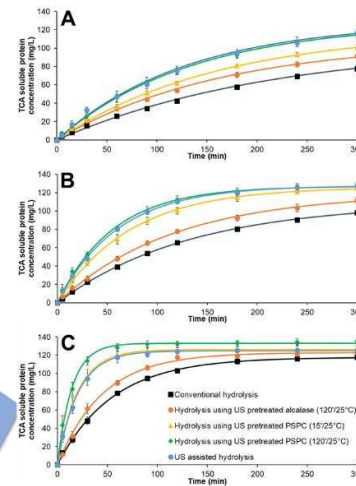
↑ activity by up to 10.3%



US pretreatment of PSPC:

↑ activity by up to 50.1%

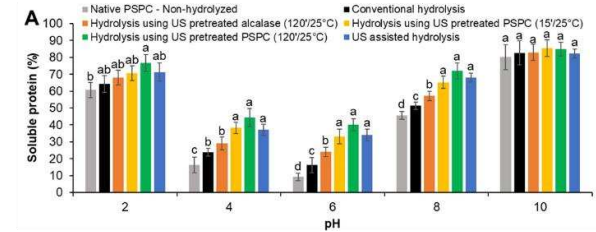
PSPC hydrolysis kinetics
using US pretreated Alcalase or PSPC and US-assisted



↑ PSPC hydrolysis rate (up to 280%)

↑ TCA soluble protein concentration (up to 24%)

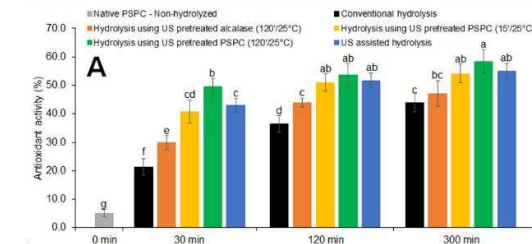
Protein solubility



↑ solubility (up to 148% increase)

• Faster soluble hydrolysates production

In vitro antioxidant activity



↑ DPPH and ABTS radical scavenging activities
(up to 132.9%)

Abstract

Ultrasound (US) (40 kHz, 23.8 W/L) was applied (pH 7.5, 25 – 60 °C, up to 300 min) on Alcalase® and pumpkin seed protein concentrate (PSPC) to improve the proteolysis rate, the final concentration of hydrolysates, and its solubility and *in vitro* antioxidant activity. Increase in the relative activity of the enzyme ($p < 0.05$) was obtained after US applied in Alcalase® (10.3%) and mainly in PSPC (50.1%). PSPC hydrolysis under potentiated and US-assisted conditions provided up to 280% increase of the proteolysis rate and up to 24% higher concentration of trichloroacetic acid (TCA) soluble peptides at the end of hydrolysis ($p < 0.05$). Consequently, the hydrolysates obtained with US intervention had greater solubility ($\leq 148.1\%$, $p < 0.05$) and higher radical scavenging capacity, as evidenced by ABTS and DPPH assays. From the overall evaluation of the results, and considering the time/temperature of processing, we observed that the US pretreated PSPC or US-assisted hydrolysis are good strategies to enhance the generation of hydrolysates with better multifunctional properties.

Keywords: antioxidant activity; enzyme activation; kinetic parameters; solubility; sonication; pumpkin seed.

1. Introduction

Pumpkin (*Cucurbita pepo*) is one of the main species of *Cucurbita* genus, a widely cultivated and used raw material to produce purees, juices, jams, and alcoholic beverages, due to its economic and nutritional value (source of lipids, proteins, carbohydrates, and other nutrients) (Li et al., 2016). World pumpkin production has been reported to exceed 22.9 million tons in 2020 (Li et al., 2021) and the waste generated from its processing represents tons of seeds and husks, which have high fat, protein, and fiber contents and could be used as an ingredient in the food industry to improve nutritional and/or functionality, such as water/oil holding capacity and emulsifying properties of the products. Therefore, it would be very interesting to develop products from these by-products.

Pumpkin seeds have aroused consumer interest due to high lipid and protein content, ranging from 31.5% to 51% and 24.5 to 36% on a dry basis, respectively (Bučko et al., 2015). Pumpkin seed proteins (PSP) have high nutritional quality, are a source of essential amino acids, such as leucine, phenylalanine, histidine, and isoleucine, affordable costs, and good potential for application as a food ingredient, due to its technical-functional properties (Bučko et al., 2015; Amin et al., 2019). However, restrictions related to low protein solubility in aqueous solution (at pH 4.0-6.0) directly influence its technical-functional properties and its industrial use (Bučko et al., 2015).

To overcome this limitation, protein hydrolysis is an interesting strategy to potentialize the obtaining of compounds of interest, with better technical-functional properties compared to native proteins (Bučko et al., 2016). In addition, these hydrolysates can exert biological properties, such as antidiabetic, antioxidant, antihypertensive, anti-inflammatory, and antimicrobial activities (Vaštag et al., 2010; Vaštag et al., 2011; Popović et al., 2013; Venuste et al., 2013; Nourmohammadi et al., 2017).

Hydrolysates can be produced by different methods such as chemical and enzymatic hydrolysis. The chemical hydrolysis has the disadvantages of high energy consumption, high corrosive power of the equipment, and low specificity, which results in the formation of undesirable products that reduces the conversion efficiency and obligates the inclusion of a purification step (Soares et al., 2020). Therefore, enzymatic hydrolysis has been replacing chemical hydrolysis due to advantages such as high specificity and mild processing conditions, resulting in a better-quality product (Soares

et al., 2020; Cui et al., 2022). The enzymatic hydrolysis promoted by Alcalase®, a commercial enzyme of microbial origin, stands out due to its high efficiency in the production of functional peptides from proteins (Magalhães et al., 2022).

However, the use of enzymes in industry has important barriers: high cost, long reaction time, and low conversion rate (Franck et al., 2019). Therefore, emerging technologies have been recently studied as an efficient tool to minimize these drawbacks through increasing enzyme stability/activity and/or enhancing the substrate exposure to the enzyme reaction (Soares et al., 2020; Magalhães et al., 2022).

The ultrasound treatment (US), based on the use of acoustic energy with frequencies above 20 kHz, has aroused increasing commercial interest due to its low cost (acquisition, maintenance, and operation), high sustainability (Wang et al., 2018), and versatility of applications, including its use to improve the efficiency of enzymatic hydrolysis (Magalhães et al., 2022). US is able to optimize the hydrolysis process in three ways: (i) altering the substrate configuration, facilitating the enzyme access; (ii) improving enzyme activity/stability, and (iii) improving the reaction rate in the assisted reaction due to greater contact between enzyme and substrate. For instance, Magalhães et al. 2022 revealed that the combination of US and enzymatic catalysis by different enzymes potentiated the hydrolysis rate of casein from goat's milk (up to 120%), as well as improved the solubility of the hydrolyzed product.

Despite the studies that showed that satisfactory results of US for improving biocatalysis, the effects of the application of this technology on PSP hydrolysis have not yet been elucidated. Therefore, this work aimed to evaluate the proteolysis of PSPC under optimal and non-optimal temperature conditions using protease and substrate previously processed by US separately. Furthermore, the US-assisted reaction, solubility and *in vitro* antioxidant activity of the hydrolysates obtained were determined.

2. Material and Methods

2.1 Enzyme and pumpkin seed protein concentrate (PSPC)

The protease used in the study was Alcalase®, a protease produced by *Bacillus licheniformis* (Novozymes Latino Americana Ltda, Araucária, Brazil). Seeds from *Cucurbita pepo* pumpkin (29.8% of moisture, 21.9% of protein, and 48.3% of nonprotein dry extract) were obtained as a byproduct of Doces Mirahy (Miraí, Brazil).

Pumpkin seed protein extraction was performed by alkaline extraction with isoelectric precipitation, as described by Bučko et al., (2015), with modifications. Firstly, the grounded pumpkin seed oil cake was defatted with petroleum ether (mass ratio of 1:3 - w/v). The defatted pumpkin seed was mixed with sterile distilled water (ratio 1:10 – w/v) and a NaOH solution (1 mol/L) was added until reaching pH 10. After 30 min of gentle stirring at 4 °C, the slurry was filtered (Whatman #1 qualitative filter paper). Then, HCl solution (1 mol/L) was added to the filtrate to reach pH 5.0, causing protein precipitation.

The precipitate was separated from the liquid phase by filtration at 4 °C and dried at 45 °C for 8 hours. The dried protein was ground in an analytical grinder (IKA, Germany) to obtain the pumpkin seed protein concentrate (PSPC) powder and stored at -20 °C. The PSPC had 19.8% of moisture and 66.5% of protein and 13.6% of nonprotein dry extract (mainly minerals and residues of lipids and carbohydrates).

2.2 Determination of Alcalase® activity in PSPC at different pH and temperatures

The optimal pH (pH from 5.5 to 8.5, adjusted with 0.1 mol/L sodium phosphate buffer) and temperature (25 to 65 °C) for Alcalase® activity was determined. These parameter ranges were chosen based on the enzyme manufacturer's recommendation, literature search, and preliminary tests.

The Alcalase® activity was determined by the formation of TCA soluble peptides (measured by absorbance at 280 nm in UV light spectrophotometer) according to the methodology described by Leite Júnior et al., (2014). The optimal temperature/pH was defined as the condition with the highest activity, representing 100% of the enzymatic activity. The relative enzyme activity (REA) was calculated according to equation 1 (Eq. 1).

$$REA(\%) = \left(\frac{\text{activity_non_optimal_condition}}{\text{activity_optimal_condition}} \right) \cdot 100 \quad \text{Eq. 1}$$

2.3 Effect of pretreatment by ultrasound on Alcalase® and PSPC: Evaluation of enzyme activity

Ultrasonic pretreatment of the Alcalase® and PSPC separately was carried out in an ultrasonic bath of nominal capacity of 9.5 L (Unique Inc, model USC 2800 A, Indaiatuba, Brazil) with temperature control, nominal power of 450 W and volumetric

power of 23.8 W/L, measured according to the calorimetric method O'Donnell et al., 2010. The equipment had five transducers of 40 kHz arranged below the vat.

The US bath was filled with 6.5 L distilled water and a glass beaker with 100 mL of Alcalase solution (0.5% v/v, prepared in 0.1 mol/L phosphate buffer pH 7.5) or 100 mL of PSPC solution (1.0% w/v, prepared in the same buffer) was placed in the point with maximum ultrasonic intensity Vinatoru, 2015. The US pretreatments were carried out at fixed temperatures: 25°C (room temperature), 60 °C (optimum enzyme temperature), and 40 °C. The sample temperature was controlled using a stainless-steel heat exchanger inside the ultrasonic bath with recirculating water provided by an external thermostatic bath.

After 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, and 300 minutes of treatment, 5 mL aliquots of samples (pretreated Alcalase® or PSPC) were collected. The enzyme activity was determined according to the procedure described in section 2.2 at pH 7.5 and 60 °C (optimized conditions for enzyme reaction). For non-US pretreated samples, 5 mL aliquots were collected at 0 min and the activity was carried out under the same conditions.

The relative enzyme activity after US pretreatment of the enzyme (REA_E) or the substrate (REA_S) was calculated considering the activity of the samples processed by US in relation to the non-processed, under the same temperature condition, according to equation 2 (Eq. 2).

$$REA_E \text{ or } REA_S(\%) = \left(\frac{US_pretreatment_sample_activity}{Non_pretreatment_sample_activity} \right) \cdot 100 \quad Eq. 2$$

2.4 PSPC hydrolysis using US-pretreated enzyme and substrate under optimized conditions or under US-assisted reaction

To evaluate the PSPC hydrolysis using US-treated Alcalase® (120 min at 25 °C) or US-treated PSPC (15 and 120 min at 25 °C), a volume of 2 mL of the Alcalase® solution (0.5% v/v, prepared in 0.1 mol/L phosphate buffer pH 7.5), treated and non-treated by US, was added to 200 mL of PSPC solution (1.0% w/v, prepared in 0.1 mol/L phosphate buffer pH 7.5), treated or non-treated by US. Reactions were carried out in a thermostatic bath at 25, 40, and 60 °C up to 300 min. In addition, for US-assisted hydrolysis, native enzyme and protein were prepared under the same conditions (concentration and pH), added to a glass beaker at the same enzyme:substrate ratio

(1% v/v), and placed in the ultrasound bath exactly as described in section 2.3. The hydrolysis was measured by the TCA soluble protein concentration using Lowry method (Lowry et al., 1951), according to the described by Bučko et al. 2015.

The PSPC hydrolysis kinetics was evaluated using a model of first-order kinetics, where the reaction rate was demonstrated by the increase in the TCA soluble protein concentration (C), following equation 3 (Eq. 3).

$$C_t = C_{\infty}(1 - e^{-kt}) \quad \text{Eq. 3}$$

Where:

C_t = TCA soluble protein concentration (mg/L) at time t;

C_{∞} = Final concentration of TCA soluble protein (mg/L);

t = Time of enzymatic reaction (min)

k = hydrolysis reaction rate (min^{-1}) at a given temperature.

2.5 Evaluation of solubility and *in vitro* antioxidant activity

The solubility and *in vitro* antioxidant activity of the hydrolysates were determined. For this, the reaction was carried out in a water bath using US-pretreated enzyme and substrate under optimized conditions or under US-assisted reaction at the same conditions described in section 2.3. After 30, 120, and 300 min of hydrolysis at 60 °C, aliquots were collected, boiled for 10 min to stop the reaction, and centrifuged at 7500g for 15 min at 4 °C to obtain the supernatant. As a control, conventional hydrolysis (using native PSPC and Alcalase®) was carried out in a water bath under the same conditions, and aliquots were also collected at the same time during hydrolysis. In addition, native protein (non-hydrolyzed) was also evaluated.

The solubility of native PSPC and hydrolysates was evaluated at pH 2, 4, 6, 8, and 10 and determined according to Magalhães et al. (2022). The *in vitro* antioxidant activity was measured by two different assays: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activities according to the methodology described by Magalhães et al. (2022).

2.6 Experimental design and statistical analysis

Processes and assays were carried out in triplicate (total n = 9). Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation.

The parameters of each mathematical model were determined by non-linear regression using the software CurveExpert Professional (version 2.6.5, Hyams Development, Chattanooga, USA) at 95% confidence level. The data of k and C_{∞} parameters, REA, solubility, and *in vitro* antioxidant activity were analyzed using one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test for multiple comparisons at 95% of confidence level (Statistical Analysis System - SAS Institute, Cary, NC, USA; version 9.2).

3. Results and Discussion

3.1. Effect of ultrasound on Alcalase® and PSPC: Evaluation of enzyme activity

In the range of pH and temperature studied, it was found that the optimal conditions for Alcalase® activity under PSPC was pH 7.5 and 60 °C (Figure 1). These parameters were used to determine the residual activity of Alcalase® under PSPC after US-processing of the enzyme and substrate.

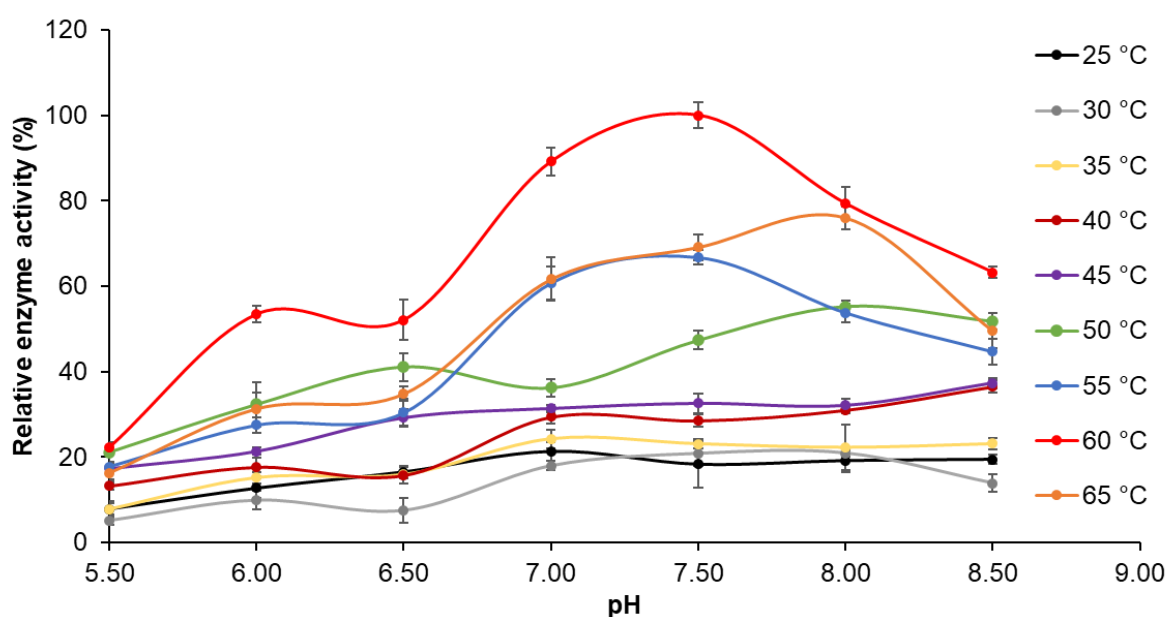


Figure 1. Effect of pH and temperature on relative enzyme activity (REA) of Alcalase® in pumpkin seed protein concentrate. Vertical bars represent standard deviation. The pH and temperature condition with the highest activity was established as optimal, with 100% of the enzyme activity. The relative enzyme activity (REA) was calculated using Eq. (1) for all other temperature and pH values.

The effect of pretreatment by US at different times (0 to 300 min) and temperatures (25, 40, and 60 °C) on the Alcalase® was determined by the residual activity of the enzyme (REA_E - Figure 2) measured at optimum pH and temperature (pH 7.50 / 60°C), with the result at time zero meaning the activity of the enzyme in native form. Results showed that US was not advantageous for Alcalase®, since only the process at 25°C for 120 min was able to slightly increase (10.3%) its activity ($p < 0.05$). In addition, a reduction in enzymatic activity was observed from 60 and 15 min of pretreatment at 40 and 60°C ($p < 0.05$), respectively.

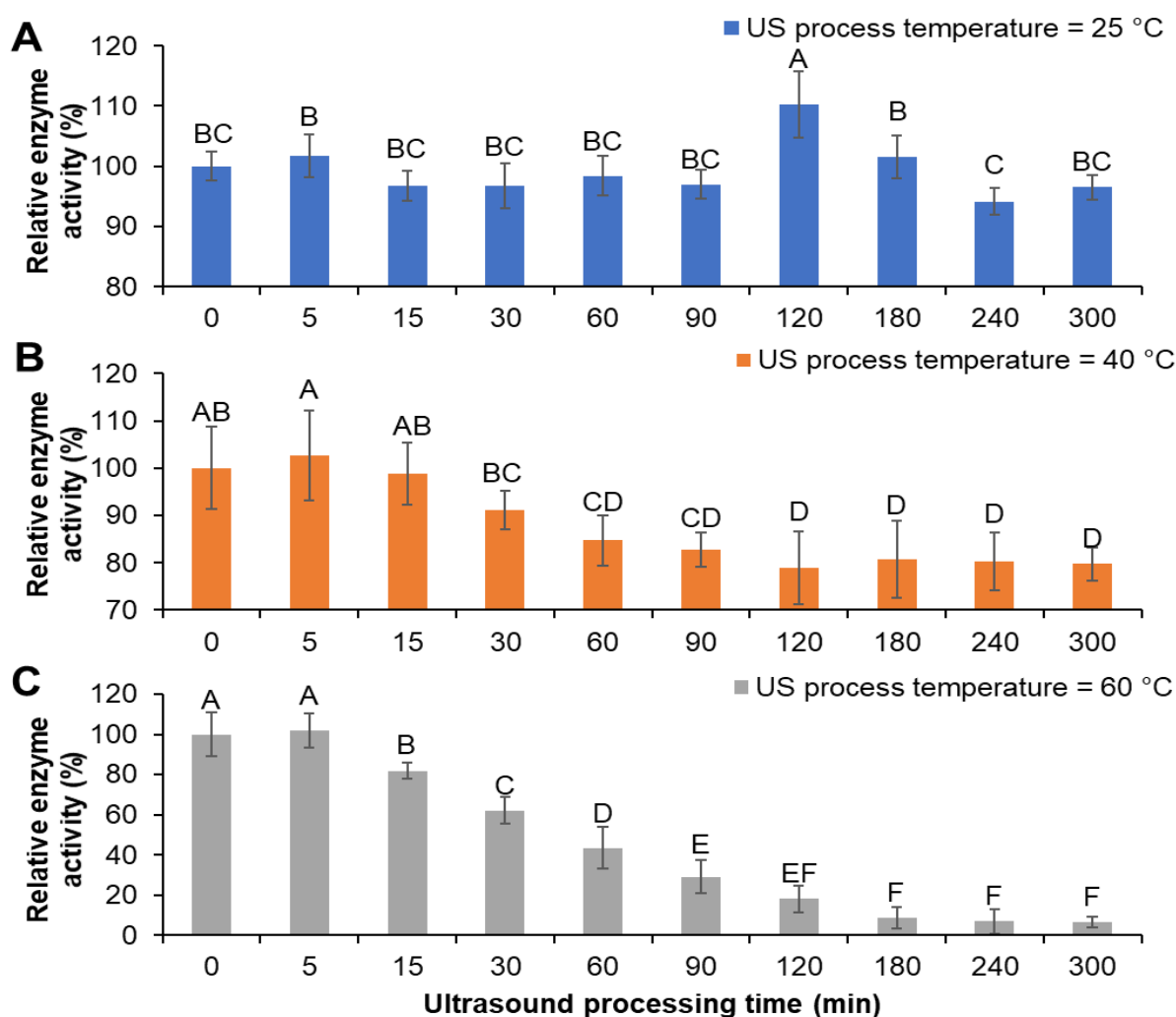


Figure 2. Relative enzyme activity measured at 60 °C/pH 7.50 on pumpkin seed protein concentrate using Alcalase® pretreated by ultrasound for up to 300 min at different temperatures (A: 25 °C, B: 40 °C and C: 60 °C) (REA_E , Eq. (2)). Different letters between the non-processed sample (0 min) and processed samples at different times at the same pH and temperature indicate significant differences at 5% probability by the Tukey test.

Conversely, more promisor results were observed when PSPC was sonicated prior to hydrolysis (REA_s - Figure 3), with Alcalase® activity increasing for most conditions evaluated at 25 and 60 °C. The best results were observed after pretreatment of PSPC at 25°C, reaching 50.1% of activity increase after 120 min of sonication. At the same temperature, pretreatment of the substrate for 15 minutes promoted an increase of ~16% in the activity, which can be interesting in terms of cost-benefit.

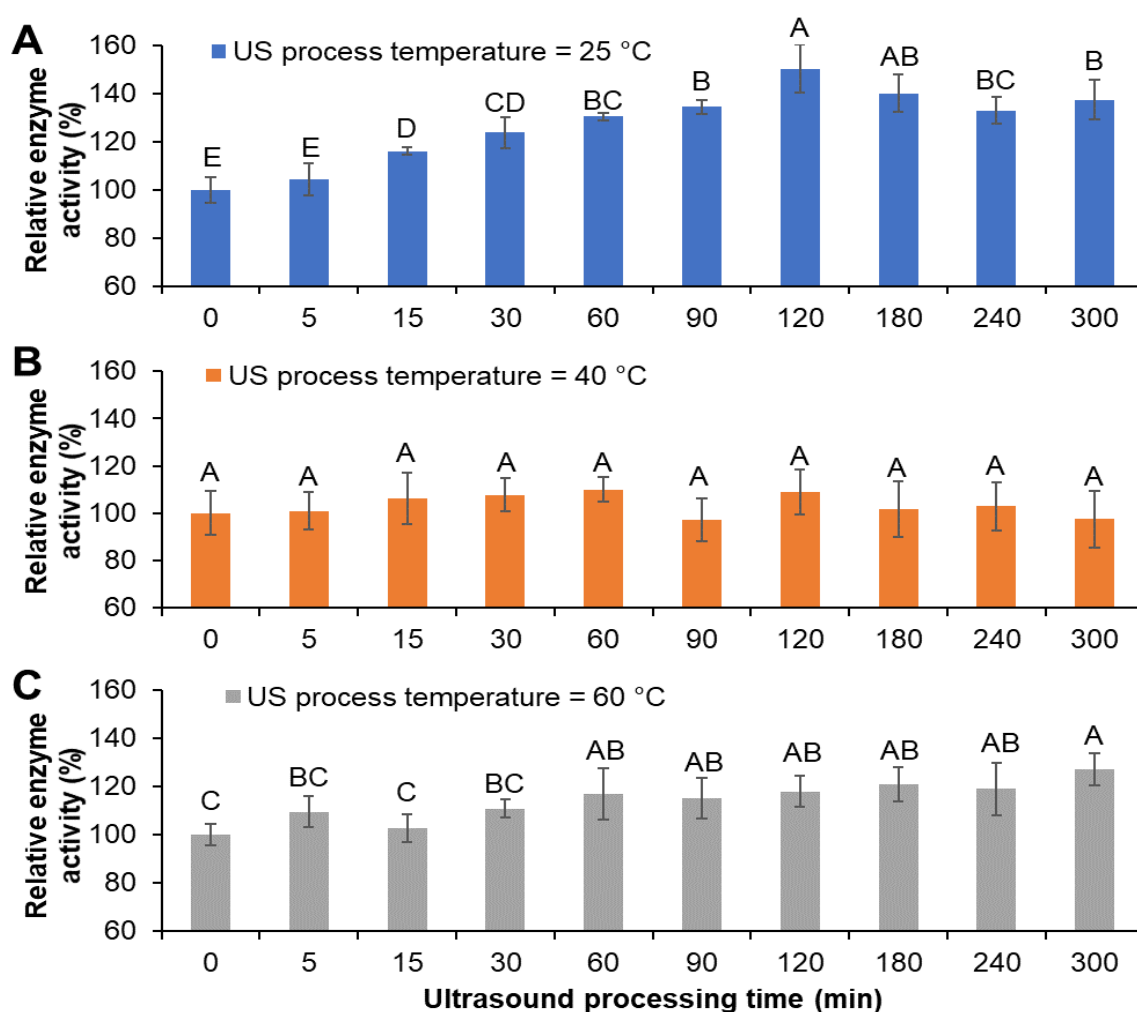


Figure 3. Relative enzyme activity of Alcalase® measured at 60 °C/pH 7.50 using pumpkin seed protein concentrate pretreated by ultrasound for up to 300 min at different temperatures (A: 25 °C, B: 40 °C and C: 60 °C) (REA_s , Eq. (2)). Different letters between the non-processed sample (0 min) and processed samples at different times at the same pH and temperature indicate significant differences at 5% probability by the Tukey test.

The effects observed in Alcalase® and PSPC are probably the consequences of the shear forces and turbulence in the cavitation zone formed punctually in samples subjected to US. During the sonication occurs the collapse of cavitation bubbles, generating a large amount of energy able to instantly increase the temperature and pressure of the region (Merouani et al., 2014; Soares et al., 2019). This energy can be enough to induce conformational changes in the tertiary and secondary structure (α -helix, β -sheet, β -turn, and random coil) of proteins (Hou et al., 2019), which can lead to enzyme activation, due to exposure of entrapped active sites (Hou et al., 2019; Meharabani et al., 2022) (as observed in the US process at 25°C for 120 min), or inactivation, when the energy provided, combining long US time and high temperature, induces undesirable denaturation (Dalagnol et al., 2017; Wu et al., 2021). Similarly, up to a limit of energy, sonication was described as able to disrupt hydrogen bonds and hydrophobic interactions in PSPC protein, with a consequent reduction in the size of protein aggregates and exposure of hydrophobic amino acid residues hidden inside the molecule (Du et al., 2022) that favors proteolysis caused by the enzyme (Magalhães et al., 2022), as observed mainly at 25°C. On the other hand, at extreme conditions, did not reach in this study, US could intensify PSPC aggregation (Wang et al., 2018) that impairs the enzyme's access to the protein, restricting its hydrolysis capacity.

Comparing the consequences of sonication of Alcalase® and PSPC, it was observed that the best performance, due to the high level of enzyme activity and the constancy of the effects, was achieved when the substrate was processed. This can be explained considering that the biological activity of the enzyme is strictly dependent on the molecular conformation (Wang et al., 2018), and slight modifications can cause an intense loss of activity (Soares et al., 2020), whereas few entrapped activity sites are expected, especially when activity is measured at an optimum temperature (Soares et al., 2020). In contrast, US-induced substrate particle size reduction is very effective in facilitating enzyme access (Wang et al., 2018), and the increment in time and temperature of the process tends to be less intense, allowing operation over a wider range of time and temperature to achieve a desirable effect.

3.2. Kinetic parameters of PSPC hydrolysis

Figure 4 shows the PSPC hydrolysis curves at different temperatures (25, 40, and 60°C) using: (i) conventional hydrolysis (native enzyme and protein), (ii) US-

pretreated enzyme at 120 min/ 25 °C and native protein, (iii) US-pretreated PSPC at 15 min/ 25 °C and native enzyme, (iv) US-pretreated PSPC at 120 min/ 25 °C and native enzyme, and (v) US-assisted reaction, using native protein and enzyme. The model fitted to these data (Eq. 3) was used to determine the hydrolysis rate (parameter k) and the final concentration of soluble protein in TCA (parameter C_{∞}) (Table 1).

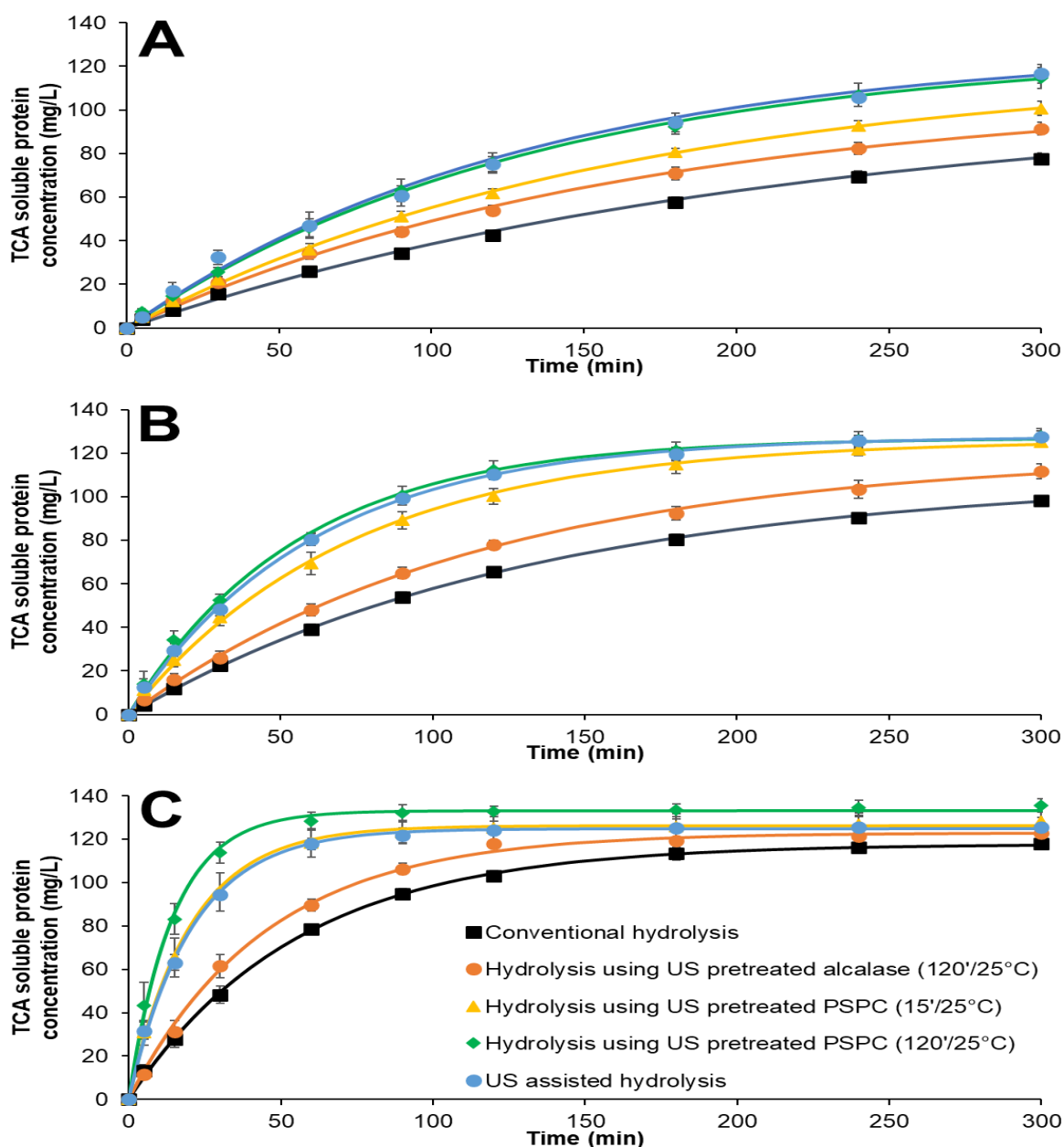


Figure 4. Pumpkin seed protein concentrate (PSPC) hydrolysis by Alcalase® at different temperatures (A: 25, B: 40, C: 60 °C) using ultrasound pretreated Alcalase® and PSPC under optimized conditions or assisted by ultrasound. The dots are the experimental values, the vertical bars are the standard deviation for each condition and the curves (continuous lines) are the adjusted model of Eq. (3).

Table 1. Parameters of Eq. (3) adjusted to hydrolysis of Alcalase® on pumpkin seed protein concentrate (PSPC) at different reaction temperatures using ultrasound pretreated Alcalase® and PSPC under optimized conditions or assisted by ultrasound.

Sample	Hydrolysis temperature (°C)	k ($\cdot 10^{-3}$) (min ⁻¹)	C _∞ (mg/L)	R ²	C _{30 min} (mg/L)	C _{120 min} (mg/L)	C _{300 min} (mg/L)
Conventional hydrolysis	25 °C	4.6 ± 0.7 ^g	104.3 ± 10.6 ^d	0.998	15.6 ± 2.6 ^h	42.6 ± 2.1 ⁱ	77.6 ± 2.8 ^h
Hydrolysis using US pretreated Alcalase® (120'/25°C)		6.1 ± 0.4 ^f	107.5 ± 0.8 ^d	0.998	20.9 ± 2.0 ^{gh}	54.0 ± 2.3 ^h	91.3 ± 2.9 ^g
Hydrolysis using US pretreated PSPC (15'/25°C)		6.2 ± 0.6 ^f	119.6 ± 5.5 ^{bc}	0.999	22.2 ± 1.5 ^g	61.7 ± 2.2 ^g	100.7 ± 3.2 ^f
Hydrolysis using US pretreated PSPC (120'/25°C)		7.5 ± 0.7 ^{ef}	127.9 ± 5.4 ^{ab}	0.999	25.6 ± 2.3 ^g	75.8 ± 4.7 ^f	114.6 ± 4.9 ^{de}
US assisted hydrolysis	40 °C	7.7 ± 1.5 ^{ef}	128.7 ± 10.3 ^{ab}	0.996	32.4 ± 3.4 ^f	75.0 ± 3.5 ^f	116.6 ± 4.3 ^{de}
Conventional hydrolysis		7.5 ± 0.6 ^{ef}	109.3 ± 3.8 ^d	0.999	22.5 ± 1.4 ^g	65.4 ± 1.8 ^g	98.4 ± 1.8 ^f
Hydrolysis using US pretreated Alcalase® (120'/25°C)		8.6 ± 0.5 ^e	119.4 ± 4.2 ^{bc}	0.999	26.2 ± 2.9 ^g	78.0 ± 2.2 ^f	111.7 ± 3.3 ^e
Hydrolysis using US pretreated PSPC (15'/25°C)		13.8 ± 1.5 ^d	126.2 ± 3.1 ^{ab}	0.998	44.6 ± 3.6 ^e	100.1 ± 3.7 ^e	125.1 ± 2.1 ^{bc}

Hydrolysis using US pretreated PSPC (120'/25°C)		17.8 ± 1.1 ^{cd}	127.1 ± 4.1 ^{ab}	0.99 7	52.6 ± 2.5 ^d	112.5 ± 3.9 ^d	127.9 ± 3.5 ^{bc}
US assisted hydrolysis		16.6 ± 0.8 ^{cd}	127.7 ± 2.1 ^{ab}	0.99 9	48.5 ± 3.2 ^{de}	110.2 ± 2.3 ^d	127.6 ± 2.5 ^{bc}
Conventional hydrolysis		18.1 ± 1.4 ^{cd}	117.9 ± 2.8 ^c	0.99 9	48.3 ± 4.0 ^{de}	103.0 ± 2.4 ^e	117.8 ± 2.5 ^d
Hydrolysis using US pretreated Alcalase® (120'/25°C)		22.2 ± 1.8 ^c	123.1 ± 1.9 ^{bc}	0.99 8	61.5 ± 5.3 ^c	118.1 ± 1.1 ^c	122.7 ± 2.1 ^c
Hydrolysis using US pretreated PSPC (15'/25°C)	60 °C	49.5 ± 9.0 ^b	126.2 ± 5.4 ^{ab}	0.99 9	95.6 ± 8.7 ^b	125.3 ± 6.2 ^b	128.3 ± 5.7 ^b
Hydrolysis using US pretreated PSPC (120'/25°C)		68.6 ± 10.3 ^a	133.1 ± 2.7 ^a	0.99 7	113.7 ± 4.8 ^a	132.9 ± 2.4 ^a	135.7 ± 3.2 ^a
US assisted hydrolysis		48.5 ± 2.5 ^b	124.8 ± 4.1 ^{abc}	0.99 9	94.4 ± 2.5 ^b	124.0 ± 4.4 ^b	125.7 ± 4.4 ^{bc}

* Mean ± standard deviation of nine replicates (n = 9). Different letters in column indicate significant difference (p < 0.05) among treatments evaluated at different temperatures. US: ultrasound. k = hydrolysis reaction rate (min⁻¹) at given temperature. C_∞ = Final concentration of TCA soluble protein (mg/L). C_{30 min}, C_{120 min} and C_{300 min} = concentration of TCA soluble protein at 30, 120 and 300 min of hydrolysis, respectively (mg/L).

As expected, a higher hydrolysis rate was observed at 60°C, showing that the pretreated of enzyme/substrate or US-assisted reaction were not able to change the optimum temperature of hydrolysis. The comparative evaluation of the processes showed that for most conditions evaluated, conventional hydrolysis (control sample) had a lower rate of hydrolysis than those involving US processing ($p < 0.05$), with consequent lower concentrations of TCA soluble protein during hydrolysis ($C_{30\text{min}}$, $C_{120\text{min}}$ and $C_{300\text{min}}$ - Table 1). The maximum increases of hydrolysis rate (~280%) and $C_{30\text{min}}$ (~235%) were observed for PSPC pretreated by US for 120 min at 25 °C and hydrolyzed at 60 °C ($p < 0.05$). In addition, improving in this rate induced by US at sub-optimum temperature, mainly 40 °C, can be industrially desirable due to energy saving and to obtaining high-quality products.

Moreover, increases (up to 24%) in the C_{∞} were observed using US pretreated PSPC or US-assisted hydrolysis ($p < 0.05$), independent of the hydrolysis temperature. Conversely, for hydrolysis carried out with US pretreated enzyme, C_{∞} higher than the control was observed only for proteolysis at 40°C (Table 1).

It was expected a better performance of US-assisted hydrolysis compared to other processes because, in this case, the reaction could be favored by positive alterations in enzyme and substrate (described in section 3.1), and by the US ability of reducing the barrier of diffusion between the enzyme and substrate, with consequent mass transfer improvement (Wang et al., 2018; Magalhães et al., 2022). However, the overall results of the kinetic parameters suggest that US modification of the substrate prior to hydrolysis (PSPC pretreated by US for 120 min at 25°C) equals or exceeds the gains obtained by US-assisted hydrolysis. Therefore, the results highlighted that the industry interested in improving the obtaining of hydrolysates can choose one of these two possibilities (US-assisted proteolysis or US treatment of PSPC prior to hydrolysis) to improve the processes, being the final decision dependent on the equipment size and availability, cost of energy and characteristics of the obtained hydrolysates.

3.3 Evaluation of solubility and *in vitro* antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from US-enhanced enzymatic hydrolysis of PSPC

Solubility is an important characteristic of peptides, which affects its biological and techno-functional properties and that commonly have a direct relationship with the

peptide size and polarity. The solubility of native PSPC (non-hydrolyzed) and hydrolysates over the pH range of 2–10 was shown in Figure 5.

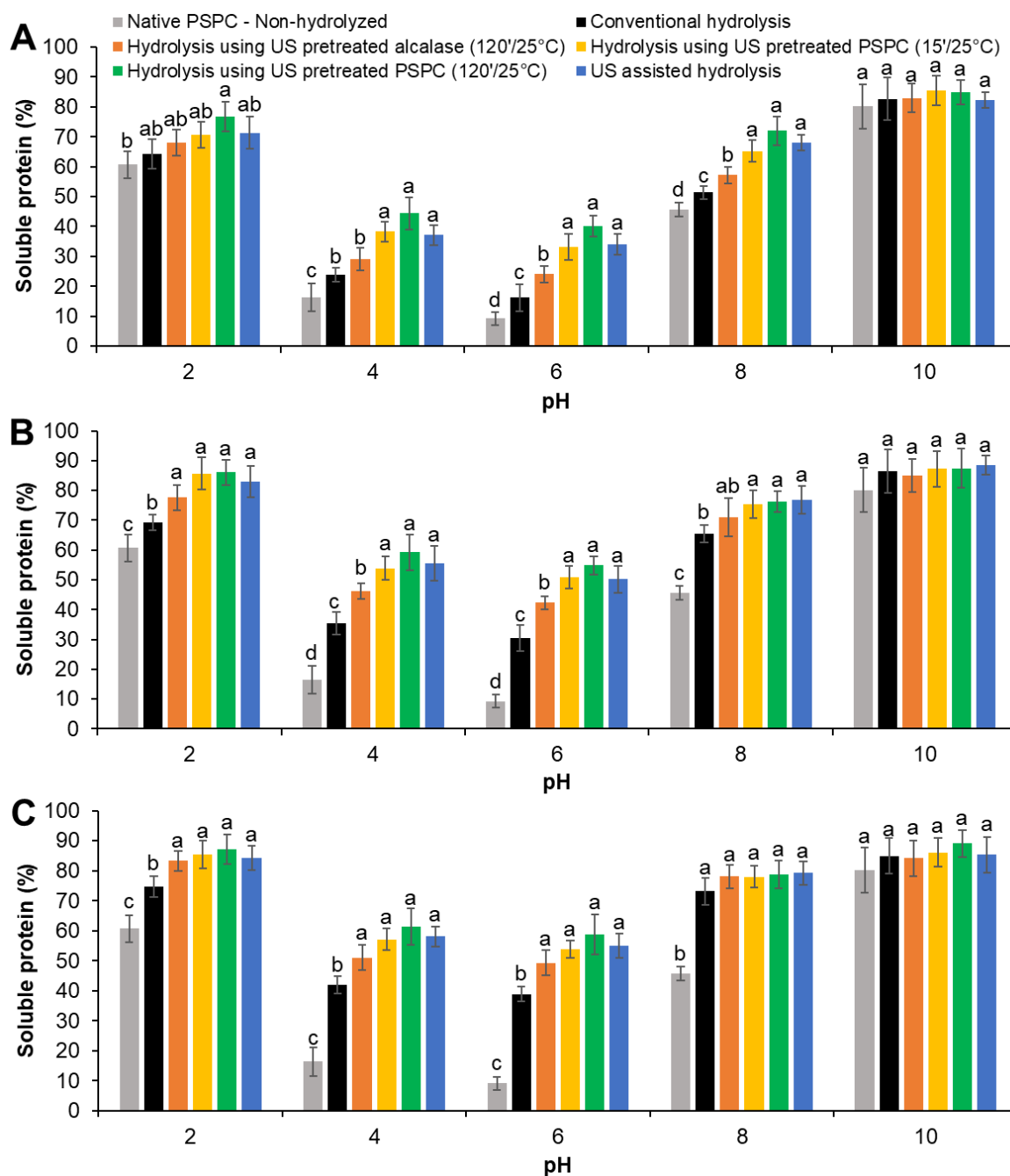


Figure 5. Protein solubility (%) of pumpkin seed protein concentrate (PSPC) hydrolyzed for 30 (A), 120 (B), and 300 (C) min at 60°C using ultrasound pretreated Alcalase® and PSPC under optimized conditions or assisted by ultrasound. Different letters at each pH indicate significant differences among samples ($p < 0.05$).

Native PSPC showed lower solubility at values close to the isoelectric point of the protein ($pI = 5.0$, (Bučko et al., 2016)) (16.4% at pH 4.0 and 9.2% at pH 6.0) and

an increase at lower or higher pH, reaching the highest values at pH extremes (60.7% at pH 2.0 and up to 80.1% at pH 10.0), similarly as observed in previous study (Bučko et al., 2016), which was expected due to strong intermolecular interactions at isoelectric point pH and molecular repulsion at higher or lower pH (Yuliana et al., 2014; Chatterjee et al., 2015).

Proteolysis improved the solubility of native PSPC at pH from 2.0 to 8.0, with higher increases at pH 4 and 6 (261% and 427%, respectively, after 300 min of hydrolysis) ($p < 0.05$). The higher solubility of the hydrolysates, compared to the solubility of native PSPC, is due to the peptides with smaller molecular size formed during enzymatic hydrolysis, as well as the exposure of polar and ionizable groups (amino and carboxyl groups) that increase the hydrophilicity of the hydrolysates (Bučko et al., 2016).

Compared with conventional hydrolysis, processes involving US treatment improved solubility under most conditions evaluated, with an increase of up to 148.1% ($p < 0.05$), being in accordance with the increase of TCA soluble protein concentration shown for US-treated samples in section 3.2. Therefore, US can be applied to achieve higher levels of solubility after PSPC hydrolysis.

The *in vitro* antioxidant capacity of PSPC hydrolysates was measured by the determination of ABTS (cationic and hydrophilic radicals) and DPPH (anionic and lipophilic radicals) radicals. Results are reported in Figure 6, expressed as a percentage of antioxidant activity for ABTS and DPPH assays.

According to the results, the DPPH and ABTS radical scavenging capacities of PSPC hydrolysates were significantly higher ($p < 0.05$) than native PSPC (non-hydrolyzed). Pumpkin seed protein hydrolysates also have DPPH and ABTS radical scavenging activity in other studies (Popović et al., 2013; Venuste et al., 2013; Nourmohammadi et al., 2017). Furthermore, DPPH and ABTS radical scavenging activity of PSPC hydrolysates increased with increasing hydrolysis time, which was expected considering the increase in the hydrolysis extension along the process. Antioxidant activity has been associated with low molecular weight peptides that have hydrophobic amino acids, such as Try, Tyr, Pro, and Phe (Rizzello et al., 2016; Magalhães et al., 2022).

Comparing the ABTS and DPPH methods, higher values of antioxidant activity expressed in percentage were obtained by the DPPH method. Such differences

between the methods may be related to changes in protein composition and surface hydrophobicity values for the respective hydrolysates that can be able to differently scavenge the ABTS and DPPH radicals (Samaei et al., 2020).

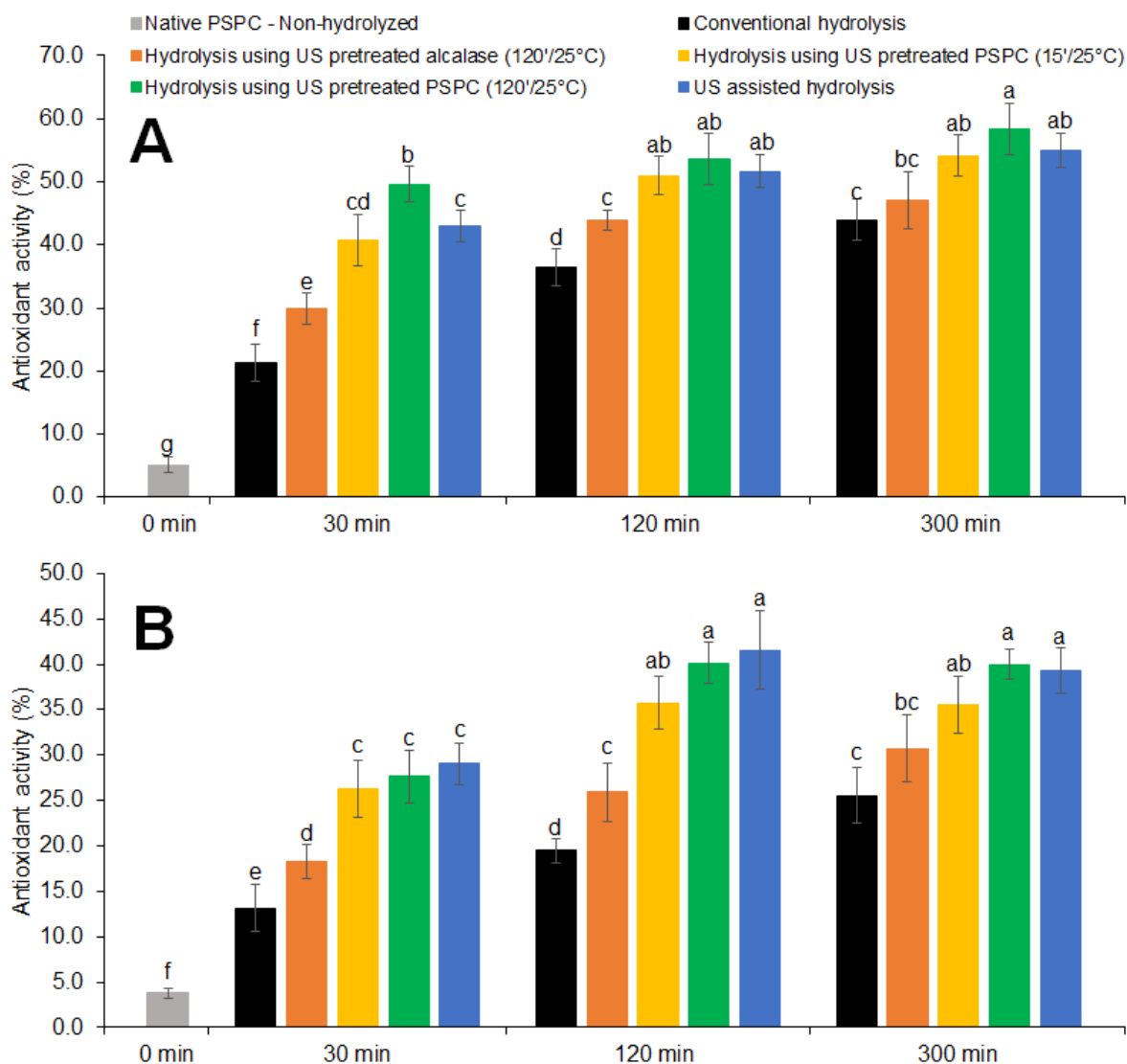


Figure 6. *in vitro* antioxidant activity from the (A) DPPH and (B) ABTS assays of PSPC hydrolyzed for up to 300 min at 60 °C using ultrasound pretreated Alcalase® and PSPC under optimized conditions or assisted by ultrasound. Different letters for each assay indicate significant differences among samples ($p < 0.05$).

Regarding the processes involving US processing, a higher scavenging capacity ($p < 0.05$) of DPPH and ABTS was observed after 30 min (up to 132.9% increase - Hydrolysis using US pretreated PSPC for 120 min) and 120 min (up to 113.3% increase – US-assisted process) of hydrolysis, respectively. These results are

consistent with those on the effect of US on the final concentration of TCA soluble protein, reinforcing the correlation between small peptides and antioxidant activity. However, it is important to highlight that the *in vitro* antioxidant activity should be only considered as an indicative of improved biological activity after PSPC hydrolysis. For a conclusive response, native protein and peptides obtained in optimized proteolysis conditions should be evaluated through *in vivo* antioxidant tests in further studies (Manzoor et al., 2022). Moreover, other *in vitro* and *in vivo* biological activities, such as antidiabetic and antihypertensive activity, should be measured for complete evaluation (Daroit & Brandelli, 2021).

4. Conclusion

The effect of ultrasound on pumpkin seed protein concentrate (PSPC) hydrolysis by Alcalase® was evaluated for the first time in different approaches to elucidate its effect on Alcalase®, PSPC and under US-assisted reaction. The pretreatment of Alcalase® by US promoted an activation of up to 10.3% and the pretreatment of PSPC by US facilitated the reaction, resulting in an activity increase up to 50.1%. PSPC hydrolysis rate (up to ~280% increase) and final concentration of TCA soluble peptides (up to ~24% increase) were improved mainly using US pretreated PSPC or in assisted reactions. Consequently, for most conditions evaluated, hydrolysis of PSPC using US processing improved the solubility (up to 148.1%) and potentiated the *in vitro* antioxidant activity of the hydrolysates. The general evaluation of the results highlighted that, among the US processes studied, the pretreatment of PSPC or US-assisted reaction are good strategies to enhance the generation of hydrolysates with better multifunctional properties.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001; the Minas Gerais Research Foundation (FAPEMIG, Brazil) for funding the project APQ-00388-21 and the National Council for Scientific and Technological Development for funding project 429033/2018-4 and the productivity grants of B.R.C. Leite Júnior (306514/2020-6) and A.A.L. Tribst (305050/2020-6).

References

- Amin, M. Z., Islam, T., Uddin, M.R., Uddin, M. J., Rahman, M. M., Satter, M. A. Comparative study on nutrient contents in the different parts of indigenous and hybrid varieties of pumpkin (*Cucurbita maxima* Linn.). **Heliyon**, v. 5, n. 9, e02462, 2019. 10.1016/j.heliyon.2019.e02462
- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Petrović, L., Milinković, J. 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. 10.1016/j.foodhyd.2016.04.005
- Bučko, S., Katona, J., Popovića, L., Vaštaga, Ž., Petrovića, L., Vučinić–Vasićb M. Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 609–615, 2015. 10.1016/j.lwt.2015.06.054
- Chatterjee, R., Dey, T. K., Ghosh, M., Dhar, P. Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 70-81, 2015. 10.1016/j.fbp.2015.01.007
- Cui, Q., Sun, Y., Cheng, J., Guo, M. Effect of two-step enzymatic hydrolysis on the antioxidant properties and proteomics of hydrolysates of milk protein concentrate. **Food Chemistry**, v. 366, n. 1, 130711, 2022. 10.1016/j.foodchem.2021.130711
- Daroit, D. J., Brandelli, A. *In vivo* bioactivities of food protein-derived peptides—a current review. **Current Opinion in Food Science**, v. 39, p. 120-129, 2021. 10.1016/j.cofs.2021.01.002
- Dalagnol, L. M. G., Silveira, V. C. C., Silva, H. B., Manfro, V., Rodrigues, R. C. Rodrigues. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 80-87, 2017. 10.1016/j.procbio.2017.06.029
- Du, H., Zhang, J., Wang, S., A. Manyande, Wang, J. Effect of high-intensity ultrasonic treatment on the physicochemical, structural, rheological, behavioral, and foaming properties of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.)-seed protein isolates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 155, 112952, 2022. 10.1016/j.lwt.2021.112952

- Franck, M., Perreault, V., Suwal, S., Marciniak, A., Bazinet, L., Doyen, A. High hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis improved protein digestion of flaxseed protein isolate and generation of peptides with antioxidant activity. **Food Research International**, v. 115, p. 467-473, 2019. 10.1016/j.foodres.2018.10.034
- Hou, F., Ma, X., Fan, L., Wang, D., Wang, W., Ding, T., Ye, X., Liu, D. Activation and conformational changes of chitinase induced by ultrasound. **Food Chemistry**, v. 285, p. 355-362, 2019. 10.1016/j.foodchem.2019.01.180
- Leite Júnior, B. R. C., Tribst, A. A. L., Cristianini, M. Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 21, p. 44-49, 2014. 10.1016/j.ifset.2013.11.006
- Li, F., Zhao, J., Wei, Y., Jiao, X., Li, Q. Holistic review of polysaccharides isolated from pumpkin: Preparation methods, structures and bioactivities. **International Journal of Biological Macromolecules**, 193 Part A, p. 541-552, 2021. 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.037
- Li, X., Li, Z., Wang, X., Han, J., Zhang, B., Fu, Y., Zhao, C. Application of cavitation system to accelerate aqueous enzymatic extraction of seed oil from *Cucurbita pepo* L. and evaluation of hypoglycemic effect. **Food Chemistry**, v. 212, p. 403-410, 2016. 10.1016/j.foodchem.2016.05.185
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951. 10.1016/S0021-9258(19)52451-6
- Manzoor, M., Singh, J., Gani, A. Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: *In vitro*, *in silico* and *in vivo* studies. **Food Chemistry**, v. 373, 131395, 2022. 10.1016/j.foodchem.2021.131395
- Mehrabani, A., Javan, A. J., Hesarinejad, M. A., Mahdavi, A., Parsaeimehr, M. The combined effect of ultrasound treatment and leek (*Allium ampeloprasum*) extract on the quality properties of beef. **Food Bioscience**, v. 47, 101622, 2022. 10.1016/j.fbio.2022.101622

Merouani, S., Hamdaoui, O., Rezgui, Y., Guemini, M. Theoretical estimation of the temperature and pressure within collapsing acoustical bubbles. **Ultrasonics Sonochemistry**, v, 21, n. 1, p. 53-59, 2014. 10.1016/j.ultsonch.2013.05.008

Nourmohammadi, E., Mahoonak, A. S., Alami, M., Ghorbani, M. Amino acid composition and antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil cake protein. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 12, p. 3244-3255, 2017. 10.1080/10942912.2017.1283516

O'Donnell, C.P., Tiwari, B.K., Bourke, P., Cullen, P.J. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 7, p. 358-367, 210. 10.1016/j.tifs.2010.04.007.

Popović, L., Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, S., Krimer, V., & Torbica, A. Antioxidative and functional properties of pumpkin oil cake globulin hydrolysates. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 90, n. 8, p. 1157-1165, 2013. 10.1007/s11746-013-2257-5

Rizzello, C. G., Tagliazucchi, D., Babini, E., Rutella, G. S., Saa, D. L. T., Gianotti, A. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 549-569, 2016. 10.1016/j.jff.2016.09.023

Samaei, S. P., Ghorbani, M., Tagliazucchi, D., Martini, S., Gotti, R., Themelis, T., Tesini, F., Gianotti, A., Toschi, T. G., Babini, E. Functional, nutritional, antioxidant, sensory properties and comparative peptidomic profile of faba bean (*Vicia faba*, L.) seed protein hydrolysates and fortified apple juice. **Food Chemistry**, v. 330, 127120, 2020. 10.1016/j.foodchem.2020.127120.

Soares, A. S., Augusto, P. E. D., Leite Júnior, B. R. C., Nogueira, C. A., Vieira, E. N. R., Barros, F. A. R., Stringheta, P. C., & Ramos, A. M. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters. **LWT - Food Science and Technology**, v. 107, p. 164-170, 2019. 10.1016/j.lwt.2019.02.083

Soares, A. S., Leite Júnior, B. R. C., Tribst, A. A. L., Augusto, P. E. D., Ramos, A. M. Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme,

substrate and assisted reaction. **LWT - Food Science and Technology**, v. 130, 109636, 2020. 10.1016/j.lwt.2020.109636

Teshnizi, Z. M., Robatjazi, S. M., Mosaabadi, J. M. Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Poultry Slaughterhouse Wastes using Alcalase Enzyme for the Preparation of Protein Hydrolysates. **Applied Food Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 153-160, 2020. 10.22037/afb.v7i3.28417

Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. **Food and bioproducts processing**, v. 88, p. 277-282, 2010. 10.1016/j.fbp.2009.12.003

Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1316-1321, 2011. 10.1016/j.foodchem.2010.07.062

Venuste, M., Zhang, X., Shoemaker, C. F., Karangwa, E., Abbas, S., Kamdem, P. E. Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. **Food and Function**, v. 4, n. 5, p. 811–820, 2016. 10.1039/c3fo30347k

Vinatoru, M. Ultrasonically assisted extraction (UAE) of natural products some guidelines for good practice and reporting. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 25, p. 94-95, 2015. 10.1016/j.ultsonch.2014.10.003

Wang, D., Yan, L., Ma, X., Wang, W., Zou, M., Zhong, J., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 453-461, 2018. 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.133

Wu, J., Chen, H., Chen, W., Zhong, Q., Zhang, M., & Chen, W. Effect of ultrasonic treatment on the activity of sugar metabolism relative enzymes and quality of coconut water. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 79, 105780, 2021. 10.1016/j.ultsonch.2021.105780

Yu, Z., Zeng, W., Zhang, W., Liao, X., & Shi, B. (2014). Effect of ultrasound on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 930-936, 2014. 10.1016/j.ultsonch.2013.11.002

Yuliana, M., Truong, C. T., Huynh, L. H., Ho, Q. P., Ju, Yi-H. Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: influence of pH and NaCl on solubility and functional properties. **LWT – Food Science and Technology**, v. 55, p. 621-626, 2014. 10.1016/j.lwt.2013.10.022

Capítulo 3: Alterações estruturais induzidas por ultrassom em proteases e suas consequências na hidrólise de proteínas de semente de abóbora e nas propriedades multifuncionais dos hidrolisados obtidos

Resumo

Este estudo avaliou o uso do ultrassom (US) (40 kHz, 23,8 W/L) em proteases comerciais visando entender como alterações na estrutura das enzimas e em suas macros características afetam a cinética de hidrólise na proteína concentrada de semente de abóbora (PCSA), medida pela taxa (k) e grau de hidrólise (GH), e na solubilidade e a atividade antioxidante *in vitro* (ABTS e DPPH) dos hidrolisados obtidos. Os resultados mostraram que o pré-tratamento por US à 25°C aplicado em diferentes tempos ativou Neutrase®, Brauzyn® e Flavourzyme® (~22%), com alterações no espectro de absorção de ultravioleta (UV) e fluorescência intrínseca (indicadores de mudança na estrutura terciária) mais contundentes para Flavourzyme®, que, conseqüentemente, também foi a enzima que apresentou maiores aumentos de tamanho de partícula (~21%) e de índice de polidispersidade (~60%) comparado com a enzima em sua forma nativa. Por outro lado, pré-tratamento por US em condições de inativação (60°C / 180min), resultaram em as alterações estruturais mais expressivas, indicando uma desnaturação proteica com a formação de agregados heterogêneos. Para maioria das condições de hidrólise avaliadas, a proteólise da PCSA com as enzimas ativadas por US apresentou maior GH (66-88%). Como consequência, foi observado aumento de até 53% na solubilidade dos hidrolisados (melhores resultados com Neutrase®) e aumento da capacidade antioxidante (até 40% para ABTS e DPPH utilizando Neutrase® e Flavourzyme®, respectivamente). Os resultados destacam o US como uma técnica promissora para modificar estruturalmente as proteases, melhorando seu desempenho hidrolítico.

Palavras-chave: Proteína; enzima; sonicação; proteólise; espectroscopia de fluorescência; atividade antioxidante.

1. Introdução

A investigação de proteínas extraídas de resíduos agroindústrias está ganhando cada vez mais atenção devido à demanda por novas fontes de proteínas associadas ao aumento da população global. Neste sentido, destaca-se as sementes de abóboras (*Curcubita pepo*), oriundas do processamento deste vegetal, que apresentam 25 – 36% de proteínas em sua composição (Bucko et al., 2015).

A hidrólise destas proteínas é uma intervenção interessante para potencializar suas propriedades técnico-funcionais, como solubilidade e capacidade emulsificante (Bucko et al., 2016), bem como para produção de peptídeos bioativos, com ações antioxidante, anti-hipertensiva e antidiabética (Vaštag et al., 2010; Vaštag et al., 2011; Popović et al., 2013). As propriedades dos hidrolisados dependem de fatores como o tipo e a especificidade da enzima e das condições de hidrólise, incluindo pH, razão enzima-substrato e temperatura (He et al., 2015; Jin et al., 2015; Sila & Bougatef, 2016).

Diversos estudos tem usado diferentes proteases comerciais devido às especificidades de cada uma, justificando o estudo comparativo entre elas (Sun et al., 2021; Magalhães et al., 2022). Entre opções de enzimas comerciais, a Brauzyn® (papaína) cliva as ligações peptídicas de regiões hidrofóbicas, incluindo os aminoácidos Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp e Tyr (Lorenzo et al., 2018), Flavourzyme® clivam preferencialmente a ligação peptídica entre Leu e Pro ou Pro e Pro (Zhao et al., 2012) e Neutrase® é uma metaloprotease e cliva preferencialmente a ligação peptídica entre o C-terminal Leu e Phe na posição P1 (Zhu, He & Hou, 2019). Portanto, hidrolisados de proteínas obtidos por diferentes proteases podem ter diferentes propriedades técnico-funcionais e biológicas.

Apesar dos benefícios conhecidos da obtenção de hidrolisados via enzimática, como sustentabilidade do processo e especificidade dos produtos, existem desvantagens como alto custo das enzimas, longo tempo de hidrólise e baixo rendimento (Soares et al., 2020). Assim, processos físicos como o ultrassom (US) têm sido estudados visando melhorar processos catalíticos.

O US é uma tecnologia que utiliza a frequência de ondas sonoras acima de 20 kHz (Fadimu et al., 2022) e, dependendo das condições de processamento, pode melhorar a proteólise (Jain & Anal, 2016) quando aplicado no pré-tratamento da enzima ou do substrato antes da hidrólise e, para alguns processos, por meio de

reações assistidas (Kadam et al., 2015; Magalhães et al., 2022). Especificamente, o pré-tratamento da enzima induz mudanças estruturais e desdobramentos que podem expor sítios ativos aprisionados no núcleo hidrofóbico de enzimas nativas, melhorando seu desempenho (Li & Tang, 2021). Ma et al. (2011) provaram que o pré-tratamento ultrassônico da Alcalase® alterou a estrutura espacial da enzima e acelerou a taxa de reação enzimática.

Apesar de diversos estudos mostrarem resultados satisfatórios do US na melhoria da catálise, poucos se dedicaram a avaliar as alterações induzidas pelo processo na estrutura de enzimas e a correlacionar essas mudanças com as melhorias observadas na taxa de hidrólise e quantidade de hidrolisado obtidos. Para preencher esta lacuna, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do pré-tratamento ultrassônico na estrutura de três enzimas comerciais (Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase®) e correlacionar as mudanças observadas com a melhoria na performance hidrolítica destas enzimas sobre as proteínas de sementes de abóbora.

2. Material e Métodos

2.1 Proteases e proteína concentrada de semente de abóbora (PCSA)

A enzima Brauzyn® foi fornecida pela Prozyn Biosolutions (São Paulo, Brasil) e as enzimas Flavourzyme® e Neutrase® foram fornecidas pela Novozymes Latino Americana Ltda (Araucária, Brasil). Nos ensaios, as enzimas foram diluídas em tampão fosfato de sódio 0,1mol/L (pH 7,5) nas concentrações de 1% para Brauzyn® e Neutrase® e 0,5% para Flavourzyme®, sendo estas concentrações definidas com base nos valores de Km e dentro da faixa de diluição recomendada pelos fabricantes.

As sementes de abóbora (*Curcubita pepo* – 29,8% de umidade, 21,9% de proteínas e 48,3% de extrato seco não proteico) foram doadas pela empresa Doces Mirahy (Miraí, Brasil). A proteína foi extraída da semente pelo processo de extração alcalina com precipitação isoelétrica (Bučko et al., 2016), no qual a torta de óleo de semente de abóbora moída foi primeiramente desengordurada com éter de petróleo (1:3 p/v) e depois misturada com água destilada estéril (1:10 p/v) e, a essa mistura, uma solução de NaOH (1 mol/L) foi adicionada até atingir pH 10. Após 30 min de agitação à 4 °C, a pasta foi filtrada (papel de filtro qualitativo Whatman #1) e solução de HCl (1 mol/L) foi adicionada ao filtrado até atingir pH 5,0 para precipitação das

proteínas. O precipitado foi separado da fase líquida por filtração e liofilizado (LP510, Liotop-Liobras, Brasil), obtendo-se a PCSA com 1,8% de umidade, 78,6% de proteína e 19,7% de extrato seco não proteico composto principalmente por minerais e resíduos de lipídios e carboidratos. Para os ensaios de hidrólise, a PCSA foi diluída a 1% (p/v) em tampão fosfato de sódio 0,1mol/L (pH 7,5).

2.2 Atividade das proteases comerciais sobre a PCSA em diferentes temperaturas

A atividade das proteases sobre a PCSA foi medida em temperaturas variando entre 25 e 70°C e em condições ótimas de pH (pH 7,5 – definida de acordo com resultados preliminares e com base na literatura (Wang et al., 2021)).

A atividade enzimática foi determinada pela formação de peptídeos solúveis em TCA (medidos por absorbância a 280 nm em espectrofotômetro UV-Vis, modelo DU 1800, Shimatzu, Kyoto, Japão), conforme metodologia descrita por Magalhães et al. (2022).

A temperatura que resultou em maior proteólise para cada enzima foi definida como temperatura ótima, com atividade residual de 100%. A atividade enzimática relativa (AER) para as demais temperaturas foi calculada de acordo com a equação 1 (Eq. 1).

$$AER (\%) = \left(\frac{atividade_{temperatura_não_ótima}}{atividade_{temperatura_ótima}} \right) \cdot 100 \quad Eq. 1$$

2.3 Pré-tratamento das proteases por US: Efeito na atividade enzimática residual

O pré-tratamento ultrassônico das enzimas foi realizado em banho ultrassônico (Unique Inc, modelo USC 2800 A, Indaiatuba, Brasil). O banho de ultrassom foi operado com 40 kHz de frequência e 450 W de potência nominal. A potência volumétrica real (23,8 W/L) fornecida à solução foi determinada pelo método calorimétrico descrito por O'Donnell et al. (2010).

Inicialmente, foi colocado 6,5L de água destilada no banho ultrassônico e um béquer de vidro contendo 100 mL de solução das enzimas individuais preparadas conforme descrito na seção 2.1 foi colocado no ponto de máxima exposição à

intensidade ultrassônica (determinado pelo método da folha de alumínio, conforme descrito por Vinatoru (2015)). O pré-tratamento por US foi realizado à temperatura ambiente (25°C), temperatura ótima da enzima (60°C para Brauzyn®, 55°C para Flavourzyme® e 50°C para Neutrase®) e à 40°C.

Após 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos de pré-tratamento das enzimas por US, alíquotas de 5 mL de amostras foram coletadas e a atividade enzimática foi determinada de acordo com a seção 2.2 em pH 7,5 e na temperatura ótima de cada enzima. A amostra coletada no tempo 0 foi considerada amostra não processada (enzima nativa).

A atividade enzimática relativa após pré-tratamento por US da enzima (AER_E) foi calculada considerando a atividade das amostras processadas por ultrassom em relação à da enzima nativa, na mesma condição de temperatura, conforme equação 2 (Eq. 2).

$$AER_E (\%) = \left(\frac{Amostra_{processada_por_US}}{Amostra_{nativa}} \right) \cdot 100 \quad Eq. 2$$

A partir dos resultados foi definido, para cada enzima, o melhor tempo de pré-processamento como aquele que resultou no maior %AER (25°C/60 min para Brauzyn®, 25°C/90 min para Flavourzyme® e 25°C/60 min para Neutrase®). Para as enzimas processadas nestas condições e em condições de inativação (60°C/180 min) foi realizada a caracterização estrutural. Em paralelo, para as condições de ativação foi realizada a cinética de hidrólise e a solubilidade e a capacidade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados obtidos da PCSA. As características das enzimas em seu estado nativo também foram avaliadas para fins comparativos.

2.4 Efeito do pré-tratamento ultrassônico na conformação estrutural das proteases em condições de ativação e inativação

2.4.1 Espectros de absorbância na região Ultravioleta (UV)

Os espectros de absorbância das proteases na região UV foram obtidos em espectrofotômetro (DU 1800, Shimatzu, Kyoto, Japão). Para isso, uma alíquota de 2,5 mL de cada solução enzimática em pH 7,5 foi preparada conforme descrito na seção 2.1, adicionada em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1cm e tiveram o

espectro de absorbância medido entre 200-400 nm. A solução de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,5 foi utilizada como branco.

2.4.2 Fluorescência Intrínseca

A espectroscopia de fluorescência intrínseca das proteases foi medida usando o método descrito por Ai et al. (2019) utilizando um espectrofotômetro de fluorescência SpectraMax M5 (Molecular devices, San Diego, EUA) com algumas modificações. Uma alíquota de 300 µL de cada solução enzimática, preparada em pH 7,5, conforme descrito na seção 2.1, foi adicionada em leitores de microplacas StakMax™. As amostras foram excitadas no comprimento de onda de excitação de fluorescência intrínseca Trp (295 nm) e os espectros de emissão foram registrados na faixa de 305-450 nm.

2.4.3 Potencial zeta, tamanho médio de partícula (TMP) e índice de polidispersão (IPD)

O potencial zeta, tamanho médio de partícula (TMP) e IPD de cada enzima foram determinados de acordo com o método descrito por Ai et al. (2019), com algumas modificações. Para determinação do potencial zeta, cada solução enzimática, preparada conforme descrita na seção 2.1, foi diluída (1:100) utilizando como diluente a mesma solução tampão empregada para preparar cada soluções originais (tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,5.). Em seguida, cada sistema a ser analisado foi colocado em uma cubeta e analisadas em um sistema Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido) à $25,0 \pm 0,1$ °C. Os valores de potencial zeta foram estimados pela aplicação de um campo elétrico e pelo cálculo da mobilidade eletroforética, a partir da velocidade e direção das partículas de proteína dispersas. O modelo de Smoluchowski foi usado para a dupla camada elétrica (Bhattacharjee, 2016). Adicionalmente, tamanho médio de partícula e índice de polidispersão cada solução enzimática foram determinados e calculados, respectivamente, utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS, conforme metodologia descrita por Soares et al. (2019). O IPD foi estimado a partir da relação do tamanho médio de partícula e desvio padrão para cada pico encontrado (Soares et al., 2019). Os resultados foram obtidos utilizando uma configuração do equipamento de:

ângulo de espalhamento de 173°; índice de refração de 1,330; viscosidade de 0,8872 cP.

2.5. Cinética de hidrólise das proteases pré-processadas por US em condições de máxima ativação

Um volume de 2 mL de cada solução enzimática, em sua forma nativa e em após processamento por US em condição de máxima ativação, foi preparada em água com pH ajustado com NaOH (0,1 mol/L) para 7,5. Este volume foi adicionado à 200 mL de solução de PCSA (1%, p/v, diluída em água com pH de 7,5 ajustado com NaOH (0,1 mol/L)) climatizada à temperatura de 25°C, 40°C ou temperatura ótima da enzima (60°C para Brauzyn®, 55°C para Flavourzyme® e 50°C para Neutrase®), para que as hidrólises fossem realizadas por até 180 min. 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. (2022). Os valores de GH foram calculados usando a equação 3 (Eq. 3).

$$GH_t = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100 = \frac{V \cdot C}{\alpha \cdot M \cdot h_{tot}} \cdot 100 \quad Eq. 3$$

Onde: V (mL) representa o volume consumido de NaOH, C (mol/L) é a concentração do NaOH, α representa o grau médio de dissociação de grupos α -NH₂ liberados durante a hidrólise a uma determinada temperatura e pH (0.414 para todas as enzimas, calculado de acordo com Kurozawa, Park, & Hubinger (2009)), M (g) representa a massa de proteína a ser hidrolisada na mistura e h_{tot} (mmol/g) significa o número molar de grupos peptídicos por unidade de massa de proteína.

A cinética de hidrólise da PCSA foi avaliada utilizando um modelo de primeira ordem, onde a velocidade de reação foi demonstrada pelo aumento do grau de hidrólise (GH), de acordo com a equação 4 (Eq. 4).

$$GH_t = GH_{\infty} (1 - e^{-kt}) \quad Eq. 4$$

Onde: GH_t significa grau de hidrólise (%) no tempo t ; GH_{∞} representa o grau de hidrólise final (%); t significa o tempo da reação (min) e k a taxa de hidrólise da reação (min^{-1}) a uma temperatura fixa.

2.6 Avaliação da solubilidade e da atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados obtidos utilizando enzima pré-processada em condições de máxima ativação

Para determinar a solubilidade e atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados, a reação foi realizada em banho-maria usando as enzimas pré-tratadas com US sob as condições de máxima ativação. Após 45 e 180 min de hidrólise à 60°C para Brauzyn®, 55°C para Flavourzyme® e 50°C para Neutrase®, alíquotas foram coletadas, fervidas por 10 min para parar a reação e centrifugadas à 7500g por 15 min a 4 °C para obter o sobrenadante. Como controle, a hidrólise convencional (utilizando as enzimas em suas formas nativas) foi realizada em banho-maria nas mesmas condições, e alíquotas também foram coletadas nos mesmos tempos da hidrólise. Além disso, a proteína nativa (não hidrolisada) também foi avaliada.

2.6.1 Solubilidade

A solubilidade da PCSA nativa e dos hidrolisados obtidos foram determinados conforme descrito por Magalhães et al. (2022). O conteúdo de proteína no sobrenadante foi determinado pelo método Lowry et al. (1951). A solubilidade (%) foi calculada de acordo com a equação 5 (Eq. 5).

$$\text{Solubilidade (\%)} = \left(\frac{\text{Proteínas no sobrenadante}}{\text{Total de proteínas na amostra}} \right) \cdot 100 \quad \text{Eq. 5}$$

2.6.2. Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante *in vitro* foi medida por dois ensaios: atividades de eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), de acordo com a metodologia descrita por Magalhães et al. (2022). A atividade de eliminação de radicais DPPH e ABTS foi calculada usando a equação 6 (Eq. 6).

$$Inibição (\%) = \frac{(Abs_{0\ min} - Abs_{60\ min})}{Abs_{0\ min}} \cdot 100 \quad Eq. 6$$

Onde: $Abs_{0\ min}$ é a absorbância da amostra no tempo 0 e $Abs_{60\ min}$ é a absorbância da amostra após 60 minutos de reação.

2.7 Desenho experimental e análises estatísticas

Processos e análises foram realizados em triplicata, perfazendo $n=9$. Os resultados quantitativos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os dados de AER, solubilidade e atividade antioxidante *in vitro* foram analisados usando one-way ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey para comparações entre as amostras com 95% de confiança (Statistical Analysis System - SAS Institute, Cary, NC, EUA; versão 9.2).

Os parâmetros de cada modelo matemático foram determinados por regressão não linear utilizando o software CurveExpert Professional (versão 2.6.5, Hyams Development, Chattanooga, EUA) em um nível de confiança de 95%. Os dados dos parâmetros k e C^∞ foram analisados utilizando os mesmos métodos estatísticos, nível de confiança e software descritos para análise dos dados de AER, solubilidade e atividade antioxidante.

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação da temperatura ótima para atividade das diferentes enzimas em PCSA

A atividade das proteases em pH 7,5 e em temperaturas entre 25 e 70 °C é exibida na Fig. 1. A atividade máxima da Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® foi alcançada nas temperaturas de 60 °C, 55 °C e 50 °C, respectivamente, sendo estas definidas como temperaturas ótimas de cada enzima, nas quais foram realizadas a avaliação da hidrólise de PCSA.

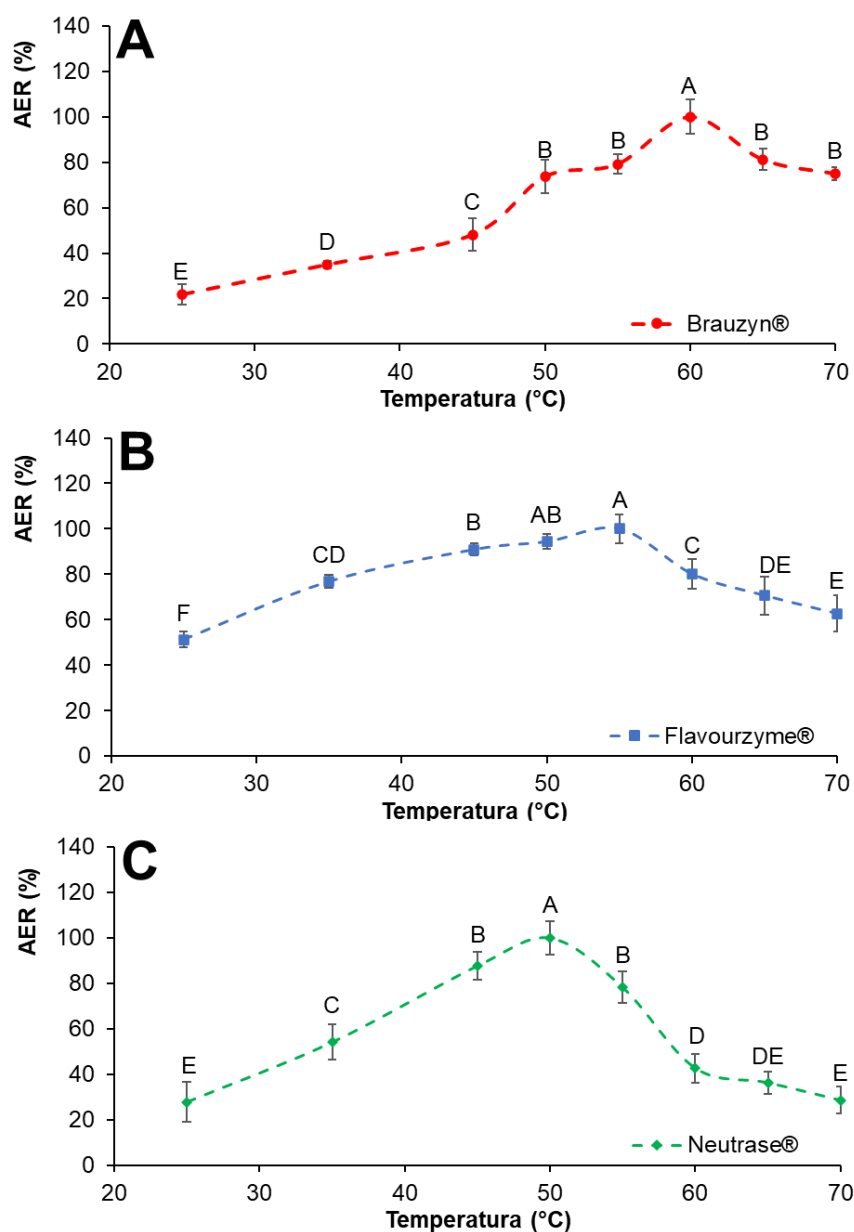


Figura 1. Efeito da temperatura na atividade enzimática relativa (AER) de Brauzyn® (A), Flavourzyme® (B) e Neutrase® (C) na PCSA. As barras verticais representam o desvio padrão. A condição de temperatura com maior atividade foi estabelecida como ótima, com 100% da atividade enzimática. A atividade enzimática relativa (AER) foi calculada usando a Eq. (1) para todos os outros valores de temperatura. Letras diferentes para cada enzima em temperaturas diferentes indicam diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.2. Efeito do ultrassom na atividade proteolítica das enzimas sobre a PCSA

A Figura 2 apresenta o efeito do pré-tratamento ultrassônico em diferentes temperaturas por até 180 min na AER_E.

A partir dos resultados, observou-se que o pré-tratamento por US à 25 e 40°C foi capaz de promover ativação enzimática em todas as proteases ($p < 0,05$), e que, para a Neutrase®, o pré-tratamento na temperatura ótima também resultou em ativação ($p < 0,05$). Os máximos aumentos de atividade da Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® foram de 20,8% (25°C/60 min), 22,4% (25°C/90 min) e 22,7% (25°C/60 min), respectivamente ($p < 0.05$).

Tais aumentos podem ser atribuídos ao fenômeno de cavitação gerado pelo US, no qual a intensa força de cisalhamento gerada pela implosão das bolhas formadas durante o processo é capaz de induzir modificações conformacionais das proteases, expondo os sítios ativos da enzima (Wang et al., 2018). Resultados anteriores mostraram que o US foi capaz de ativar diferentes enzimas em diferentes condições de processamento (Yu et al., 2014; Soares et al., 2020), com maior ativação (86%) observada para α -amilase e com ativação de proteases entre 14-26% (Yu et al., 2014), sendo estes valores compatíveis com os observados no presente trabalho.

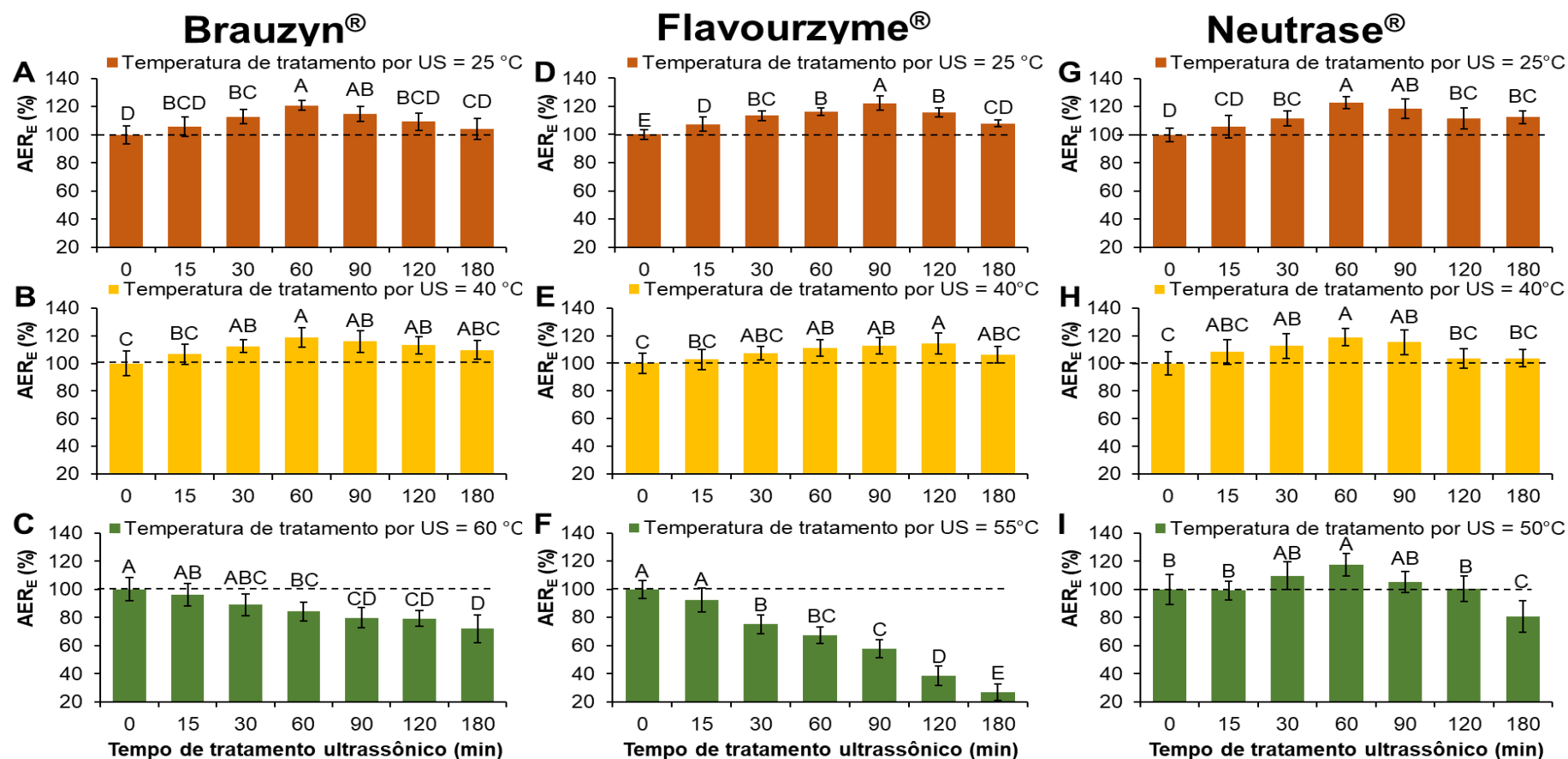


Figura 2. Atividade enzimática relativa medida a 60°C (Brauzyn®), 55°C (Flavourzyme®) e 50°C (Neutrase®) em PCSA usando Brauzyn® (A-C), Flavourzyme® (D-F) e Neutrase® (G-I) pré-tratada por US por até 180 min em diferentes temperaturas (AER_E, Eq. (2)). Letras diferentes para a mesma amostra em diferentes tempos na mesma temperatura indicam diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Por outro lado, os pré-tratamentos realizados à 60°C para Brauzyn® (a partir de 60 min), 55°C para Flavourzyme® (a partir de 30 min) e 50 °C para Neutrase® (após 180 min) promoveram uma redução na atividade enzimática das proteases ($p < 0,05$), atingindo reduções máximas de 28,0%, 73,2% e 19,3% após 180 min de processamento, respectivamente. A inativação nessas condições é explicada pela intensidade de energia fornecida à enzima, levando à desnaturação com consequente perda de atividade, conforme sugerido por Soares et al. (2019), que observaram uma perda de 15% na atividade de invertase após processamento por US à 55°C.

3.3 Alterações conformacionais induzidas pelo processo de US nas proteases

As enzimas são proteínas globulares monoméricas cuja atividade catalítica depende da configuração de seu sítio ativo (Ma et al., 2011). O US pode causar alterações na estrutura secundária e terciária de enzimas, afetando sua atividade (Ma et al., 2011). Neste estudo, as mudanças conformacionais das enzimas estudadas foram avaliadas através do espectro de absorbância de UV, fluorescência intrínseca, tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das enzimas nativas (controle) e pré-tratadas com US sob condições de ativação e inativação.

3.3.1 Espectros de absorbância na região Ultravioleta (UV) e Fluorescência Intrínseca

Modificações no espectro de absorbância entre 200 e 400nm refletem mudanças no microambiente onde os resíduos de aminoácidos aromáticos estão localizados, bem como a extensão da exposição de aminoácidos aromáticos, que estão associados a mudanças na estrutura terciária das proteínas (Zhang et al., 2022).

Os espectros de absorbância de UV das proteases Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® nativas mostraram que essas enzimas possuem um pico de absorção situado em 280 nm, 262 nm e 272 nm, respectivamente (Figura 3). Picos nestes comprimentos de onda eram esperados, uma vez que, nos espectros de absorbância de UV de proteínas, o aparecimento de picos na faixa de 265-280 nm se originam da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ dos resíduos aromáticos Tir, Trp e Fen (Wang et al., 2017).

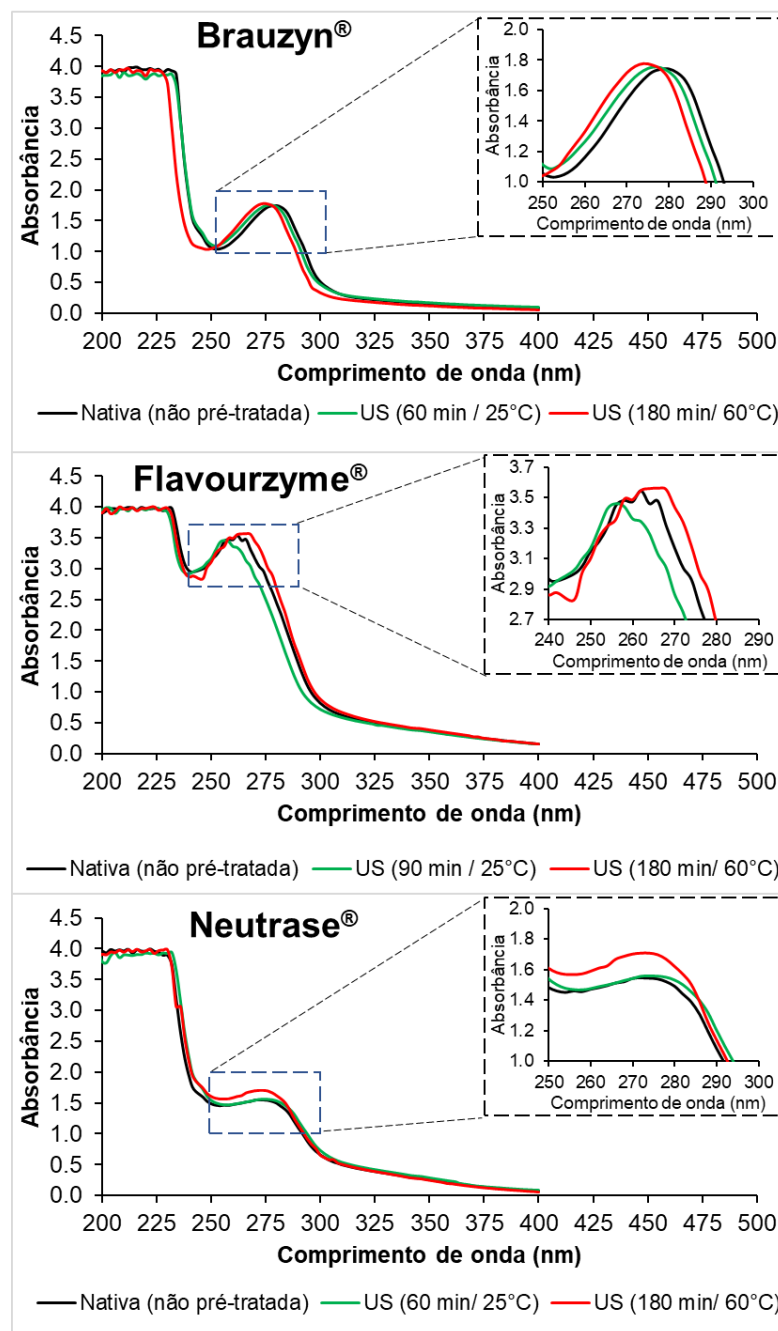


Figure 3. Espectros UV em pH 7,5 para Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® pré-tratadas por US sob condições de ativação (linha verde) e inativação (linha vermelha).

A comparação dos espectros UV para cada enzima em sua forma nativa e após processamento por US em condições de ativação e inativação, mostrou ligeiras (Brauzyn® para ambos os processos e Neutrase® para o processo de ativação) ou intensas alterações (Flavourzyme® para ambos os processos e Neutrase® para inativação).

Os resíduos de Tir, Trp e Fen são altamente sensíveis ao microambiente onde estão inseridos (Niu et al., 2015). Assim, pequenas perturbações causadas no microambiente desses resíduos de aminoácidos resultariam em alterações no espectro de absorção de UV observado. Desta forma, as mudanças observadas podem indicar que o pré-tratamento por US das enzimas sob condições de ativação e inativação promoveram mudanças na polaridade do microambiente em torno dos grupos cromóforos da proteína. Neste sentido, entre as enzimas avaliadas, a Flavourzyme® foi a que apresentou maior alteração espectral, sugerido que o US teve grande efeito na exposição de seus aminoácidos aromáticos, o que pode estar relacionado com a intensidade de desnaturação (Ma et al., 2011) e explicar por que esta enzima foi a que apresentou maior perda de atividade residual após processamento de US por 180 min na temperatura ótima.

Para aprofundar a avaliação dos efeitos relativos à polaridade do microambiente sobre aminoácidos aromáticos, a espectroscopia de fluorescência é considerada uma técnica útil devido à sensibilidade da fluorescência intrínseca de resíduos de aminoácidos aromáticos nestas condições, tornando-se uma ferramenta importante para acompanhar transições na estrutura terciária de proteínas (Pacheco et al., 2020).

A Fig. 4 apresenta os espectros de fluorescência intrínseca das enzimas estudadas em suas formas nativas e pré-tratadas por US sob condições de ativação e inativação após excitados à 295 nm. Neste comprimento de onda, o espectro observado é atribuído aos resíduos de triptofano (Trp), localizado no domínio hidrofóbico da proteína (Paiva et al., 2020).

Os espectros das enzimas Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® nativas em pH 7,5 foram caracterizados por um único pico com um comprimento de onda de fluorescência máximo (λ_{max}) em 350, 345 e 335 nm, respectivamente.

Como esperado, o processamento por US, tanto em condições de ativação e principalmente em condições de inativação, resultou em alterações no espectro de fluorescência, sendo estas mais intensas para as enzimas Flavourzyme® e Neutrase®. Foi observado um ligeiro (Brauzyn®) ou intenso deslocamento (Flavourzyme® e Neutrase®) do λ_{max} após processamento das enzimas por US em condição de inativação em relação aos espectros das enzimas em suas conformações nativas. Isso demonstra que o US modificou o microambiente do Trp destas enzimas,

direcionando-as para o ambiente mais hidrofílico (Du et al., 2022). Por outro lado, sob condições de ativação, essa alteração foi quase imperceptível.

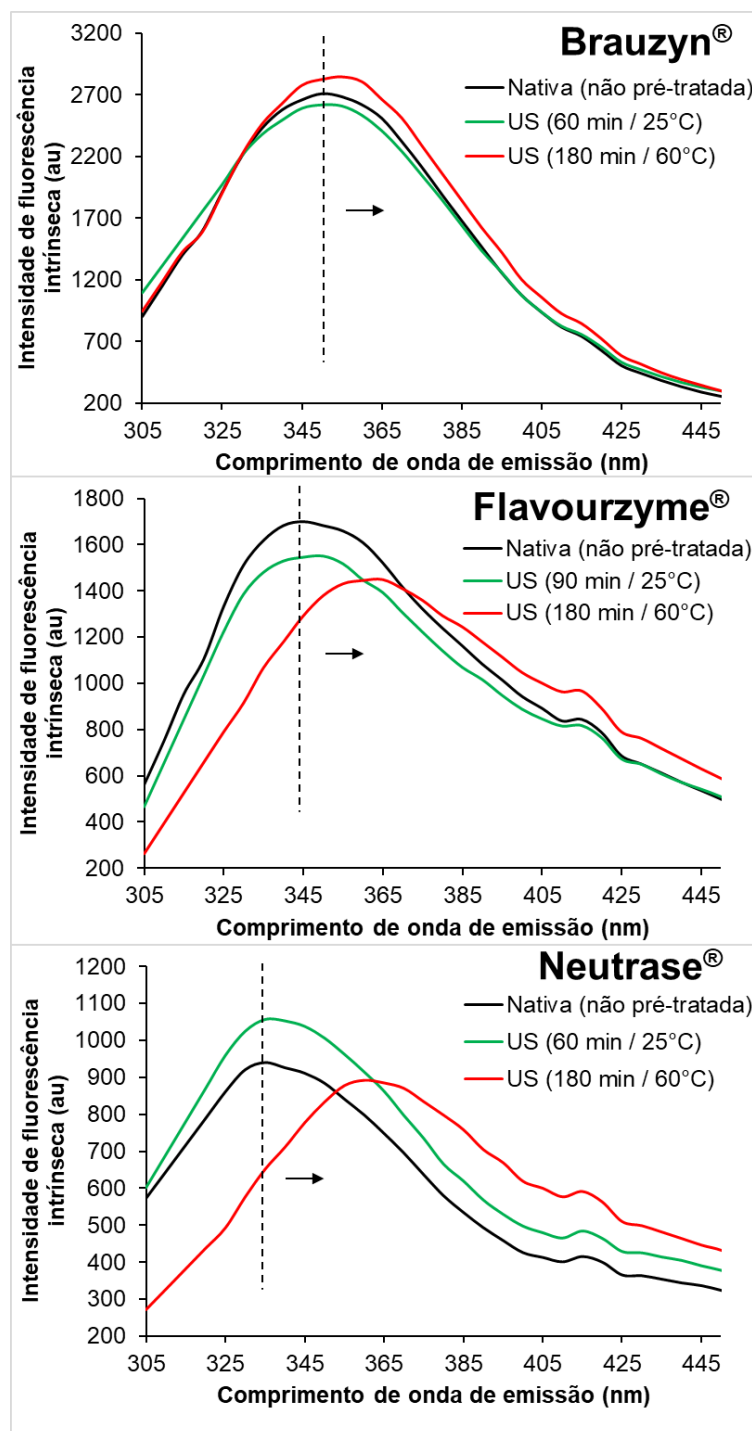


Figura 4. Espectros de fluorescência intrínseca de emissão de Trp para Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® pré-tratadas por US sob condições de ativação (linha verde) e inativação (linha vermelha).

Em termos de intensidade de fluorescência intrínseca, diferenças mais contundentes foram observadas para Flavourzyme® e Neutrase® mesmo em condições de ativação, sugerindo que, as alterações positivas nas enzimas em termos de aumento de atividade, tem maior relação com a intensidade de fluorescência intrínseca do que com o comprimento de onda máximo observado no ensaio.

Resultados semelhantes foram observados por Yu et al. (2014) para as enzimas α -amilase, papaína e pepsina pré-tratadas ou não por US. Uma possível explicação para os diferentes fenômenos foi que a exposição dos cromóforos de cada enzima foi afetada pelas condições de US. A mudança na intensidade de fluorescência foi consistente com a mudança na intensidade de absorção no espectro UV, corroborando a hipótese que modificações na configuração nativa do sítio ativo das enzimas apresentam impacto direto sobre a atividade enzimática (Zhang et al., 2022).

Em resumo, o US alterou a estrutura das três enzimas, e a extensão da mudança estrutural foi relacionada à sua conformação nativa e condições de pré-tratamento por US, sendo observada uma correlação entre a intensidade de inativação e das alterações observadas (maiores alterações percebidas para a Flavourzyme®, que também apresentou o maior nível de inativação após processamento a 60°C/180 min)

3.2.2 Tamanho médio de partícula (TMP), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta

O TMP das proteases nativas e pré-tratadas por US sob condições de ativação e inativação são mostradas na Figura 5A. Para as proteases Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® em estado nativo o TMP foi de 631 nm, 412 nm e 563 nm, respectivamente. Após o pré-tratamento por US em condições de ativação, somente para Flavourzyme® foi observado um aumento (20,5%) no tamanho médio das partículas em comparação com respectiva amostra controle ($p < 0,05$) (Figura 5). Já o pré-tratamento com US sob condições de inativação, foi observado um aumento no TMP para todas as proteases ($p < 0,05$), com maior aumento percentual para Flavourzyme® (53,7%), seguida da Neutrase® (45,6%) e com menor impacto na Brauzyn® (28,4%). Esses resultados sugerem que a inativação das proteases após processamento por US à 60°C por 180 min está relacionado com a formação de agregados, provavelmente por meio de interações não covalentes (Liu et al., 2022).

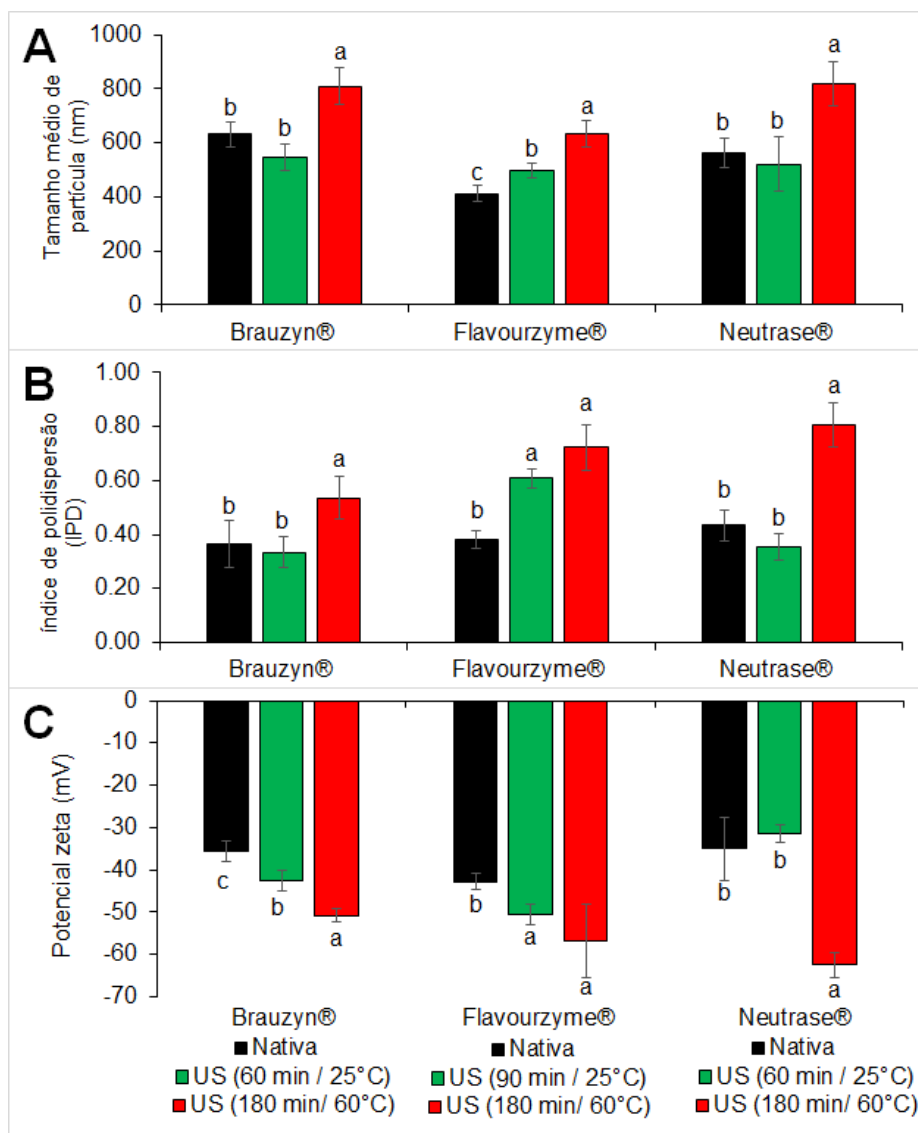


Figura 5. Tamanho médio de partícula (A), índice de polidispersão (B) e potencial zeta (C) em pH 7,5 para Brauzyn®, Flavourzyme® e Neutrase® pré-tratadas por US sob condições de ativação (linha verde) e inativação (linha vermelha). *Letras diferentes para cada enzima indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$).*

Em relação ao índice de polidispersão, as enzimas nativas apresentaram uma variação de 0,363 (Brauzyn®) a 0,434 (Neutrase®). Novamente, verificou-se que em condição de ativação, o pré-tratamento por US promoveu um aumento do IPD somente para Flavourzyme® (aumento de 59,6%) ($p < 0,05$) (Figura 5B), enquanto que todos os valores de IPD aumentaram quando as proteases foram processadas em condições de inativação ($p < 0,05$), sendo verificado as maiores alterações para Flavourzyme® (89,9%) e Neutrase® (85,9%). Um menor IPD das partículas significa uma melhor dispersibilidade em água e uma maior homogeneidade no tamanho

dessas partículas (Ai et al., 2019), indicando que o aumento do TMP observado em condições desnaturantes está também associado à formação de partículas mais heterogêneas.

O potencial zeta representa as características de carga de superfície de uma proteína e tende a ser diretamente proporcional à dispersibilidade de um coloide (Ai et al., 2018; Wang et al., 2020). Os valores do potencial zeta das proteases nativas em pH 7,5 foram de -35,6 mV (Brauzyn®), -42,8 mV (Flavourzyme®) e -35,0 mV (Neutrase®) (Figura 5C), indicando que a Flavourzyme® foi a enzima com a superfície mais repulsiva.

À exceção da Neutrase® em condição de ativação, os pré-tratamentos por US aumentaram a carga negativa de superfície das proteases ($p < 0,05$). Entretanto, similar aos demais resultados obtidos, uma maior magnitude de alteração foi observada para as condições de inativação (redução de até 78,6%) em comparação com as condições de ativação (redução de até 19,4%). Portanto, é possível dizer que, em condições de ativação, o ligeiro aumento da repulsão eletrostática das proteases juntamente com a manutenção do tamanho do médio e da homogeneidade de polidispersão dessas partículas melhorou sua dispersibilidade em água e, conseqüentemente, o desempenho hidrolítico da enzima. Por outro lado, o intenso aumento do TMP e do potencial zeta das proteases processadas em condições de inativação indicam uma desnaturação proteica com a formação de agregados heterogêneos e dispersos em solução.

A avaliação geral dos parâmetros estudados (espectro de absorbância de UV, fluorescência intrínseca, tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta) indicam que sutis modificações na exposição de resíduos de aromáticos de Tyr, Trp, Fen, como os observados para Brauzyn® e Neutrase® após processamento por US em condições de ativação, não foram capazes de impactar nas macros características da partícula. Por outro lado, a maior exposição destes resíduos (Flavourzyme® em condições de ativação e inativação e Neutrase® em condições de inativação) mostrou intensa correlação com a formação de partículas maiores, maior índice de polidispersão e menor valor de potencial Zeta, demonstrando que a avaliação das macros características das partículas representa um método indireto interessante para presumir alterações na estrutura terciária de enzimas (Omura et al., 2020).

3.3. Parâmetros cinéticos da hidrólise de PCSA usando proteases pré-tratadas por US em condições de máxima ativação

A Figura 6 mostra as curvas do grau de hidrólise (GH) (%) da PCSA utilizando as proteases nativas ou pré-tratadas por US em condições de máxima ativação. As curvas foram modeladas utilizando a Eq. 4 para obtenção da taxa de hidrólise (parâmetro k) e do grau de hidrólise final (parâmetro GH_{∞}) (Tabela 1).

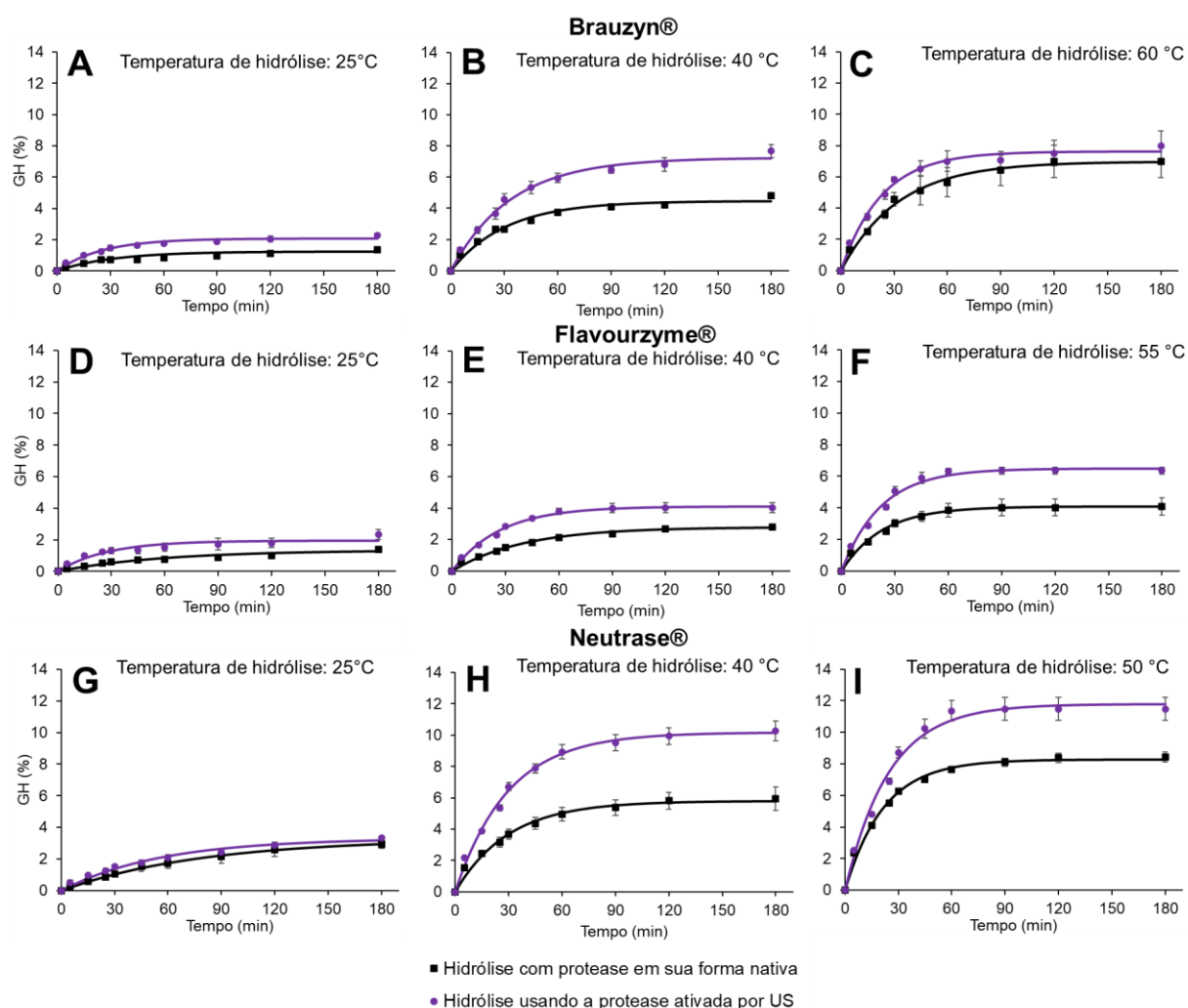


Figure 6. Hidrólise da proteína concentrada da semente de abóbora (PCSA) em diferentes temperaturas usando Brauzyne® (A, B e C), Flavourzyme® (D, E e F) e Neutrase® (G, H e I) em suas formas nativas ou pré-tratadas por US em condições de máxima ativação. Os pontos são os valores experimentais, as barras verticais são o desvio padrão para cada condição e as curvas (linhas contínuas) são geradas pelo modelo ajustado a Eq. (4).

Tabela 1. Parâmetros da Eq. (4) ajustado à hidrólise da PCSA em diferentes temperaturas usando proteases em sua forma nativa ou pré-tratadas por US em condições de máxima ativação.

Enzima	Hidrólise	T (°C)	k (min ⁻¹)	GH _∞ (%)	R ²	GH _{45 min} (%)	GH _{180 min} (%)
Brauzyn®	Enzima nativa	25	0,032 ± 0,018 ^a	1,2 ± 0,2c	0,959	0,7 ± 0,2d	1,4 ± 0,1c
		40	0,032 ± 0,001 ^a	4,5 ± 0,1b	0,989	3,2 ± 0,1c	4,8 ± 0,2b
		60	0,031 ± 0,003 ^a	7,0 ± 1,2a	0,994	5,1 ± 0,9b	7,0 ± 1,0a
	Enzima pré-ativada por US	25	0,040 ± 0,007 ^a	2,1 ± 0,1c	0,986	1,6 ± 0,1d	2,3 ± 0,1c
		40	0,030 ± 0,002 ^a	7,3 ± 0,3a	0,994	5,3 ± 0,4ab	7,7 ± 0,4a
		60	0,044 ± 0,006 ^a	7,6 ± 0,9a	0,995	6,5 ± 0,5a	8,0 ± 1,0a
Flavourzyme®	Enzima nativa	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 ± 0,007 ^a	4,1 ± 0,6b	0,995	3,5 ± 0,3b	4,1 ± 0,5b
	Enzima pré-ativada por US	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 ± 0,001 ^a	6,5 ± 0,2a	0,995	5,9 ± 0,3a	6,4 ± 0,2 ^a
Neutrase®	Enzima nativa	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 ± 0,005 ^a	8,3 ± 0,3c	0,996	7,0 ± 0,0b	8,4 ± 0,3b
	Enzima pré-ativada por US	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 ± 0,6 ^a
		50	0,041 ± 0,002ab	11,8 ± 0,8a	0,995	10,2 ± 0,6a	11,5 ± 0,7 ^a

* 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: ultrassom. k = taxa de reação de hidrólise (min⁻¹) em dada temperatura. DH_∞ = Grau final de hidrólise (%). GH_{45min} e GH_{180min} = grau de hidrólise aos 45 e 180 min de hidrólise, respectivamente (%).

De forma geral, comparando o desempenho das diferentes enzimas em sua configuração nativa, 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®, sendo que, quando comparado à hidrólise a 25°C, a taxa de hidrólise aumentou 175% para Flavourzyme® e 254% para Neutrase® nas temperaturas ótimas de cada enzima. Além disso, a Neutrase® apresentou maior grau de hidrólise final (GH_∞) em todas as temperaturas avaliadas (máxima de 8,3% à 50°C), seguida por Brauzyn® (máxima de 7,1% à 55°C) e Flavourzyme® (máxima de 4,1% à 55°C) ($p < 0,05$). Esses resultados eram esperados considerando que as enzimas apresentam maior atividade na temperatura ótima.

Na avaliação comparativa entre os processos, verificou-se que as reações utilizando as proteases ativadas por US apresentaram similares ou maiores taxas de hidrólise (máximo aumento de 125%, observado para hidrólise utilizando Flavourzyme® à 25°C). Além disso, todas as proteases pré-tratadas por US apresentaram maior GH_∞ em comparação com o controle na maioria das temperaturas de hidrólise avaliadas, com incremento de até 75% na reação à 40°C usando a Neutrase® ($p < 0,05$) (Tabela 1). Tal aumento indica um maior número de ligações peptídicas clivadas, ou seja, a formação de uma maior proporção de hidrolisados de cadeia menores e aminoácidos livres (Wang et al., 2018).

Outro ponto importante a ser destacado é o aumento no grau de hidrólise entre 45 e 180 min ($\text{GH}_{45\text{min}}$ e $\text{GH}_{180\text{min}}$), bem como do GH_∞ em temperaturas de 25 e 40 °C das proteólises utilizando enzimas pré-ativadas por US (Figura 6 / Tabela 1). Esse aumento proporcionou GH similares ou maiores comparados ao GH_∞ dos processos realizados à temperatura ótima usando as enzimas em suas configurações nativas ($p > 0,05$). Este resultado é interessante, uma vez que a baixa temperatura de operação é preferida industrialmente devido à redução de custo causada pela economia de energia e menor necessidade de manutenção de equipamentos (Soares et al., 2020), além de evitar alterações na qualidade do produto em temperaturas elevadas.

3.4 Avaliação da solubilidade e atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados proteicos obtidos da hidrólise da PCSA utilizando enzimas ativadas por US

A Figura 7 apresenta os resultados para a solubilidade em diferentes valores de pH da PCSA (não hidrolisada) e seus hidrolisados obtido após 45 e 180 min de hidrólise usando as proteases em suas formas nativas ou ativadas por US.

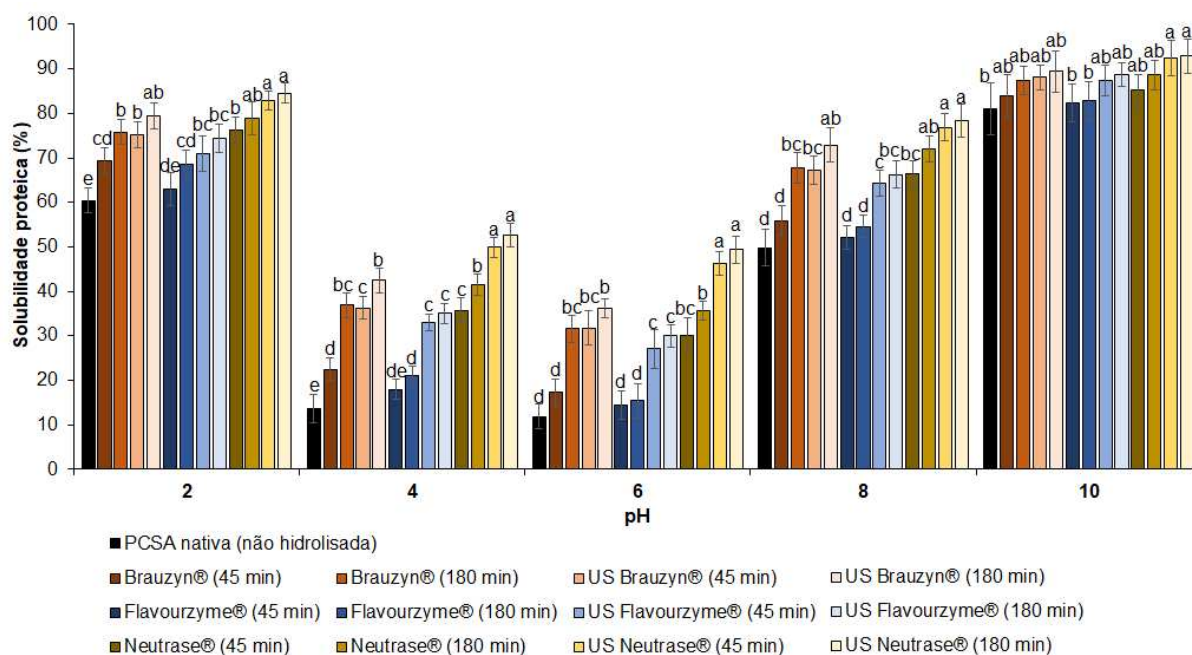


Figura 7. Solubilidade proteica (%) da PCSA hidrolisada por 45 e 180 minutos em temperatura ótima para cada enzima usando as proteases em suas formas nativas ou ativadas por US. Letras diferentes em cada pH indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

A solubilidade da PCSA nativa apresentou valores máximos em pH 10 (81%) e reduziu gradativamente até pH 6-4 (12%-14%) e aumentou em pH 2 (61%). Esse comportamento em forma de U foi previamente descrito para diversas proteínas vegetais (Bucko et al., 2015; Alavi et al., 2021; Zhao et al., 2022). Os baixos valores de solubilidade do PCSA em pH 4 e 6 e elevados em pH extremos (pH 10 e pH 2) é esperado devido às fortes interações intermoleculares no ponto isoelétrico (pI das proteínas da semente de abóbora = 5,0 (Bucko et al., 2016)) e repulsão molecular em pH mais alto ou mais baixo (Yuliana et al., 2014; Chatterjee et al., 2015).

A hidrólise de PCSA com as enzimas em suas formas nativas resultou em aumento de solubilidade, especialmente em pH 4 e pH 6. Os maiores aumentos foram

obtidos pela ação da Neutrase® após 180 min de hidrólise, alcançando solubilidades de 42% (pH 4,0) e 36% (pH 6,0) ($p < 0,05$). O aumento da solubilidade proteica após a hidrólise enzimática (Jung et al., 2004; Ghribi et al., 2015; Goertzen et al., 2021) é atribuído à (i) redução do peso molecular com aumento da interação entre hidrolisados e água, (ii) aumento de peptídeos solúveis a partir de agregados ou precipitados insolúveis e (iii) aumento de grupos polares e ionizáveis (grupos amino e carboxila) (Bucko et al., 2016).

A utilização das proteases ativadas por US aumentou a solubilidade dos hidrolisados em comparação com as obtidas pela hidrólise de PCSA com as mesmas enzimas em suas formas nativas em todos os valores de pH avaliados ($p < 0,05$), atingindo até 53% (pH 4,0) e 49% (pH 6,0) de solubilidade quando a hidrólise foi realizada com Neutrase® ativada. Esse resultado é importante considerando que esta é a faixa de pH da maioria dos produtos alimentícios.

Além disso, após 45 min de hidrólise usando as enzimas ativadas por US, verificou-se uma solubilidade maior ou igual às obtidas após 180 min de hidrólise com as enzimas em suas formas nativas para cada pH avaliado. Este resultado é importante e demonstra uma aceleração na produção de compostos de interesse industrial, com maiores rendimentos, principalmente quando a hidrólise foi conduzida pela Neutrase® ativada. Vale ressaltar que esses achados confirmam os apresentados e discutidos na seção 3.3, demonstrando que o GH está diretamente ligado com a solubilidade em diferentes pH (Magalhães et al., 2022).

A capacidade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados de PCSA (Figura 8) foi medida pela determinação dos radicais ABTS (radicais catiônicos e hidrofílicos) e DPPH (radicais aniônicos e lipofílicos).

Os resultados mostraram que a hidrólise da PCSA usando as enzimas em suas formas nativas aumentou a capacidade das amostras de eliminar radicais DPPH e ABTS, com maior atividade antioxidante obtida para hidrólise usando a Brauzyn®, independente do tempo de processo. Aumento na atividade antioxidante também foram obtidos em outros estudos após a hidrólise enzimática de proteínas de semente de abóbora (Vaštag et al., 2011; Venuste et al., 2013; Nourmohammadi et al., 2017).

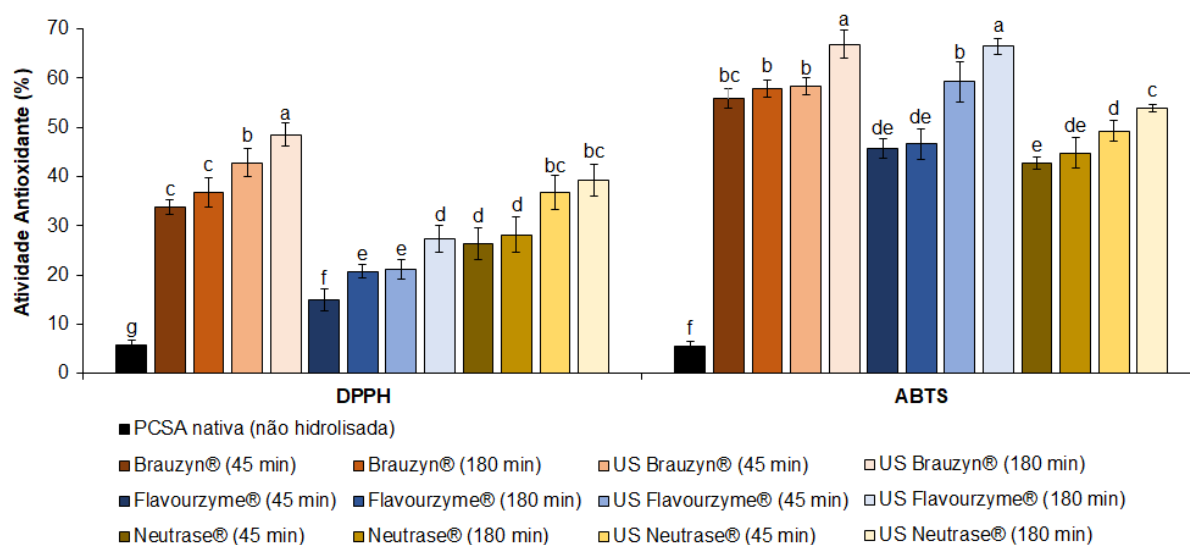


Figura 8. Atividade antioxidante *in vitro* (%) dos ensaios DPPH e ABTS da PCSA hidrolisada por 45 e 180 minutos em temperatura ótima para cada enzima em sua forma nativa ou ativada por US. Letras diferentes para cada ensaio indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

A especificidade da enzima e o tamanho, tipo e composição/sequência de aminoácidos livres e pequenos peptídeos produzidos pela ação enzimática compreendem as principais razões para expressão diferencial de atividade antioxidante em diferentes hidrolisados (Nourmohammadi et al., 2017). Neste contexto, peptídeos com alto teor de aminoácidos aromáticos (como Try, Tyr e Phe) têm atividade antioxidante devido à capacidade dos grupos fenólicos serem doadores de hidrogênio (Magalhães et al., 2022). Assim, comparando o desempenho das três diferentes enzimas estudadas, o melhor desempenho da Brazyn® possivelmente é devido à sua preferência pela clivagem por ligações peptídicas de regiões hidrofóbicas (Lorenzo, et al., 2018), levando à produção mais consistente de peptídeos doadores de elétrons ou hidrogênio, que poderiam reagir com radicais livres para produzir produtos mais estáveis (Nourmohammadi et al., 2017).

Em relação ao efeito do uso das proteases pré-ativadas por US, a maioria dos hidrolisados obtidos com estas enzimas apresentaram uma maior capacidade de eliminação ($p < 0,05$) de ABTS e DPPH, quando comparados aos obtidos pela hidrólise com as enzimas em suas formas nativas. Destaca-se os hidrolisados obtidos pela Neutrase® ativada por US, nos quais foi observado ~40% de aumento na capacidade de eliminação de ABTS ($p < 0,05$) independente do tempo de hidrólise e os obtidos pela

Flavourzyme® ativada, com aumento de ~30 e 40% na capacidade de eliminação de DPPH ($p < 0,05$) após 45 e 180 min de hidrólise, respectivamente.

Portanto, conclui-se a utilização das proteases ativadas por US melhoraram o grau de hidrólise e, conseqüentemente, potencializaram as propriedades de solubilidade e atividade antioxidante *in vitro*, com destaque para Neutrase® e Flavourzyme® que resultaram em maior GH e melhores propriedades multifuncionais para os hidrolisados obtidos.

4. Conclusão

O ultrassom causou alterações nas estruturas das enzimas, especialmente em condições de inativação. Essas alterações levaram à mudanças nas macros características das enzimas (tamanho médio, IPD e pontecial zeta), impactando nas atividades residuais. Processos mais severos de US resultaram em inativação enzimática; por outro lado, pré-tratamentos de US em condições mais brandas foram positivos para aumentar a atividade das enzimas, resultando em maior taxa e grau de hidrólise com conseqüente aumento de solubilidade e atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados obtidos. Entre as proteases ativadas por US, a Neutrase® foi a que resultou em maior aumento de solubilidade dos hidrolisados e, para atividade antioxidante, melhores resultados foram obtidos após proteólise com Neutrase® e Flavourzyme®. Neste caso, a escolha final da enzima deve ser realizada em função da aplicação dos hidrolisados. De qualquer forma, independente da enzima, os resultados apontam que o US tem potencial para melhorar o perfil hidrolítico dessas proteases.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto APQ-00388-21 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento do projeto 429033/2018-4 e as bolsas de produtividade de B.R.C. Leite Júnior (306514/2020-6) e A.A.L. Tribst (305050/2020-6).

Referências

- Ai, M.; Tang, T.; Zhou, L.; Ling, Z.; Guo, S.; Jiang A. Effects of different proteases on the emulsifying capacity, rheological and structure characteristics of preserved egg white hydrolysates. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 933-942, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.023>
- Alavi, F.; Chen, L.; Emam-Djomeh, Z. Effect of ultrasound-assisted alkaline treatment on functional property modifications of faba bean protein. **Food Chemistry**, v. 354, 129494, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129494>
- AOAC. Official methods of analysis of the association of analytical chemists international. **Gaithersburg: AOAC**, 2005.
- Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential - what they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, 235 (2016), p. 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bučko, S.; Katona, J.; Popović, L.; Petrović, L.; Milinković, J. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.005>
- Bučko, S.; Katona, J.; Popovića, L.; Vaštaga, Ž.; Petrovića, L.; Vučinić–Vasićb, M. Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. **LWT Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, 609-615, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.054>
- Dabbour, M.; Alenyorege, E. A.; Mintah, B.; He, R.; Jiang, H.; Ma, H. Proteolysis kinetics and structural characterization of ultrasonic pretreated sunflower protein. **Process Biochemistry**, v. 94, p. 198-206, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.018>.
- Fadimu, G. J.; Le, T. T.; Gill, H.; Farahnaky, A.; Olatunde, O. O.; Truong, T. Enhancing the Biological Activities of Food Protein-Derived Peptides Using Non-Thermal Technologies: A Review. **Foods**, v. 11, 823, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11131823>
- Grintsevich, E.E.; Adzerikho, I.E.; Mrochek, A.G.; Metelitz, D.I. Polydisulfides of substituted phenols as effective protectors of peroxidase against inactivation by

ultrasonic cavitation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, n. 7, p. 740 – 746, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1010256511200>

He, X. Q.; Cao, W. H.; Pan, G. K.; Yang, L.; Zhang, C. H. Enzymatic hydrolysis optimization of *Paphia undulata* and lymphocyte proliferation activity of the isolated peptide fractions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 7, 1544–1553, 2015. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6859>

Jain, S.; Anal, A.K. Optimization of extraction of functional protein hydrolysates from chicken egg shell membrane (ESM) by ultrasonic assisted extraction (UAE) and enzymatic hydrolysis. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology**, v. 69, p. 295-302, 2016. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.01.057>

Jin, J.; Ma, H.; Zhou, C.; Luo, M.; Liu, W.; Qu, W.; He, R.; Luo, L. A.; Yagoub, E. G. A. Effect of degree of hydrolysis on the bioavailability of corn gluten meal hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 12, p. 2501–2509, 2015. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6982>

Kadam, S.U.; Tiwari, B.K.; Álvarez, C.; O'Donnell, C.P. Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 60-67, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.012>

Li, Y.; Yu, L.; Wang, L.; Xiong, W. Insight into Effects of high Intensity Ultrasound Treatment on Foamability and Physicochemical Properties of Frozen egg White Protein. **Food Biophysics**, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11483-022-09764-5>

Li, F.; Tang, Y. The activation mechanism of peroxidase by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 71, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105362>

Liu, X.; Wang, M.; Xue, F.; Adhikari, B. Application of ultrasound treatment to improve the technofunctional properties of hemp protein isolate. **Future Foods**, v. 6, 100176, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100176>.

Ma, H.; Huang, L.; Jia, J.; He, R.; Luo, L.; Zhu, W. Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 419-424, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.07.014>

- Magalhães, I.A.; Guimarães, A.D.B.; Tribst, A.A.L.; Oliveira, E.B.; Leite Júnior, B.R.C. 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, 111310, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111310>.
- Niu, F.; Dong, Y.; Shen, F.; Wang, J.; Liu, Y.; Su, Y.; Xu, R.; Wang, J.; Yang, Y. Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin-gum Arabic complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.009>
- Pacheco, A. F. C.; Nunes, N. M.; Paula, H. M. C.; Coelho, Y. L.; Silva, L. H. M.; Pinto, M. S.; Pires, A. C. S. β -Casein monomers as potential flavonoids nanocarriers: Thermodynamics and kinetics of β -casein-naringin binding by fluorescence spectroscopy and surface plasmon resonance. **International Dairy Journal**, v. 108, 104728, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104728>.
- Paiva, P. H. C.; Coelho, Y. L.; Silva, L. H. M.; Pinto, M. S.; Vidigal, M. C. T.R.; Pires, A. C. S. Influence of protein conformation and selected Hofmeister salts on bovine serum albumin/lutein complex formation. **Food Chemistry**, v. 305, 125463, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125463>
- Popović, L.; Peričin, D.; Vaštag, Ž.; Popović, S.; Krimer, V.; Torbica, A. Antioxidative and functional properties of pumpkin oil cake globulin hydrolysates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 8, p. 1157-1165, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2257-5>
- Potapovich, M.V.; Eremin, A.N.; Metelitz, D.I. Kinetics of Catalase Inactivation Induced by Ultrasonic Cavitation. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 140 – 146, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1022577611056>
- Sila, A.; Bougatef, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. **A review. Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 10–26, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.007>
- Soares, A.S.; Leite Júnior, B.R.C.; Tribst, A.A.L.; Augusto, P.E.D.; Ramos, A.M. Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. **LWT Food Science and Technology**, v. 130, 109636, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109636>

Soares, L. S. et al. Chitosan dispersed in aqueous solutions of acetic, glycolic, propionic or lactic acid as a thickener/stabilizer agent of O/W emulsions produced by ultrasonic homogenization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 59, p. 104754, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104754>.

Sun, C.; Shan, Y.; Tang, X.; Han, D.; Wu, X.; Wu, H.; Hosseinienezhad, M. Effects of enzymatic hydrolysis on physicochemical property and antioxidant activity of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf protein. **Food Science and Nutrition**, v. 25, n. 9, p. 5379-5390, 2021. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2474>

Vaštag, Ž.; Popović, L.; Popović, S.; Krimer, V.; Peričin, D. Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 277-282, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.12.003>

Vaštag, Ž.; Popović, L.; Popović, S.; Krimer, V.; Peričin, D. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1316-1321, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.062>

Vinatoru, M. Ultrasonically assisted extraction (UAE) of natural products some guidelines for good practice and reporting. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 25, p. 94-95, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.003>

Wang, Y.; Wang, C.; Wang, S.; Li, Y.; Mo, H.; He, J. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases. **Food Chemistry**, v. 345, 128765, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128765>

Wang, K.; Sun, D.W.; Pu, H.; Wei, Q. Principles and applications of spectroscopic techniques for evaluating food protein conformational changes: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, n. 1, p. 207-219, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.015>

Zhang, M.; Fan, L.; Liu, Y.; Li, J. Relationship between protein native conformation and ultrasound efficiency: For improving the physicochemical stability of water-in-oil emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 651, 129737, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129737>.

CONCLUSÕES GERAIS

As proteínas de sementes de abóbora (PSA) apresentam potencial para geração de hidrolisados multifuncionais. A hidrólise enzimática é preferível; entretanto, o alto custo das enzimas, o baixo grau de hidrólise e o longo tempo de reação limitam a proteólise em escala industrial. A avaliação geral dos resultados mostrou que a tecnologia de ultrassom (US) pode melhorar a performance enzimática e otimizar o processo de obtenção desses hidrolisados, sendo uma alternativa para minimizar suas limitações e proporcionar ampliação do mercado.

Especificamente, o pré-tratamento da Alcalase® por US (25°C/120 min) promoveu uma ativação de até 10,3% e o pré-tratamento das PSA por US (25°C/120 min) facilitou a reação, resultando em um aumento de atividade de até 50,1%. A taxa de hidrólise das PSA (aumento de até ~280%) e a concentração final de peptídeos solúveis de TCA (aumento de até ~24%) foram melhoradas principalmente usando PSA pré-tratada por US ou em reações assistidas. Consequentemente, a hidrólise nessas condições melhorou a solubilidade (até 148,1%) e potencializou a atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados na maioria das condições avaliadas.

O pré-tratamento por US da Brauzyn® (25°C/60 min), Flavourzyme® (25°C/90 min) e Neutrase® (25°C/60 min) promoveu ativação de até 20,8%, 22,4% e 22,7%, respectivamente, e ligeiras alterações na estrutura terciária. Essas alterações levaram a mudanças nas macros características das enzimas (tamanho médio, IPD e pontecial zeta), impactando nas atividades residuais. Em condições de ativação por US, a Flavourzyme® apresentou maior taxa de hidrólise (aumento de até 125% a 25°C) e a Brauzyn® e a Neutrase® apresentaram maior grau de hidrólise final (aumento de até 75% a 25°C e 76% a 40°C, respectivamente). Consequentemente, houve um aumento na solubilidade (destaque para Neutrase®) e atividade antioxidante *in vitro* (especialmente para Neutrase® e Flavourzyme®) dos hidrolisados. Portanto, conclui-se que a tecnologia de US pode ser uma estratégia promissora na geração de hidrolisados potencialmente bioativos e técnico-funcionais, otimizando o processo e favorecendo a agregação de valor ao produto.