

Determinação da atividade enzimática da α -Amilase, β -Amilase e Protease no trigo, aveia e arroz.

**Meza, S.L.R.; Coelho, M.S; Bretanha, C.C.; Freitas, C.H; Menezes, B.S.; Pagnussatt, F.A.;
Garda-Bufferon, J.; Badiale-Furlong, E.**

Introdução

O arroz, trigo e aveia apresentam algumas semelhanças estruturais e consistem de um embrião, que contém o material genético para a formação de uma nova planta, e um endosperma, rico em amido. A composição química e as propriedades tecnológicas dos grãos variam dependendo das condições a qual ele foi submetido como ambiente, solo e outras variáveis. Além disso, estes cereais possuem inibidores enzimáticos de amilases que conferem resistência a contaminação fúngica e a germinação precoce dos grãos (McKEVITH, 2004).

As α -amilase e β -amilase atuam sobre o amido, glicogênio e outros derivados de polissacarídeos para hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 e a protease quebra ligações peptídicas entre aminoácidos das proteínas (FERNANDES et al., 2007). As α -amilases vegetais apresentam maior atividade em valores de pH 5,0 e 6,0 e temperatura em torno de 30 °C. As β -amilases de cereais têm pH ótimo de atividade em meio ácido, cerca de 5 e temperatura ao redor de 40°C enquanto a protease tem temperatura ótima cerca de 70°C e pH ótimo 8 (KOBBLITZ, 2008).

A presença da atividade de α -amilase durante a maturação do trigo e da aveia corresponde a aproximadamente 30 % da proteína total sintetizada durante a germinação e é encontrada no pericarpo e em menores quantidades nas camadas da aleurona e gérmen (MURALIKRISHNA E NIRMALA, 2005).

Neste trabalho objetivou-se em avaliar a presença da atividade enzimática da α -amilase, β -amilase e protease em três cultivares de trigo, aveia e arroz, visando correlacioná-la com a presença de inibidores enzimáticos e resistência a contaminação fúngica.

Metodologia

As sementes de arroz foram fornecidas pelo Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), trigo pela empresa OR Melhoramento de Sementes e aveia pela Universidade de Passo Fundo. Foram analisadas 3 variedades de trigo (Pampeano, Safira, Ônix), 3 de aveia (Pampa, Temprana e Teixeira) e 3 de arroz (BR 410, BR 417 E BR 424). Os grãos foram moídos em moinhos de facas até granulometria de 32 mesh. O extrato enzimático bruto foi extraído com NaCl 0,5% e agitado em shaker por 1:30h.

A medida da proteína solúvel foi realizada pelo método de Lowry (1951) empregando albumina como padrão.

A atividade de α -amilase foi analisada pela degradação do amido estimada quantitativamente pelo método iodométrico (GARCIA, 1990) com modificações. No trigo o isolamento dessa enzima foi

feito com a utilização de tampão fosfato de sódio com KCl pH 6 e nas amostras de aveia e arroz com tampão citrato com KCl pH 7. A atividade específica foi estimada pela equação 1.

$$UA_{\text{-amilase}} = \frac{\text{concentração inicial de amido} - \text{concentração final de amido}}{\text{min. mg proteína}} \quad (\text{Eq.1})$$

A α -amilase teve sua ação determinada pela liberação de maltose quantificada pelo método colorimétrico do 3,5 DNS. A atividade específica foi estimada pela equação 2.

$$UA_{\text{-amilase}} = \frac{\text{mg maltose liberada}}{\text{min. mg proteína}} \quad (\text{Eq.2})$$

A atividade das proteases foi determinada empregando albumina como substrato, medindo aminoácido livre tendo tirosina como indicativo de hidrólise. A atividade específica foi estimada conforme a equação 3.

$$UA_{\text{protease}} = \frac{\text{mg tirosina}}{\text{min. mg proteína}} \quad (\text{Eq.3})$$

Resultados e Discussão

O teor de proteína solúvel encontrado nas amostras de aveia foi superior ao dos demais cereais analisados.

Tabela 1: Valores de proteína solúvel em cereais

Amostras	mg de Proteína/g de Amostra*
TRIGO SAFIRA	4,08 ±0,018
TRIGO ÔNIX	4,94 ±0,031
TRIGO PAMPEANO	4,68 ±0,012
AVEIA TEMPRANA	6,00 ±0,006
AVEIA TEIXEIRINHA	5,73 ±0,011
AVEIA PAMPA	5,73 ±0,024
ARROZ BR 410	3,05 ±0,009
ARROZ BR 417	4,75 ±0,018
ARROZ BR 424	5,18 ±0,005

*Média dos resultados em triplicata

As 3 variedades de trigo apresentaram maior atividade de α -amilase e β -amilase do que as amostras de aveia e arroz. Isto justifica o fato desse cereal estar entre os mais susceptíveis a germinação e contaminação fúngica.

Embora o amido seja o principal constituinte na aveia, quando comparado ao trigo, a atividade de enzimas foi considerada baixa, o que pode estar relacionada com a presença de proteínas, lipídios e

fibras que dificultam a atuação ou extração da enzima. As amostras de arroz foram as que apresentaram menor atividade de enzimas amilolíticas em função da sua localização nas frações mais externas do grão, como forma de proteção contra ataque microbiano.

A atividade de protease teve variações sendo o trigo Pampeano, seguido pelas aveias Temprana e Teixeira, trigo Safira e Ônix e a aveia Pampa, as que se destacaram. Fato que pode justificar a sensibilidade destes cereais a ação fúngica, pois as enzimas proteolíticas podem atuar sobre os inibidores enzimáticos de caráter protéico. As variedades de arroz BR 410, BR 417 e BR 424 destacaram-se pela baixa atividade destas enzimas.

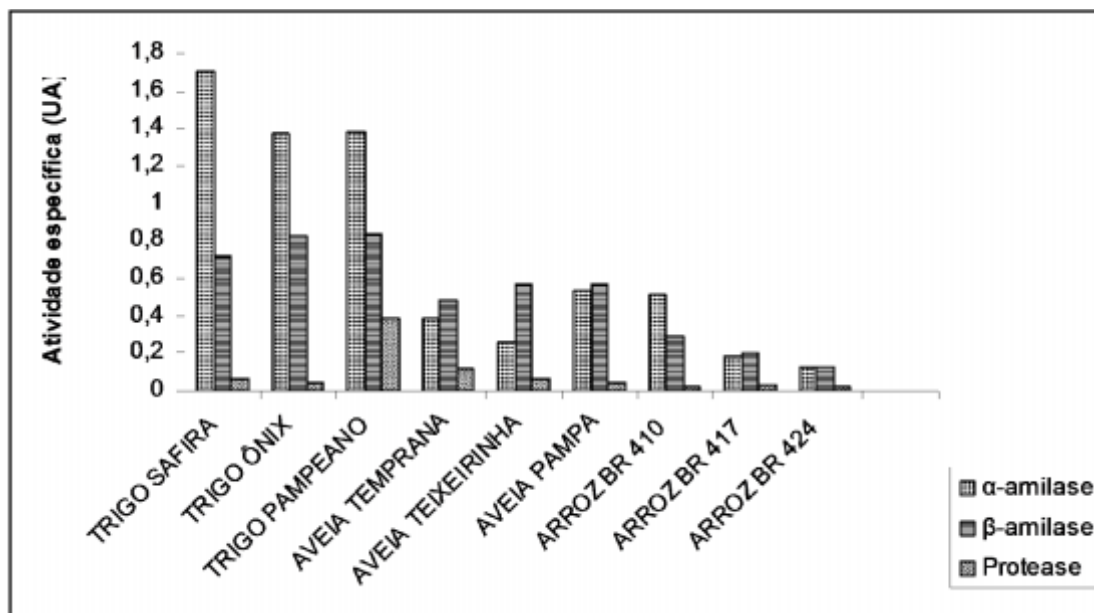


Figura 1: Atividade específica da α-amilase, β-amilase e protease.

Conclusões

Nas variedades de trigo, a atividade de α-amilase foi 4 e 6 vezes maior que nas amostras de aveia e o arroz, respectivamente. O desempenho da β-amilase nas amostras de trigo foi o dobro da aveia e 4 vezes maior em relação ao arroz. Quanto à ação proteolítica ocorreram maiores variações nas amostras de trigo, sendo a variedade Pampeano o mais elevado.

Referências

FERNANDES L.P.; ULHOA, C.J.; ASQUIERI, E.R.; MONTEIRO, V.N., Produção de amilases pelo fungo *MACROPHOMINA PHASEOLINA*, **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol. IV, p. 43-45; 2007.

GARCIA, T.D.J. **α-amilase de *Bacillus subtilis* ATCC 601B: Produção e propriedades da enzimas não purificada**. 1990. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1990.

GUANDALINI, N.C., **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium***

Anisopliae utilizando resíduos amiláceos como substrato. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Campinas, SP, 2007.

Koblitz, M.G.B., **Bioquímica de Alimentos- Teoria e Aplicações Práticas.** Rio de Janeiro, RJ. Editora LAB, 2008.

McKEVITH, B. Nutritional aspects of cereal. **Nutrition Bulletin**, v. 29, p. 111-142, 2004.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal -amylases: an overview. **Carbohydrate polymers**, v. 60, p. 163-173, 2005